

MESTRADO

TOXICOLOGIA ANALÍTICA CLÍNICA E FORENSE

**Avaliação *in vitro* de efeitos citotóxicos
e terapêuticos de fármacos
reaproveitados para o combate do
cancro da próstata**

Tânia Dias Lourenço

M

2023



Entidade financiadora

**Cátedra de Inovação em Oncologia da Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto**



Tânia Dias Lourenço

**Avaliação *in vitro* de efeitos citotóxicos e
terapêuticos de fármacos reaproveitados para o
combate do cancro da próstata**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre
em Toxicologia Analítica Clínica e Forense pela Faculdade de
Farmácia da Universidade do Porto

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Nuno Vale e
coorientação da Professora Doutora Helena Carmo

Setembro 2023

Declarações

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO.

Tênia Dias Lourenço

Esta dissertação originou os seguintes artigos científicos:

Lourenço, T.; Vale, N. Pharmacological Efficacy of Repurposing Drugs in the Treatment of Prostate Cancer. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 4154. <https://doi.org/10.3390/ijms24044154>

Publicado a 19 de fevereiro de 2023

Lourenço, T.; Vale, N. Entecavir: A Review and Considerations for Its Application in Oncology. Pharmaceuticals

Publicado a 14 de novembro de 2023

Lourenço, T.; Marques, L.; Ribeiro, E.; Vale, N. Repurposing Entecavir against urological cancer cell lines UM-UC-5 and PC-3. Int. J. Mol. Sci.

Submetido

Agradecimentos

Ao Senhor Professor Doutor Nuno Vale por me ter permitido terminar este projeto após um interregno tão grande, por me colocar à disposição o seu laboratório, pela ajuda e colaboração e pela oportunidade de me fazer evoluir academicamente.

A todos os docentes do Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense, pela transmissão de conhecimentos e, em particular, à Senhora Professora Doutora Helena Carmo pelo incentivo e encorajamento em concluir este desafio.

À Mariana Pereira, pela ajuda e pela grande generosidade na partilha de conhecimentos. Por todo o tempo despendido e pela disponibilidade que sempre demonstrou.

Aos meus pais, por tudo, que é tanto.

Para o Tiago,

Por nunca me deixar desabar e me amparar as quedas de braços abertos

Pela motivação, pela ajuda, pelo amor

Resumo

Avaliação *in vitro* de efeitos citotóxicos e terapêuticos de fármacos reaproveitados para o combate do cancro da próstata

Mundialmente, o cancro da próstata (CP) é a segunda neoplasia maligna mais frequente no sexo masculino e a quinta causa de morte mais comum, sendo que os tratamentos existentes, geralmente, apresentam intensos efeitos secundários e levam ao aparecimento de resistências. Assim, torna-se essencial encontrar fármacos que colmatem estas falhas e, em vez de desenvolver novas moléculas que implicariam investimentos financeiros elevados e dispêndio de tempo em ensaios clínicos, é de toda a pertinência selecionar fármacos já comercializados com outra indicação terapêutica, mas que possuam mecanismos de ação que combatam o CP, isto é, o reaproveitamento de fármacos.

Deste modo, o principal objetivo desta dissertação é avaliar se os antivíricos valganciclovir (VGCV) e entecavir (ETV) possuem atividade anticancerígena em células tumorais prostáticas, particularmente nas células PC-3. Pretende-se não só avaliar o seu efeito isoladamente como também testá-los em combinação com o fármaco quimioterápico de referência 5-fluorouracilo (5-FU) e, visto que este não é um fármaco de primeira linha no tratamento do CP, avaliar-se-á também a sua eficácia.

Portanto, após a exposição das células PC-3 aos fármacos durante os tempos pretendidos, avaliou-se a sua morfologia com recurso ao microscópio, a viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade através do brometo de tiazolil azul de tetrazólio (MTT) e, finalmente a análise estatística dos dados obtidos foi conseguida através da construção das curvas dose-resposta, através das quais se tentou obter o valor da metade da concentração inibitória máxima (IC_{50}) de cada um dos fármacos, e dos gráficos de barras.

Concluiu-se que o VGCV não teve atividade nas células PC-3, ao contrário do ETV que mostrou efeitos citotóxicos significativos nesta linha celular e do 5-FU que apesar de não ter sido tão eficaz como é noutros tipos de tumores, apresentou um desempenho favorável. Para além disto, o IC_{50} do ETV foi inferior ao obtido para o 5-FU. Já a combinação de 5-FU com ETV após exposição de 72 horas é uma associação vantajosa, superando os resultados de cada fármaco isoladamente. Assim, o ETV revelou um enorme potencial para ser utilizado em oncologia e, para além do tratamento do CP, também poderá ser útil noutras neoplasias, portanto o reaproveitamento do ETV mostrou ser uma estratégia eficaz nomeadamente através da combinação com o 5-FU, porém são necessários mais estudos.

Palavras-chave: Reaproveitamento de fármacos; Cancro da próstata; ETV; VGCV; Estudos de combinação

Abstract

***In vitro* evaluation of the cytotoxic and therapeutic effects of repurposed drugs for prostate cancer treatment**

Worldwide, prostate cancer (PC) is the second most frequent cancer among men and the fifth leading cause of death. Furthermore, PC treatments have several issues, such as intense side effects and mechanisms of resistance. Thus, it's urgent to find drugs that can fill these gaps, and instead of developing new molecules requiring high financial and time investments, it would be useful to select non-cancer approved drugs that have mechanisms of action that could help in PC treatment, a process known as repurposing drugs.

Thus, the aim of this dissertation is to evaluate whether the antiviral drugs valganciclovir (VGCV) and entecavir (ETV) have anticancer activity in prostate tumor cells, particularly in PC-3 cells. The objective is not only to assess their individual effects but also to test them in combination with the reference chemotherapeutic drug 5-fluorouracil (5-FU). Although 5-FU is not a first-line drug in PC treatment, its efficacy will also be evaluated.

Therefore, after exposing PC-3 cells to the drugs for the selected times, cell morphology was assessed using a microscope, cell viability, proliferation, and cytotoxicity were evaluated using the thiazolyl blue tetrazolium bromide assay (MTT), and finally, the statistical analysis of the obtained data was carried out through the construction of dose-response curves, aiming to obtain the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value for each drug and bar graphs.

It was concluded that VGCV had no activity in PC-3 cells, unlike ETV, which showed significant cytotoxic effects in this cell line, and 5-FU, which, although not as effective as in other tumor types, exhibited a satisfactory performance. Besides this, the IC_{50} of ETV was lower than that obtained for 5-FU. The combination of 5-FU with ETV after 72 hours of exposure is an advantageous association, surpassing the results of each drug alone. Thus, ETV has shown great potential for oncology use, and in addition to PC treatment, it may also be useful in other cancer types. Furthermore, repurposing ETV has proven to be an effective strategy, especially through combination with 5-FU, however, further studies are required.

Keywords: Drug repurposing; Prostate cancer; ETV; VGCV; Combination studies

Índice

Declarações	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
1. Introdução	1
1.1. Caracterização do cancro da próstata	4
1.1.1. Anatomia e fisiologia da próstata.....	4
1.1.2. Dados epidemiológicos.....	5
1.1.3. Fatores de risco e medidas preventivas	6
1.1.4. Sintomatologia	8
1.1.5. Diagnóstico	8
1.1.5.1. Antígeno específico da próstata	9
1.1.5.2. Exame retal digital	10
1.1.5.3. Biópsia prostática	10
1.1.6. Variantes morfológicas	11
1.1.7. Classificação molecular: Mecanismos celulares da carcinogénese prostática	11
1.1.8. Classificação histológica.....	12
1.1.9. Classificação tumor-nódulo-metástase.....	13
1.1.10. Produção de androgénios e sinalização androgénica.....	15
1.1.11. Evolução do cancro da próstata	16
1.1.12. Abordagens terapêuticas do cancro da próstata	17
1.1.12.1. Tratamentos promissores do cancro da próstata	25
1.2. Reaproveitamento de fármacos no cancro da próstata	26
1.2.1. Antidislipídicos	27
1.2.2. Antidiabéticos.....	29
1.2.3. Antiparasitários	31
1.2.4. Antiarrítmicos	32
1.2.5. Anti-inflamatórios	33
1.2.6. Antibacterianos	35
1.2.7. Antivíricos.....	36
1.2.8. Antidepressivos.....	37

1.2.9. Anti-hipertensores	38
1.2.10. Antifúngicos	39
1.2.11. Imunossupressores.....	41
1.2.12. Antipsicóticos	41
1.2.13. Antiepiléticos e anticonvulsivantes	42
1.2.14. Bifosfonatos	43
1.2.15. Medicamentos para o tratamento do alcoolismo	44
1.2.16. Outros	44
1.3. Fármacos em estudo e a sua aplicabilidade em oncologia	46
1.3.1. Fármaco reaproveitado: valganciclovir	46
1.3.1.1. Importância do citomegalovirus	47
1.3.1.2. Inibidor da PARP	48
1.3.2. Fármaco reaproveitado: entecavir	50
1.3.2.1. Elevada barreira genética.....	51
1.3.2.2. Inibidor da PARP	52
1.3.2.3. Entecavir antes do início da quimioterapia.....	53
1.3.2.4. Inibidor da KDM5B como alvo terapêutico	54
1.3.3. Fármaco de referência: fluorouracilo	58
2. Objetivos	59
3. Material e métodos.....	60
3.1. Produtos químicos.....	60
3.2. Linha celular e cultura de células	60
3.3. Plaqueamento das células	60
3.4. Tratamento das células	61
3.5. Avaliação morfológica	62
3.6. Avaliação da viabilidade celular	62
3.7. Análise estatística.....	63
4. Resultados	64
4.1. Citotoxicidade do 5-FU	64
4.2. Citotoxicidade do VGCV.....	67
4.3. Citotoxicidade do ETV	69
4.4. Citotoxicidade das combinações.....	73
5. Discussão dos resultados	76
6. Conclusão	84
7. Referências Bibliográficas.....	86

Índice de figuras

Figura 1: Localização da próstata no sistema reprodutor masculino.	4
Figura 2: Localização anatômica das 4 zonas da próstata.	5
Figura 3: Localização anatômica das 4 zonas da próstata com indicação do ápex, zona média e base.	5
Figura 4: Classificação histológica do adenocarcinoma prostático de acordo com a escala de Gleason.	13
Figura 5: Produção de 95% dos androgénios nos testículos e 5% nas glândulas adrenais do sistema masculino.	15
Figura 6: Processo de reaproveitamento de medicamentos no CP e as suas vantagens.	26
Figura 7: Estrutura química do VGCV.	46
Figura 8: Estrutura química do ETV.	50
Figura 9: Estrutura química do 5-FU.	58
Figura 10: Preparação das diferentes concentrações de cada um dos fármacos estudados.	61
Figura 11: I - Design da placa de 5-FU sozinho e VGCV sozinho em concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μ M (48 horas); II - Design da placa de 5-FU sozinho e ETV sozinho em concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μ M (48 horas); III - Design da placa de IC ₅₀ de 5-FU sozinho (48 horas) e IC ₅₀ de 5-FU de 48 horas em combinação com ETV em concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μ M (48 horas); IV - Design da placa do IC ₅₀ de 5-FU de 48 horas em combinação com ETV em concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μ M e ETV sozinho (uma placa para 24 horas e outra para 72 horas).	62
Figura 12: Resultados referentes a três experiências independentes onde se efetuou a avaliação morfológica de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de 5-FU (0,01-100 μ M) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 μ m.	65
Figura 13: Resultados da viabilidade celular das células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de 5-FU (0,01-100 μ M) durante 48 horas. A viabilidade celular reflete a citotoxicidade do 5-FU e foi determinada com recurso ao ensaio do MTT, sendo que as células controlo foram tratadas com 0,1% de DMSO (veículo). Os resultados são apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=9). * Estatisticamente significativo vs. controlo (veículo) com $p < 0,05$; **** Estatisticamente significativo vs. controlo (veículo) com $p < 0,0001$	66
Figura 14: Resultados do IC ₅₀ e da curva dose-resposta obtida após exposição das células PC-3 a concentrações crescentes de 5-FU (0,01-100 μ M) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A viabilidade celular foi	

determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados foram normalizados e apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=9). 66

Figura 15: (A) Resultados da viabilidade celular de células PC-3 após exposição à concentração de 3,219 μ M de 5-FU (correspondente ao valor de IC₅₀) durante 48 horas. A viabilidade celular reflete a citotoxicidade do 5-FU e foi determinada com recurso ao ensaio do MTT, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). Os resultados são apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=3). **** Estatisticamente significativo vs. controlo (veículo) com $p < 0,0001$. (B) Resultados da avaliação morfológica de células PC-3 após exposição à concentração de 3,219 μ M de 5-FU (correspondente ao valor de IC₅₀) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 μ m. 66

Figura 16: Resultados referentes a duas experiências independentes onde se efetuou a avaliação morfológica de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de VGCV (0,01-100 μ M) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 μ m. 68

Figura 17: Os resultados a verde referem-se ao ensaio 1, enquanto os resultados a azul remetem para o ensaio 2. À esquerda apresentam-se os resultados da viabilidade celular de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de VGCV (0,01-100 μ M) durante 48 horas. A viabilidade celular reflete a inexistência de citotoxicidade provocada pelo VGCV e foi determinada com recurso ao ensaio do MTT, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). Os resultados são apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=3 e n=3). À direita é possível observar as respetivas curvas dose-resposta obtidas após exposição das células PC-3 a concentrações crescentes de VGCV (0,01-100 μ M) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). Não foi possível calcular o IC₅₀ do VGCV, embora a viabilidade celular tenha sido determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados foram normalizados e apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=3 e n=3). 69

Figura 18: Resultados referentes a três experiências independentes onde se efetuou a avaliação morfológica de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de ETV (0,01-100 μ M) durante 24 horas (primeira coluna), 48 horas (segunda coluna) e 72 horas (terceira coluna), sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 μ m. 70

Figura 19: Resultados da viabilidade celular de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de ETV (0,01-100 μ M) durante 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). A viabilidade celular reflete a citotoxicidade do ETV e foi determinada com recurso ao ensaio do MTT, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). Os resultados são apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=3 para 24, 48 e 72 horas). 71

Figura 20: Resultados do IC₅₀ e das curvas dose-resposta obtida após exposição das células PC-3 a concentrações crescentes de ETV (0,01-100 µM) durante 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C), sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A viabilidade celular foi determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados foram normalizados e apresentados através da média ± desvio padrão (n=3 para 24, 48 e 72 horas). .. 72

Figura 21: Resultados referentes a três experiências independentes onde se efetuou a avaliação morfológica de células PC-3 após exposição à combinação do valor do IC₅₀ do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 µM) com concentrações crescentes de ETV (0,01-100 µM) adicionados ao mesmo tempo e avaliados após um período de 24 horas (primeira coluna), 48 horas (segunda coluna) e 72 horas (terceira coluna), sendo as células controlo tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 µm. 74

Figura 22: Resultados que demonstram os efeitos citotóxicos na linha celular PC-3 após exposição à combinação do valor do IC₅₀ do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 µM) com concentrações crescentes de ETV (0,01-100 µM) adicionados ao mesmo tempo e avaliados após um período de 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). As células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo), a viabilidade celular foi determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados são apresentados através da média ± desvio padrão (n = 3 para 24, 48 e 72 horas). 75

Figura 23: Resultados que demonstram os efeitos citotóxicos na linha celular PC-3 após exposição à combinação do valor do IC₅₀ do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 µM) com 50 µM de ETV adicionados ao mesmo tempo e avaliados após um período de 24 horas (cinzento-claro), 48 horas (branco) e 72 horas (cinzento-escuro), comparativamente com 50 µM de ETV e com o IC₅₀ do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 µM). As células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo), a viabilidade celular foi determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados são apresentados através da média ± desvio padrão (n = 3 para 24, 48 e 72 horas). 76

Índice de tabelas

Tabela 1: Descrição dos fatores de risco associados ao CP.....	7
Tabela 2: Sintomatologia do trato urinário inferior que pode desencadear suspeita clínica de CP. .	8
Tabela 3: Relação entre a faixa etária e os níveis normais de PSA sérico total em ng/mL.	9
Tabela 4: Situações e fatores que interferem com os níveis séricos do PSA.	10
Tabela 5: Sistema de classificação TNM para o CP.....	14
Tabela 6: Resumo dos tratamentos de primeira-linha no tratamento do CP.....	19
Tabela 7: Propriedades farmacocinéticas do VGCV.	46
Tabela 8: Propriedades farmacocinéticas do ETV.....	51
Tabela 9: Importância da KDM5B no processo tumoral.	55
Tabela 10: Propriedades farmacocinéticas do 5-FU.....	59

Lista de abreviaturas

17HSD10	17- β -hidroxiesteroide desidrogenase 10
3D-CRT	Radioterapia conformacional 3D
5-FU	5-Fluorouracilo
ACC	Acetil-CoA-carboxilase
ACTH	Hormona adenocorticotrópica
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
Akt	Proteína cinase B
AMPK	Proteína cinase ativada pela adenosina monofosfato
BER	Base excision repair
CDK	Cinase dependente de ciclina
CMT	Chemically modified tetracycline
COX	Cicloxigenase
CP	Cancro da próstata
DDCD	Dose diária cumulativa definida
DDR	DNA damage response
DHT	Di-hidrotestosterona
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRE	Exame retal digital
DSB	Double-strand DNA damage breaks
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ET-1	Endotelina-1
ETS	Erythroblast transformation-specific transcription factors
ETV	Entecavir

FBS	Soro bovino fetal
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Recetores do fator de crescimento de fibroblastos
FSH	Hormona folículo-estimulante
GGPP	Geranilgeranil-pirofosfato
GLUT1	Transportadores de glucose-1
GM-CSF	Fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos
GnRH	Hormona libertadora da gonadotrofina
GPCRs	Recetores acoplados à proteína G
H3K4	Lisina 4 da histona 3
HBC	Hepatite B crónica
HBP	Hiperplasia benigna da próstata
HIF-1 α	Fator de transcrição induzido pela hipoxia
HIFU	High-intensity focused ultrasound
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A
HSP	Heat-shock proteins
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMC	Índice de massa corporal
IMRT	Radioterapia de intensidade modulada
iPARP	Inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase
KDM5	Desmetilases específicas da histona lisina
KDM5B	Desmetilase 5B específica da lisina
LDHA	Lactato desidrogenase-A
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona libertadora da hormona luteinizante
MAO-A	Monoamina oxidase-A

MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MDR	Multidrug resistance
mTOR	Proteína alvo da rapamicina nos mamíferos
MTT	Brometo de tiazolil azul de tetrazólio
MTX	Metotrexato
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NHEJ	Non-homologous end joining
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAP	Fosfatase ácida prostática
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Prostate cancer
PCNA	Antigénio nuclear de proliferação celular
PD-1	Proteína de morte celular programada-1
PD-L	Ligando da proteína de morte celular programada
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKM2	Piruvato quinase M2
PPARα	Recetor ativador da proliferação dos peroxissomas alfa
PSA	Antigénio específico da próstata
PSMA	Antigénio de membrana específico da próstata
RA	Recetores androgénicos
RANK	Recetor ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL	Ligando do recetor ativador do fator nuclear kappa-B
Rb	Proteína do retinoblastoma
RH	Recombinação homóloga

RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
SSB	Single-strand breaks
TAZ	Tafazzin
TCTP	Proteína tumoral controlada por tradução
TGF β	Fator de transformação do crescimento β
TNF	Fator de necrose tumoral
TNM	Tumor-nódulo-metástase
VGCV	Valganciclovir
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
YAP	Proteína associada ao yes

1. Introdução

Mundialmente, o cancro é um dos grandes problemas de saúde pública que, no fundo, consiste num crescimento desmesurado de células que pode ter início em quase todos os órgãos ou tecidos do corpo e que inclusivamente tem capacidade para invadir outros órgãos (1,2). De uma maneira geral, o cancro do pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são as neoplasias mais frequentes nos indivíduos do sexo masculino, enquanto nas mulheres se destaca o cancro da mama, colorretal, pulmão, colo do útero e tireoide (2).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), dados de 2018 demonstram que o cancro é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, tendo causado aproximadamente 9,6 milhões de mortes neste ano (2). Contudo, as taxas de mortalidade associadas ao cancro têm vindo a diminuir desde 1991, o que provavelmente se deverá à redução dos hábitos tabágicos, à adesão das populações a rastreios e aos tratamentos inovadores que continuam a surgir (1).

De facto, os fatores de risco para o desenvolvimento tumoral são bem conhecidos, designadamente a idade, predisposição genética, etnia, exposição ambiental a substâncias carcinogénicas, estilos de vida pouco saudáveis, determinadas infeções, entre outros (3). Do mesmo modo, também são notórias as vantagens de obter um diagnóstico o mais cedo possível, nomeadamente para conseguir melhores resultados no tratamento que se seguirá. Ou seja, quanto mais tardio for o início do tratamento oncológico menor a probabilidade de sobrevivência, maior a possibilidade de desenvolvimento de complicações associadas ao tratamento e os cuidados que são necessários prestar serão mais dispendiosos (4). Assim sendo, os meios de diagnóstico incluem, na esmagadora maioria das vezes, exames físicos, testes laboratoriais, estudos de imagem e biópsias (5).

Relativamente aos tratamentos standard para o tratamento do cancro, destacam-se a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, hormonoterapia, terapia dirigida, entre outras opções, sendo que o tratamento deve ser selecionado em função das características do doente e da doença (5). Porém, algumas destas terapias apresentam lacunas, nomeadamente a ocorrência de intensos efeitos secundários no doente e o desenvolvimento de resistências à terapêutica (6–11). Portanto, torna-se pertinente encontrar fármacos que possam colmatar estas falhas e, em vez de desenvolver novas moléculas, é de toda a pertinência selecionar fármacos já comercializados com outra indicação terapêutica, mas que possuam mecanismos de ação que auxiliem no tratamento do cancro. Assim, nos últimos anos surgiu o conceito de “fármacos reaproveitados” que tem origem no termo inglês “drug repurposing”, também designado de “drug repositioning”, “drug reprofiling”, “drug retasking” ou “drug recycling” e que consiste na identificação e

desenvolvimento de novas indicações terapêuticas para medicamentos já existentes, ou seja, pretende-se que estes fármacos sejam utilizados em patologias diferentes daquelas para as quais já têm uma aprovação, minimizando o desenvolvimento de novos medicamentos e utilizando as moléculas que já são previamente conhecidas e estudadas. Portanto, o objetivo da extrapolação do reaproveitamento de fármacos para a área da oncologia prende-se com a identificação de fármacos cuja aprovação original não seja antineoplásica mas que apresentem atividade anticancerígena e que, em monoterapia ou quando combinados com um fármaco antineoplásico, apresentem efeito terapêutico no tratamento do cancro, tendo em conta que estes medicamentos não devem ter efeitos secundários nefastos para o doente (9–13)

Deste modo, o reaproveitamento de fármacos apresenta inúmeras vantagens, nomeadamente, a celeridade do processo, visto que se trata de medicamentos que já se encontram massivamente estudados e sobre os quais já existe bastante informação disponível, nomeadamente ao nível da segurança, farmacovigilância, toxicidade e dos efeitos adversos, doses terapêuticas e aspetos posológicos, alvos moleculares, mecanismos de ação, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e questões relacionadas com os métodos de produção e de fabrico, o que para além de rentabilizar o tempo da investigação também diminui o investimento financeiro em ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos de fase I e II. Por outro lado, a literatura refere que a maioria dos fármacos reaproveitados são bem tolerados quando administrados por via oral e, outra das vantagens, relaciona-se com a disponibilidade generalizada destes fármacos sendo que, muitos deles, incluem a lista de medicamentos essenciais da OMS e outros já dispõem de medicamentos genéricos comercializados, tornando-se financeiramente mais acessíveis para o público-alvo, o que permite que estes fármacos reaproveitados cheguem a um maior número de pessoas (9–11,13). Assim, reduzem-se os custos associados à investigação destes fármacos e o tempo necessário para que a nova indicação terapêutica seja aprovada pelas agências reguladoras do medicamento é também muito menor (11,12).

Por outro lado, a bibliografia refere que a utilização de terapias farmacológicas combinadas de dois ou três fármacos com mecanismos de ação e vias de sinalização distintas pode ser benéfica, pois desencadeiam um efeito sinérgico que permite diminuir as concentrações individuais dos vários fármacos utilizados, otimizar a terapêutica, aumentar a taxa de sucesso e minimizar/retardar a resistência do organismo aos medicamentos. Assim, no caso do uso combinado de fármacos pode ser utilizado um medicamento quimioterápico com um ou mais medicamentos reaproveitados, e particularmente no cancro da próstata (CP), como se verá mais adiante, têm surgido na literatura diversos fármacos que parecem ser potenciais candidatos para serem reaproveitados e utilizados

em combinação, apresentando a vantagem de poderem ser utilizados noutros tipos de cancros, visto que diferentes tumores podem apresentar as mesmas vias de sinalização (9,14,15).

Em suma, nos últimos anos tem-se verificado um aumento da pesquisa de fármacos reaproveitados em diversas patologias, nomeadamente na oncologia, área em que existe particular interesse neste tema, não só devido aos efeitos secundários significativos que estão associados à maioria dos fármacos antineoplásicos e que têm grande impacto na qualidade de vida dos doentes oncológicos, mas também para tentar aumentar a sobrevida dos doentes e minimizar as resistências aos tratamentos standard (9–11).

1.1. Caracterização do cancro da próstata

1.1.1. Anatomia e fisiologia da próstata

A próstata é a maior glândula acessória do sistema reprodutor masculino, localizando-se atrás da face posterior da sínfise púbica, abaixo da bexiga e em frente ao reto, envolvendo a uretra prostática e os dois canais ejaculadores (Figura 1). Relativamente à sua forma e tamanho, assemelha-se a uma noz, tendo geralmente 4 centímetros de comprimento, 2 centímetros de largura e 20 gramas de massa. Em termos funcionais, é responsável pela produção de parte do fluido seminal (16–18).

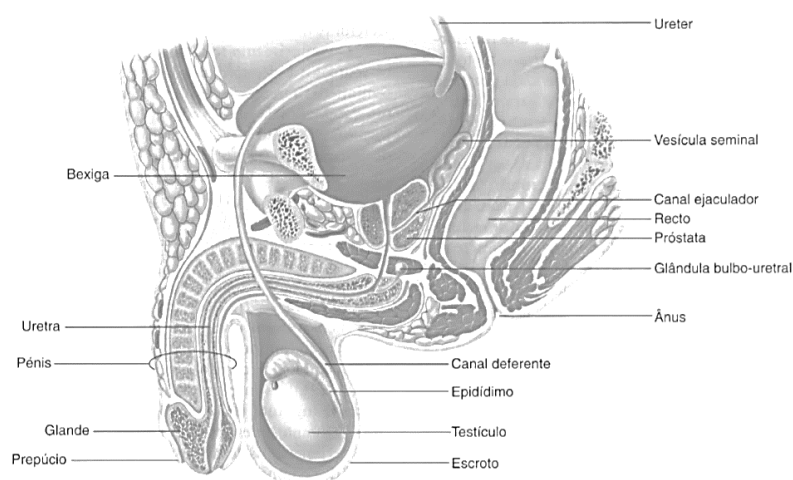


Figura 1: Localização da próstata no sistema reprodutor masculino.

Retirado de: Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Sistema Reprodutor. In: Lange MJ, editor. Anatomia & Fisiologia, 6ª Edição. Lisboa: Lusociência-Edições técnicas e científicas, Lda; 2003. p. 1027–44.

Assim sendo, a próstata subdivide-se na zona central, zona de transição, zona periférica e estroma fibromuscular anterior, sendo também possível distinguir o ápex, a zona média e a base (Figura 2 e Figura 3) (16,18,19). Relativamente à zona periférica, esta representa cerca de 70% do tecido glandular e inicia-se no ápex ocupando a zona da superfície posterior, sendo a maior das 4 zonas identificadas e a mais afetada por carcinomas, prostatites e atrofias (16,18). Já a zona central é uma estrutura em forma de cone localizada na base da próstata, entre as zonas periférica e de transição, constituída por aproximadamente 25% de tecido glandular. Por sua vez, a zona de transição é composta por dois lóbulos de tecido glandular que representam os restantes 5% deste tecido e que envolvem a uretra prostática, sendo esta a área que aumenta de volume em situações de hiperplasia benigna da próstata (HBP) (16). Por fim, a zona do estroma fibromuscular anterior localiza-se na superfície externa anterior, desde o ápex até à base da próstata e é constituída por tecido muscular, sendo desprovida de tecido glandular, contudo também é uma área suscetível ao CP. O estroma fibromuscular anterior estende-

se lateralmente, dando origem a uma estrutura fibrosa que reveste a próstata, designada de cápsula (16).

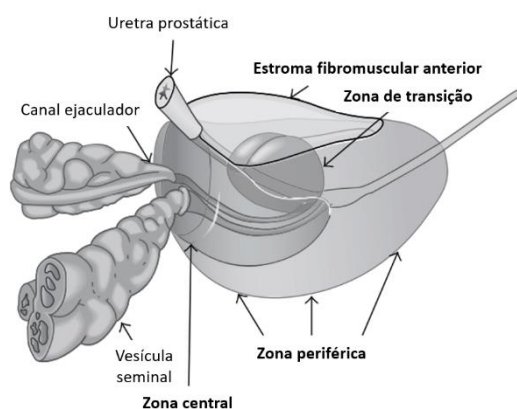


Figura 2: Localização anômica das 4 zonas da próstata.

Adaptado de: Bhavsar A, Verma S. Anatomic Imaging of the Prostate. Biomed Res Int. 2014;2014:728539.

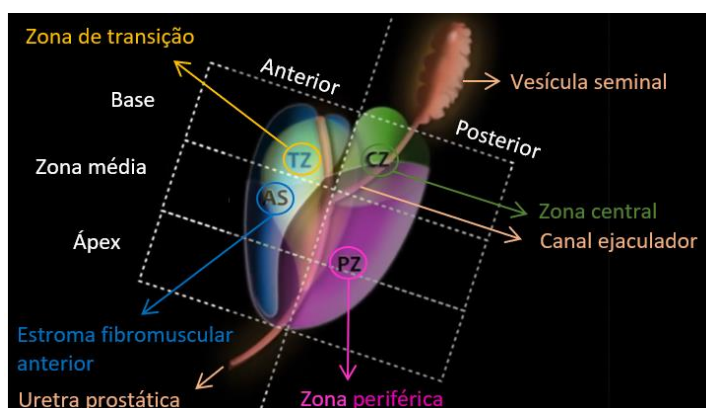


Figura 3: Localização anômica das 4 zonas da próstata com indicação do ápex, zona média e base.

Adaptado de: Prostate Anatomy [Internet]. [cited 2022 Mar 1]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=cWTJsJFhjA4&feature=youtu.be>

1.1.2. Dados epidemiológicos

Mundialmente, o CP é a segunda neoplasia maligna mais frequente nos indivíduos do sexo masculino e a quinta causa de morte mais comum neste grupo, tendo apresentado em 2020 uma incidência mundial de 1.414.259 novos casos (20). Deste modo, a incidência do CP está diretamente relacionada com a idade dos indivíduos, sendo que nos homens com mais de 65 anos verifica-se uma taxa de incidência de aproximadamente 60% (21). No entanto, as taxas de incidência e de prevalência do CP são bastante variáveis entre as diversas regiões do globo, sendo que os países desenvolvidos apresentam taxas mais elevadas quando comparados com os países em desenvolvimento, possivelmente devido à dificuldade de acesso aos meios de diagnóstico por parte destes últimos (21).

Ainda em 2020, a taxa de mortalidade internacional devida ao CP era de 3,8%, representando mais de 375 mil mortes em todo o mundo, sendo que os padrões de mortalidade diferem dos padrões de incidência, visto que as maiores taxas de mortalidade se verificam em países em desenvolvimento (20). Além disto, tem-se vindo a constatar uma diminuição das taxas de mortalidade na América do Norte e na Europa Ocidental e do Norte, possivelmente devido ao diagnóstico e tratamento precoces. Sabe-se ainda que a taxa de mortalidade também aumenta com a idade, observando-se que aproximadamente 55% dos falecimentos ocorreram após os 65 anos (21).

Portanto, é estimado que ocorra um aumento do número de CP diagnosticados, supondo-se que a maioria vá ocorrer principalmente em África, na América Latina e na Ásia, visto que se prevê uma maior facilidade de acesso destas populações a cuidados médicos especializados, uma globalização dos meios de diagnóstico e, consequentemente, o aumento da esperança média de vida. Estima-se ainda que até 2040 a taxa de mortalidade mundial desta neoplasia duplique, todavia a Europa será o continente que registrará as menores taxas de incidência e de mortalidade (21).

Em termos demográficos, as taxas de incidência e de mortalidade são mais elevadas nos indivíduos afro-americanos, sendo que este grupo étnico está também associado a CP mais agressivos. Assim sendo, a literatura indica que isto poderá estar relacionado com uma possível suscetibilidade genética para o aparecimento do CP, dado que nestes indivíduos existe um aumento dos níveis da enzima 5 α -reductase que, como se verá mais adiante, resulta num aumento da di-hidrotestosterona (DHT), sendo que esta mutação tem sido associada a CP mais agressivos e de início precoce (21,22).

1.1.3. Fatores de risco e medidas preventivas

O risco de aparecimento de CP aumenta significativamente em indivíduos de idade avançada, de etnia afro-americana e com historial familiar desta patologia, sendo estes os três principais fatores de risco, contudo existem outros, tais como a obesidade, dieta, sedentarismo e fatores ambientais, que têm menos impacto no aparecimento da doença, mas devem ser evitados na medida do possível (Tabela 1) (21,23). Porém, existem algumas medidas preventivas que podem retardar o aparecimento do CP, nomeadamente a adoção de um estilo de vida saudável e de uma dieta rica em frutas, vegetais e compostos antioxidantes, minimizando o consumo de gorduras animais saturadas e carnes vermelhas. Por exemplo, o tomate é conhecido por ser rico em licopeno, que atua nos recetores androgénicos (RA) revertendo os efeitos da DHT, e pelas suas propriedades antioxidantes que previnem o CP (21,23).

Tabela 1: Descrição dos fatores de risco associados ao CP.

Fatores de risco	Descrição			Referências bibliográficas
Idade avançada	O CP é a neoplasia maligna mais frequente nos homens idosos e cerca de 30% dos indivíduos que morrem por causas não oncológicas, com mais de 50 anos, apresentam evidências histológicas de CP; risco elevado para homens de raça negra e/ou com historial familiar de CP com idade superior a 40 anos ou para homens de raça caucasiana e/ou sem historial familiar com idade superior a 50 anos			(21,23,24)
Etnia	A taxa de incidência do CP é superior nos homens afro-americanos, o que pode dever-se a fatores biológicos ou socioeconómicos, estando também associados a CP mais agressivos e a níveis de antígeno específico da próstata (PSA) significativamente mais elevados quando comparados com indivíduos de outras etnias, tendo também uma variação cromossómica associada ao CP			
Genética / Hereditariedade	Aproximadamente 20% dos indivíduos com CP apresentam historial familiar desta patologia; o CP pode desencadear-se por questões genéticas, mas também devido a padrões comuns de estilos de vida e de exposição a agentes carcinogénicos; diversos genes, tais como o BRCA1 e BRCA2 parecem estar envolvidos no aparecimento e na agressividade do CP			
Dieta	As dietas dos países desenvolvidos são mais propícias ao surgimento do CP do que as dos países orientais e em desenvolvimento			
	Alimentos prejudiciais	Carnes vermelhas e gorduras animais saturadas	A ingestão de 5 ou mais porções de carne processada por semana aumenta o risco de CP; cozinhar a carne a temperaturas entre os 125 - 300°C ou grelhar, promove a formação de compostos mutagénicos; verifica-se um aumento dos níveis de androgénios, espécies reativas de oxigénio, leucotrienos e prostaglandinas que aceleram a proliferação tumoral e a peroxidação lipídica	
		Laticínios e cálcio	Ingestão superior a 2000 mg/dia está associada a um risco elevado de CP	
		Bebidas alcoólicas	Ingestão ≥ 15 g de etanol/dia é um fator de risco para o CP e para outras neoplasias	
Déficé de vitaminas e minerais	O déficé de vitamina D pode aumentar o risco de CP, sendo que indivíduos que habitam em países com maior exposição solar apresentam menor risco de desenvolver CP, no entanto, os indivíduos de raça negra apresentam um risco superior pois, possivelmente a melanina da pele bloqueia a radiação UV; o déficé em vitamina E e selénio também pode aumentar o risco de CP			
Obesidade e sedentarismo	A obesidade e o índice de massa corporal (IMC) elevado estão associados a CP mais agressivos, pois estes indivíduos apresentam níveis superiores de hormonas circulantes; a obesidade e o sedentarismo provocam resistência à insulina e os elevados níveis séricos de insulina estimulam o crescimento e a proliferação celular; o tecido adiposo está associado a processos inflamatórios; os obesos têm um elevado volume plasmático, dificultando a interpretação dos resultados do PSA			
Tabagismo	O fumo do tabaco é um agente carcinogénico; os fumadores do sexo masculino normalmente têm elevados níveis de hormonas sexuais circulantes, o que pode desencadear ou agravar o CP			
Hormonas	Os androgénios podem influenciar o aparecimento e progressão do CP, enquanto a sua privação é associada à recessão tumoral			
Inflamação	A inflamação crónica está diretamente implicada na progressão do cancro, sendo que indivíduos com prostatites ou infeções sexualmente transmissíveis têm maior probabilidade desenvolver CP			
Compostos químicos	Exposição a herbicidas, inseticidas e bisfenol A			
Frequência ejacutória	A baixa frequência ejacutória leva à acumulação de fluídos prostáticos que pode ser potencialmente carcinogénica			

1.1.4. Sintomatologia

No estadio inicial da doença, o CP pode ser assintomático ou manifestar-se através de sintomas do trato urinário inferior (Tabela 2), nomeadamente nictúria, dificuldade de micção e o aumento da sua frequência. Em casos mais avançados da patologia, os sintomas incluem a retenção urinária, disfunção erétil, hematúria macroscópica e, em situações de metástases ósseas, podem surgir dores ósseas (21,24).

A ausência de sintomas ou o facto dos sintomas do trato urinário inferior serem pouco específicos e estarem associados ao envelhecimento masculino, culminam num número significativo de mortes com CP não diagnosticado - resultados de autópsias indicam que $\frac{3}{4}$ dos homens com idade superior a 85 anos apresentavam neoplasias prostáticas (24). Para além disto, os sintomas do CP, HBP e prostatite são bastante idênticos, impossibilitando a sua distinção e o diagnóstico baseado exclusivamente na sintomatologia, destacando-se a necessidade dos meios e técnicas de diagnóstico (24).

Tabela 2: Sintomatologia do trato urinário inferior que pode desencadear suspeita clínica de CP.
Adaptado de: Merriel SWD, Funston G, Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. Adv Ther. 2018;35:1285–94.

Classe da sintomatologia	Sintomas do trato urinário inferior	Referências bibliográficas
Esvaziamento vesical	Baixo fluxo urinário	(24)
	Fluxo urinário intermitente/interrompido	
	Esforço	
	Hesitação	
	Gotejamento	
Armazenamento vesical	Urgência de micção	
	Elevada frequência de micção	
	Nictúria	
	Incontinência urinária	
Estado pós-miccional	Gotejamento pós-miccional	
	Sensação de esvaziamento incompleto	

1.1.5. Diagnóstico

O diagnóstico precoce do CP é fundamental para aumentar as taxas de sucesso do tratamento, no entanto, devido à sintomatologia pouco específica, por vezes, torna-se difícil diagnosticar esta patologia na sua fase inicial. Os meios de diagnóstico desta neoplasia incluem o exame retal digital (DRE) e a avaliação dos níveis plasmáticos do PSA, que são também utilizados como métodos de rastreio, e a biópsia prostática que permite a confirmação da existência do cancro (21,25,26).

1.1.5.1. Antígeno específico da próstata

O PSA é a proteína responsável por liquefazer o sêmen após a ejaculação, ou seja, o sêmen é constituído por espermatozoides e por secreções das diversas glândulas sexuais masculinas e após a ejaculação coagula, impedindo a mobilidade dos espermatozoides que permanecem no coágulo constituído por várias proteínas. Portanto, o PSA tem a capacidade de hidrolisar estas proteínas, liquefazendo o sêmen e permitindo a libertação dos espermatozoides (21,23,27).

Deste modo, sabe-se que o CP leva ao aumento dos níveis séricos de PSA, não só devido ao aumento do volume da próstata, mas também devido às alterações do epitélio glandular e aos danos nas vias secretoras dos canais prostáticos que levam à libertação de PSA para o espaço extracelular e para a circulação sanguínea (25,27). Porém, o PSA é produzido tanto pelas células prostáticas epiteliais malignas, como não malignas, sendo expresso pelo tecido da próstata e, para além do CP, o PSA pode estar elevado em patologias benignas, como HBP ou prostatites, logo pode ser utilizado tanto para o diagnóstico de doenças prostáticas benignas como malignas, dado que o seu aumento não é uma característica exclusiva do CP, porém foi o primeiro biomarcador do CP a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) (21,23,25,27).

Uma vez que a idade se relaciona com o aumento do volume da próstata e, consequentemente, com a elevação dos níveis do PSA, estabeleceram-se valores de referência indicativos da possibilidade de CP (Tabela 3) (26,27).

Tabela 3: Relação entre a faixa etária e os níveis normais de PSA sérico total em ng/mL.
Adaptado de: Pérez-Ibave DC, Burciaga-Flores CH, Elizondo-Riojas MÁ. Prostate-specific antigen (PSA) as a possible biomarker in non-prostatic cancer: A review. Cancer Epidemiol. 2018;54:48–55.

Faixa etária masculina (anos)	Concentração sérica total de PSA (ng/mL)	Referências bibliográficas
40 - 49	0 - 2,5	(27)
50 - 59	0 - 3,5	
60 - 69	0 - 4,5	
70 - 79	0 - 6,5	

Contudo, para além da idade, a concentração de PSA também pode ser influenciada por outros fatores, tais como a etnia, IMC, ingestão de medicamentos, exames de avaliação prostática, ejaculação e retenção urinária. Além disto, a literatura indica que o PSA também poderá ser expresso por tecidos não-prostáticos, nomeadamente pela mama, ovário, pulmão, pâncreas, cólon, rim e fígado, podendo inclusivamente ser expresso por indivíduos do sexo feminino, tornando-se assim um biomarcador pouco específico para diagnosticar o CP, devendo ser analisado criteriosamente (Tabela 4) (27).

Tabela 4: Situações e fatores que interferem com os níveis séricos do PSA.

Variação do PSA	Situação/Fator	Referências bibliográficas
Aumento dos níveis de PSA	Cancro da próstata	(27)
	Doenças prostáticas benignas	
	Retenção urinária aguda	
	Ejaculação nas 48 horas anteriores	
	Idade avançada (devido ao aumento do volume da próstata)	
	Biópsia prostática	
	Toque retal	
	Produção por tecidos não prostáticos	
Diminuição dos níveis de PSA	Etnia indiana	
	IMC elevado	
	Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), estatinas e tiazidas	

Mediante a concentração sérica total de PSA obtida pode ser pertinente analisar a velocidade do PSA (determina o número de vezes que o PSA total se eleva num dado período de tempo, sendo que valores acima de 0,75 ng/mL por ano conduzem a uma suspeita elevada de CP), a densidade do PSA (calculada dividindo a concentração sérica total de PSA pelo volume da próstata, sendo este último obtido através de ecografia), assim como a percentagem de PSA livre. Contudo, a determinação da concentração total de PSA sérico evita biópsias prostáticas desnecessárias, sendo considerado o melhor biomarcador tumoral atualmente disponível e o meio de diagnóstico de primeira linha juntamente com o DRE, destacando-se a necessidade de encontrar biomarcadores pouco invasivos, mais específicos, sensíveis e precoces (26,27).

1.1.5.2. Exame retal digital

O DRE permite detetar anomalias no volume e consistência da próstata, nomeadamente edemas, massas e pontos moles ou duros e, dado que a grande maioria das neoplasias ocorrem na zona periférica posterior da próstata, torna-se possível detetar este tipo de irregularidades com este exame, contudo é necessário que a próstata apresente um volume significativamente aumentado para que se consiga palpar. Geralmente o CP apresenta-se duro, com nódulos e irregularidades (23,25).

1.1.5.3. Biópsia prostática

Perante resultados suspeitos do PSA e do DRE, torna-se necessário realizar uma biópsia prostática para confirmar a existência de CP. Neste exame de diagnóstico são colhidas um conjunto de amostras de tecido da próstata que serão analisadas do ponto de vista histológico e que permitirão classificar o tipo de CP em questão (1,17,18). Inicialmente a biópsia prostática era realizada pela via transretal, podendo ser guiada por ecografia, o

que constituía um procedimento pouco preciso, com elevado risco de sepsis, hemorragias, infeções, disfunção erétil e incontinência urinária, sendo que em tumores pequenos a taxa de deteção era de apenas 30%, verificando-se a dificuldade de acesso à região anterior da próstata. Porém, nos últimos anos, foi desenvolvida a biópsia prostática com fusão de imagem que consiste numa biópsia dirigida por ecografia em tempo real e ressonância magnética multiparamétrica e que permite sobrepor ambas as imagens, detetando as áreas suspeitas com maior facilidade, rigor e precisão, para além de ser realizada pela via transperineal, o que minimiza a probabilidade de lesões e infeções (11,17,18).

1.1.6. Variantes morfológicas

O adenocarcinoma da próstata é o tipo de CP mais frequente, constituindo cerca de 95% dos CP. Dentro dos adenocarcinomas, destacam-se os adenocarcinomas ductais e os adenocarcinomas acinares, sendo que os adenocarcinomas acinares representam mais de 90% dos adenocarcinomas prostáticos, enquanto que os adenocarcinomas ductais, apesar de menos frequentes, parecem ser mais agressivos (13,28,29). Tanto os adenocarcinomas ductais como os acinares são caracterizados por níveis de PSA sérico elevados, embora os ductais surjam maioritariamente nos ductos prostáticos periuretrais primários e os adenocarcinomas acinares surjam noutros ductos prostáticos periuretrais. Para além disto, a maioria dos adenocarcinomas ductais encontra-se em associação com componentes acinares, sendo raro encontrar adenocarcinomas totalmente ductais (30,31). Dentro dos adenocarcinomas acinares existem diversas variantes, tais como o adenocarcinoma acinar atrófico, pseudo-hiperplásico, microcístico, de células espumosas, mucinoso, de células em anel de sinete, de células gigantes pleomórficas e sarcomatoide. Os adenocarcinomas acinares apresentam células cubóides dispostas em ácinos, enquanto que nos adenocarcinomas ductais se destacam os padrões papilares, cribriformes ou sólidos (28–34). Para além dos adenocarcinomas prostáticos estão identificadas diversas variantes de CP, ainda que com menor expressão, como é o caso dos tumores neuroendócrinos, de células escamosas, mesenquimais (sarcomas), hematolinfóides (linfomas), entre muitos outros (28,32,33).

1.1.7. Classificação molecular: Mecanismos celulares da carcinogénese prostática

Os subtipos moleculares do CP baseiam-se nos genes que as células neoplásicas expressam, ou seja, o CP é influenciado por diversos fatores, incluindo alterações genómicas que estão relacionadas com o subtipo de CP que se virá a desenvolver. Em

última instância, a evolução para um CP metastático depende da evolução destas alterações genómicas, em particular do seu número, gravidade e complexidade (35).

Portanto, o CP está associado a inúmeras alterações genómicas dentro das quais se destacam as que envolvem os fatores de transcrição específicos da transformação de eritroblastos, do inglês erythroblast transformation-specific transcription factors (ETS), sendo designadas de ETS positivas, onde se incluem o ERG, ETV1, ETV4, ETV5 e FLI1. Todavia, os ETS podem sofrer rearranjos com outros genes, dando origem, por exemplo, ao TMPRSS2-ERG que também está fortemente envolvido no desenvolvimento do CP (35,36). Porém, também existem os CP classificados como ETS negativos, que apresentam mutações noutro tipo de genes, como o SPOP, FOXA1, IDH1 e CHD1, verificando-se a sobreexpressão do gene SPINK1 (35,37).

Já o P53 é um fator de transcrição que regula o ciclo celular e a apoptose, prevenindo o aparecimento de diversos tumores, sendo que o TP53 é o gene que codifica a proteína P53. Assim sendo, sabe-se que o TP53 surge frequentemente mutado em diversos cancros, incluindo o CP. Tal como o TP53, também o gene de supressão tumoral PTEN pode apresentar mutações (36). Por outro lado, existem genes que estão diretamente ligados à reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA) que são muitas vezes mutados, como é o caso do BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, ATR, CDK12 e MSH2, o que leva a uma maior propensão para a progressão do CP (35,36). Além das mutações apresentadas anteriormente, a via de sinalização Wnt que está envolvida na proliferação e na homeostasia celular também é frequentemente afetada com alterações genómicas que estão envolvidas no CP (36).

Para além das alterações genéticas, também as alterações epigenéticas e transcriptómicas estão envolvidas no CP. Como exemplo das alterações epigenéticas, salientam-se as alterações hereditárias que têm capacidade para alterar a expressão dos genes, como é o caso das alterações na metilação do DNA. No que concerne às alterações transcriptómicas, percebeu-se que podem estar associadas a CP mais agressivos, nomeadamente à sobreexpressão do gene SCHLAP1 (36).

1.1.8. Classificação histológica

A classificação histológica dos adenocarcinomas da próstata é obtida através da escala de Gleason que avalia o grau de diferenciação tumoral, verificando-se uma correlação entre o grau histológico e a gravidade do tumor (18,33). Portanto, após a biópsia prostática ou a prostatectomia, a amostra obtida é analisada histologicamente e os 2 padrões histológicos mais abundantes são classificados de 1 a 5, de acordo com a escala de Gleason, sendo que o grau 1 corresponde a um tumor bem diferenciado (padrão

histológico semelhante ao normal), enquanto que o grau 5 corresponde a um tumor pouco diferenciado (completamente diferente do padrão histológico normal) (Figura 4) (18,33,38).

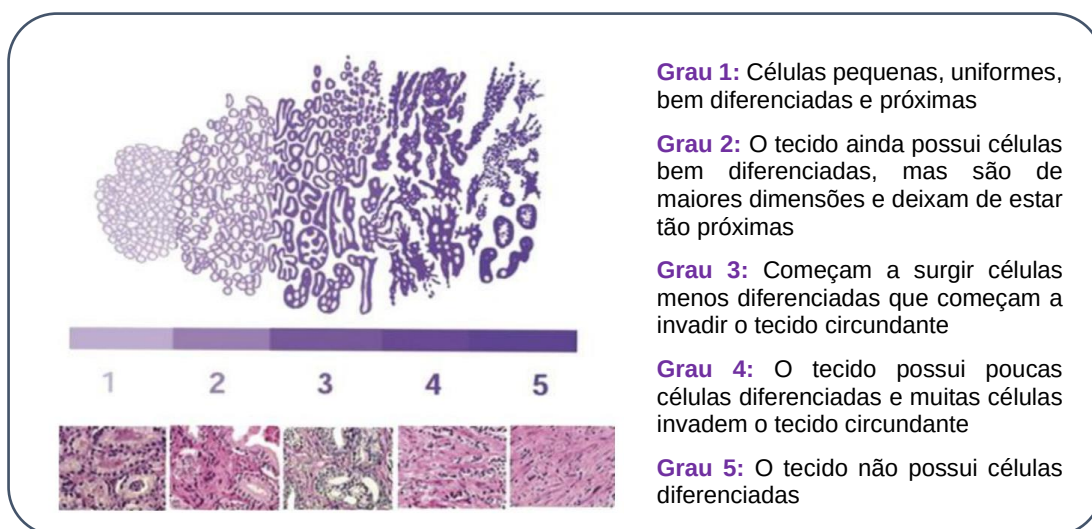


Figura 4: Classificação histológica do adenocarcinoma prostático de acordo com a escala de Gleason.

Adaptado de: Matos T, Martins L, Conduto E, Gomes C, Silva M, Rocha M do C, et al. Os TDT no Cancro da Próstata. News1 TDT. 2015;21:1–19.

Assim sendo, a classificação final da escala de Gleason varia entre 2 (1+1: tumor bem diferenciado) e 10 (5+5: tumor pouco diferenciado), sendo que o primeiro algarismo do somatório se refere ao padrão histológico mais frequente na amostra e o segundo algarismo refere-se ao segundo padrão mais abundante (18,33,38).

Portanto, caso a classificação final seja igual ou inferior a 4, significa que as células estão bem diferenciadas, existindo um bom prognóstico. Em casos de classificação de Gleason compreendida entre 5 e 7, as células encontram-se moderadamente indiferenciadas, tratando-se de um tumor de agressividade intermédia. Com classificação igual ou superior a 8, verifica-se a existência de células muito irregulares e pouco diferenciadas, tratando-se de um tumor agressivo e invasor, com mau prognóstico, maior risco de complicações e metástases (18,33,38).

1.1.9. Classificação tumor-nódulo-metástase

A classificação tumor-nódulo-metástase (TNM) permite definir o estadio dos tumores malignos. Deste modo, o “T” refere-se ao tamanho do tumor primário, o “N” à disseminação para gânglios linfáticos próximos do local de origem do tumor, tais como os gânglios pélvicos e paraaórticos e o “M” à presença de metástases em locais afastados da origem (Tabela 5) (16,38,39).

Tabela 5: Sistema de classificação TNM para o CP.

Adaptado de: Prostate Cancer [Internet]. [cited 2023 Apr 26]. Available from: <https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer/chapter/classification-and-staging-systems>

T - Tumor primário	
TX	Tumor primário não avaliável
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor clinicamente não identificável (por toque rectal ou imagem)
T1a	Tumor incidental: Achado histopatológico ≤ 5% de tecido ressecado
T1b	Tumor incidental: Achado histopatológico > 5% de tecido ressecado
T1c	Tumor diagnosticado por biópsia (PSA elevado)
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor envolve metade de um lobo prostático ou menos
T2b	Tumor envolve mais de metade de um lobo prostático
T2c	Tumor envolve os dois lobos prostáticos
T3	Tumor ultrapassa a cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
T3b	Tumor envolve a vesícula seminal (uma ou ambas)
T4	Tumor fixo ou invade estruturas adjacentes para além das vesículas seminais (reto, bexiga, músculos pélvicos ou esfíncter externo)
N - Nódulos linfáticos regionais	
Nx	Nódulos linfáticos regionais não avaliáveis
N0	Sem metástases nos nódulos linfáticos regionais
N1	Metástases nos nódulos linfáticos regionais
M - Metástases à distância	
Mx	Metástases à distância não avaliáveis
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância
M1a	Metástases em nódulos linfáticos não regionais
M1b	Metástases ósseas
M1c	Metástases noutros órgãos (com ou sem metástases ósseas)

Para efetuar esta classificação recorre-se a exames imagiológicos, sendo que a ressonância magnética permite perceber se o tumor está confinado à próstata ou se já ultrapassou a cápsula prostática e através da cintigrafia óssea e da tomografia computadorizada avalia-se a presença de células neoplásicas nos gânglios linfáticos, ossos ou outros órgãos (26).

Portanto, o CP localizado (grau I e II) ocorre quando o tumor está confinado à próstata, correspondendo a T1 ou T2 sem metástases para linfonodos regionais (N0) e sem metástases à distância (M0). Já o CP localmente avançado (grau III) estende-se para além da cápsula prostática, podendo invadir estruturas adjacentes, mas sem metástases à distância, correspondendo a T3 ou T4, podendo ter ou não metástases em linfonodos regionais (N0 ou N1), mas sem metástases à distância (M0). Relativamente ao CP avançado (grau IV), este caracteriza-se por apresentar metástases à distância (M1), sendo também designado por CP metastático. Assim, os locais de disseminação mais comuns

são o osso e linfonodos não regionais, estando também descritas metástases ao nível do cérebro, fígado e pulmão, entre outros (7,40–42).

1.1.10. Produção de androgénios e sinalização androgénica

De uma maneira geral, o crescimento e a sobrevivência do CP dependem da existência de androgénios, logo importa esclarecer o seu mecanismo de produção e a sua relação com os RA, de forma a perceber como é que estes podem ser bloqueados, visto que este é um dos tipos de tratamento que será abordado mais adiante (22).

Portanto, o hipotálamo liberta a hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH), também designada de hormona libertadora da gonadotrofina (GnRH), que passa pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário para a glândula pituitária e, em resposta à LHRH, a adeno-hipófise segrega as gonadotrofinas que são a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH) (43,44). Posteriormente, a FSH liga-se às células de Sertoli, nos túbulos seminíferos, e estimula a espermatogénese. Já a LH liga-se às células de Leydig, nos testículos, levando à produção e secreção de testosterona. Deste modo, 95% dos androgénios são produzidos nos testículos sob a forma de testosterona. Por outro lado, a adeno-hipófise também segrega a hormona adenocorticotrópica (ACTH) que quando chega às glândulas adrenais estimula a produção e secreção de dehidroepiandrosterona e androstenodiona, que posteriormente no tecido prostático serão convertidas em testosterona, constituindo os restantes 5% de androgénios que são produzidos nas glândulas adrenais (Figura 5) (43,44).

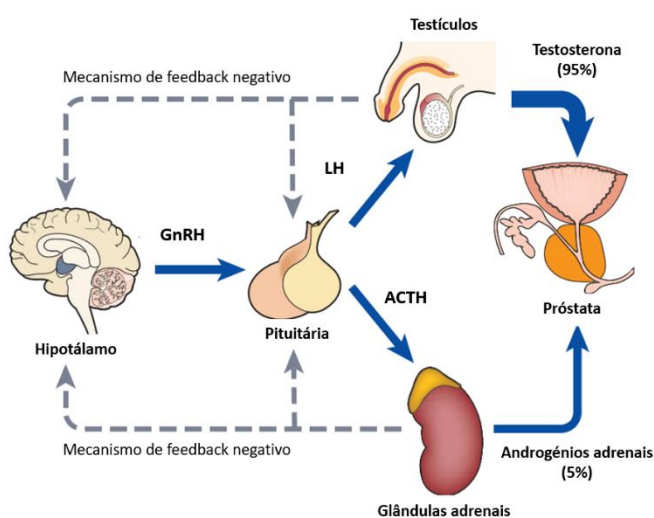


Figura 5: Produção de 95% dos androgénios nos testículos e 5% nas glândulas adrenais do sistema masculino.

Adaptado de: Turner B, Drudge-Coates L. Pharmacological treatment of patients with advanced prostate cancer. 2014;28:44–8.

Em suma, a testosterona tem origem nos testículos e, em menor percentagem, nas glândulas adrenais, sendo que ao chegar ao citoplasma celular, através da ação da enzima 5 α -reductase, é convertida em DHT que apresenta uma afinidade superior para os RA, visto ser um androgénio ainda mais potente (22). Curiosamente, os fármacos inibidores da 5 α -reductase, nomeadamente a finasterida e a dutasterida, são utilizados no tratamento da HBP e, por impedirem a conversão de testosterona em DHT, teoricamente poderiam apresentar efeitos benéficos no tratamento do CP, contudo em 2011 a FDA esclareceu que estes fármacos estão associados a um maior risco de formas mais graves de CP, ou seja, os estudos demonstraram que a administração destes fármacos diminui a incidência de CP, mas mostraram um aumento da incidência de CP mais agressivos (45).

Relativamente aos RA, estes localizam-se no citoplasma celular e estão associados a heat-shock proteins (HSP), mais concretamente à chaperona HSP90. Após a conversão da testosterona em DHT, esta liga-se aos RA, ativando-os e promove diversas alterações conformacionais, entre as quais a dissociação entre os RA e o complexo HSP90. Assim, os RA funcionam como fatores de transcrição e após se ligarem aos androgénios têm capacidade para mediar a ativação ou a repressão da transcrição de determinados genes, influenciando a proliferação das células neoplásicas prostáticas (22,35).

1.1.11. Evolução do cancro da próstata

Importa esclarecer as diferenças entre o CP não metastático hormono-sensível, CP metastático hormono-sensível, CP não metastático resistente à castração e CP metastático resistente à castração. Deste modo, visto que o CP é dependente dos RA e, consequentemente, dos níveis de androgénios circulantes, numa primeira fase, o CP é hormono-sensível e responde à terapia de privação androgénica que será abordada mais adiante. Porém, devido a alterações genómicas e moleculares, o tumor pode evoluir para CP hormono-resistente, também designado de CP resistente à castração, deixando de responder à terapia de privação androgénica, salientando que a terapia de privação androgénica não bloqueia a produção de androgénios adrenais, existindo cerca de 5% de androgénios em circulação. Portanto, de uma maneira geral, o CP localizado pode evoluir para CP metastático e o CP hormono-sensível pode tornar-se resistente à castração num período de 2 a 3 anos após o início da terapia de privação androgénica (22,35).

Sabe-se também que a evolução do tumor para o estado resistente à castração envolve os RA, podendo ocorrer amplificação e hipersensibilidade dos RA, mutações nos RA, mutações de coativadores/corepressores dos RA, ativação dos RA independente de androgénios e a produção de androgénios intratumorais alternativos, onde se destaca a sobreexpressão de algumas enzimas que estão relacionadas com a produção de

androgénios intratumorais, como é o caso da HSD3B1, HSD3B2, HSD17B3, SRD5A1, AKR1C3 e CYP17A1 (22).

Logo, quando o CP evolui de hormono-sensível para resistente à castração, sem que exista evidência imagiológica do aparecimento de metástases, verificando-se uma progressão bioquímica do tumor através do aumento dos níveis séricos do PSA e mantendo os níveis de testosterona sérica inferiores aos níveis de castração (< 50 ng/dL), estamos perante um CP não metastático resistente à castração (22). Já o CP metastático resistente à castração surge devido à evolução do tumor hormono-sensível para resistente à castração, com evidência imagiológica de metástases e níveis de testosterona inferiores ao nível de castração, podendo ocorrer também o aumento dos níveis séricos do PSA (22).

1.1.12. Abordagens terapêuticas do cancro da próstata

A seleção da abordagem terapêutica depende dos resultados do DRE, do valor do PSA, da biópsia prostática, da escala de Gleason, da classificação TNM, da classificação molecular, da idade do indivíduo, entre outros fatores decisivos, sendo que quanto mais precoce for o diagnóstico, maior a probabilidade do tratamento ser bem sucedido (26).

Felizmente, a maioria dos CP são diagnosticados numa fase precoce e em estadios iniciais da doença, contudo mais de 5% dos diagnósticos revelam doença metastática e 30-40% dos doentes desenvolverá recorrência bioquímica após o tratamento curativo (46). Assim, se o tumor for diagnosticado numa fase precoce, enquanto está localizado apenas na próstata e se a esperança de vida do doente for igual ou superior a 10 anos, geralmente opta-se por um tratamento curativo. Caso o diagnóstico já seja feito numa fase avançada, recorre-se a tratamentos paliativos, de forma a controlar o tumor, impedir a sua progressão e minimizar os sintomas (7). Em casos mais específicos, pode optar-se por não efetuar tratamentos curativos nem paliativos, elegendo um tratamento diferido que evita a perda de qualidade de vida do doente, onde se inclui a vigilância ativa e o watchful waiting (6–8).

Portanto, tal como na grande maioria dos tumores, as opções de tratamento do CP incluem a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, imunoterapia e, por se tratar de um tumor hormonodependente, terapia hormonal, entre outras (47).

Assim sendo, as diferentes opções terapêuticas encontram-se elencadas na Tabela 6, no entanto importa fazer algumas ressalvas, nomeadamente que os androgénios podem influenciar o aparecimento e progressão do CP, portanto a terapia de privação androgénica é utilizada como forma de tratamento e pode ser conseguida através da castração cirúrgica ou recorrendo a fármacos, através da castração médica (agonistas da LHRH e antagonistas da LHRH) (44). Curiosamente, os estrogénios também induzem um feedback

negativo na secreção da LHRH, diminuindo a produção de LH e, conseqüentemente, de testosterona (48). Para além disso, sabe-se que os agonistas e antagonistas da LHRH diminuem os níveis de testosterona que é um precursor do estradiol e, portanto apresentam como efeitos secundários o aumento do risco de osteoporose e de fraturas, o que poderá ser combatido com a administração de estrogénios (48–50). Deste modo, durante algum tempo os estrogénios, nomeadamente o dietilestilbestrol foi utilizado para as duas situações acima descritas, porém apresentou efeitos secundários graves, nomeadamente ao nível cardiovascular e complicações tromboembólicas (48). Na tentativa de minimizar estes efeitos secundários, era administrado em paralelo ácido acetilsalicílico, contudo a administração do dietilestilbestrol continua a ser questionável e necessita de uma avaliação muito criteriosa relativamente ao seu risco-benefício (50). Para além disto, o dietilestilbestrol foi considerado carcinogénico em mulheres que o haviam tomado como suporte hormonal durante a gravidez após abortos recorrentes (uso original), portanto devido à sua carcinogenicidade em mulheres e aos efeitos secundários cardiovasculares, o dietilestilbestrol acabou por cair em desuso (48).

A primeira linha de tratamento no CP avançado inclui a hormonoterapia, contudo em situações de recidivas ou em tumores resistentes à castração, a quimioterapia é uma opção (51). Assim sendo, os agentes quimioterápicos mais frequentemente utilizados no CP são os taxanos (docetaxel e cabazitaxel), mitoxantrona e estramustina (51–57). Inicialmente, antes da aprovação do docetaxel para o tratamento do CP, a mitoxantrona era o fármaco mais utilizado. Atualmente, apesar da mitoxantrona continuar a ser indicada para o tratamento paliativo do CP, o docetaxel é o fármaco antineoplásico de primeira-linha para o CP resistente à castração (52). A estramustina é outro fármaco antineoplásico utilizado no CP, sendo frequentemente combinado com docetaxel e prednisolona. Já o cabazitaxel é um fármaco relativamente recente que geralmente é administrado em situações de resistência ao docetaxel (52). Porém, existem outros fármacos antineoplásicos que apesar de não terem indicação terapêutica para serem utilizados no tratamento do CP, apresentaram bons resultados, tais como, carboplatina, cisplatina, vinblastina, 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, metotrexato (MTX), ciclofosfamida, doxorrubicina, etoposido e paclitaxel (51,53,58–68).

Tabela 6: Resumo das abordagens terapêuticas do CP.

Tipos de tratamentos		Explicação		Referências bibliográficas	
Cirúrgicos	Prostatectomia radical	Remoção da glândula prostática, das vesículas seminais e, por vezes, dos gânglios linfáticos pélvicos. O objetivo é a remoção total do tumor, preservando a função erétil, urinária e fecal do doente		(6,7)	
		Aberta	Radical perineal		Incisão entre o ânus e o escroto que comumente provocava disfunção erétil, lesões retais e dificultava a remoção dos gânglios linfáticos, portanto já não é muito utilizada atualmente
			Radical retropúbica		Incisão entre o umbigo e a zona púbica, o que leva a menos complicações pós-cirúrgicas
		Laparoscópica	Intervenção minimamente invasiva que diminui a probabilidade de ocorrência de complicações cirúrgicas, requer menor período de internamento e possibilita uma recuperação mais rápida		
		Robótica	Cirurgia laparoscópica feita com um equipamento robótico controlado pelo médico, conferindo elevado rigor/precisão e possibilitando uma melhor visualização das zonas anatómicas		
	Castração cirúrgica (Orquiectomia)	Remoção dos testículos com o intuito de diminuir os níveis de testosterona na corrente sanguínea, sendo geralmente efetuada uma excisão bilateral. Consiste no bloqueio da produção de testosterona ao nível das células de Leydig nos testículos, no entanto, mantém-se os androgénios circulantes produzidos pelas glândulas adrenais que continuarão a estimular residualmente o tecido prostático		(43,44,69–71)	
		Total	Excisão total dos testículos que culmina no esvaziamento das bolsas escrotais que pode ter um elevado impacto psicológico no homem caso não se coloque uma prótese testicular		
		Parcial	Excisão parcial dos testículos, sendo preservado o volume das bolsas escrotais		
Radiológicos	Radioterapia externa	Utilização de feixes de radiação exteriores ao corpo para tratar o CP		(6,7,72)	
		Radioterapia conformacional 3D (3D-CRT)	Inclui a realização de tomografias computadorizadas de modo a avaliar o volume do tumor, permitindo uma elevada precisão na direção dos feixes de radiação, minimizando a radiação que incide nos tecidos adjacentes		
		Radioterapia de intensidade modulada (IMRT)	Técnica mais inovadora que permite não só direcionar a radiação ao alvo com maior precisão, como também ajustar e variar a intensidade da radiação. O alvo é dividido em secções que são irradiadas com diferentes intensidades de radiação, diminuindo o risco da ocorrência de incontinência urinária e fecal		

Radiológicos	Radioterapia interna (Braquiterapia)	Introdução de elementos radioativos no interior da próstata pela via transperineal com o auxílio de uma sonda de ultrassonografia. Apresenta elevadas taxas de eficácia, seleção exata da zona da próstata onde é libertada a radiação (minimizando os danos dos tecidos adjacentes), anestesia de menor duração, internamento curto e menor período com sonda vesical. Não é recomendada em volumes de próstata > 60 cm³, sendo que nestes casos é sugerida a terapia de privação androgénica pré-braquiterapia com o objetivo de reduzir o volume da próstata		(6,7,73,74)
		Implantes permanentes ou de baixa taxa de dose	Implantação permanente de isótopos radioativos, geralmente iodo 125 (I-125), paládio 103 (Pd-103) ou cézio 131 (Cs-131), havendo uma libertação gradual da radiação ao longo de alguns meses, embora as sementes radioativas permaneçam para sempre no local implantado. Indicada em CP de baixo risco e doentes sem sintomas urinários graves	
		Implantes temporários ou de alta taxa de dose	O isótopo radioativo mais comumente utilizado é o irídio 192 (Ir-192) e a libertação da radiação é feita em altas doses durante alguns minutos, sendo que a fonte radioativa é removida após o procedimento. Utilizada em doentes com CP de risco intermédio/elevado	
	Radiofármacos	Utilização de radiação alfa ou beta para induzir a morte celular. A radiação é direcionada às células tumorais, evitando o tecido normal		(75,76)
Vipivotido tetraxetano de lutécio (Lu-177)		Em associação com a terapia de privação androgénica no tratamento de doentes com progressão do CP metastático resistente à castração positivo para o antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) que foram tratados previamente com inibição da via dos RA e quimioterapia à base de taxanos. O radionuclídeo lutécio-177 está conectado a um ligando molecular (PSMA-617) que apresenta elevada afinidade ao PSMA (proteína transmembranar sobreexpressa no CP). Após a ligação do fármaco às células tumorais que expressam PSMA ocorre a emissão de radiação beta, provocando danos no DNA que culminarão na morte celular. É essencial confirmar a presença do PSMA nas células tumorais		
Farmacológicos	Agonistas da LHRH	Também designados por análogos da hormona libertadora de gonadotropina		(43,44,48,77–80)
		Goserrelina	Numa primeira fase estimulam a libertação da LH pela hipófise que se reflete num aumento transitório dos níveis séricos de testosterona (efeito paradoxal), porém quando administrados ininterruptamente, verifica-se que após 2 a 4 semanas ocorre a inibição da secreção de LH e, consequentemente, os níveis de testosterona baixam para níveis equivalentes aos conseguidos na castração cirúrgica	
		Triptorrelina		
		Leuprorrelina		
	Antagonistas da LHRH	Também designados por antagonistas da hormona libertadora de gonadotropina		(43,44,48,81,82)
Degarrelix		Ligam-se competitivamente aos recetores da LHRH na hipófise e inibem a libertação de LH, culminando na supressão da secreção de testosterona. Comparativamente aos análogos da LHRH apresentam a vantagem de não desencadearem o pico inicial de testosterona sérica, sendo possível obter níveis de testosterona equivalentes à castração cirúrgica mais rapidamente (entre 2 a 3 dias)		
Relugolix				

Farmacológicos	Anti-androgénios	Competem com a testosterona e com a DHT por locais de ligação na próstata e inibem competitivamente o efeito dos androgénios. Podem ser administrados em monoterapia, em combinação com os antagonistas da LHRH para obter um bloqueio androgénico total ou em combinação com os agonistas da LHRH com o intuito de minimizarem o impacto do pico de LH que lhes é próprio numa primeira fase		(44,48,83–93)
		Anti-androgénios esteroides	Ciproterona	
		Anti-androgénios não esteroides de primeira geração	Nilutamida	
			Flutamida	
			Bicalutamida	
		Anti-androgénios não esteroides de segunda geração	Apalutamida	
			Enzalutamida	
			Darolutamida	
	Inibidores da síntese de androgénios	O pró-fármaco acetato de abiraterona é convertido em abiraterona, que é um inibidor da síntese de androgénios		(48,86,89,94)
		Abiraterona	Inibe a enzima 17 α -hidroxilase-C17,20-liase (CYP17) que é responsável pela síntese androgénica e é expressa nos testículos, nas glândulas adrenais e no próprio tumor, ou seja, a enzima CYP17 catalisa a conversão de pregnenolona e progesterona em dehidroepiandrosterona e androstenodiona, respetivamente. Dado que a dehidroepiandrosterona e a androstenodiona são precursores da testosterona, ao inibir esta enzima, ocorre uma diminuição dos níveis de testosterona circulante e o bloqueio da produção de androgénios por todas as vias. Pode ser administrada em doentes com CP metastático hormono-sensível em combinação com terapêutica de privação androgénica, no CP metastático resistente à castração após falência da terapêutica de privação androgénica e no CP resistente à castração em que houve progressão durante ou após o tratamento com docetaxel	
	Imunomoduladores	O CP tem um crescimento lento conferindo o tempo necessário para administrar um fármaco imunomodulador que ativará o sistema imunitário do doente para combater ou controlar o cancro. A Sipuleucel-T (vacina celular autóloga) foi a primeira imunoterapia a ser aprovada para o CP metastático resistente à castração assintomático ou minimamente sintomático em doentes em que a quimioterapia não está indicada		(95–99)
		Células mononucleares autólogas de sangue periférico ativadas com PAP-GM-CSF (Sipuleucel-T)	Produzida através da colheita de células mononucleares autólogas do sangue periférico do doente que são apresentadas ex-vivo a antígenos recombinantes e, posteriormente voltam a ser reintroduzidas no organismo. Existem dois elementos fundamentais na sua produção, a fosfatase ácida prostática (PAP) que é um antígeno que se encontra expresso na maioria dos CP e o fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) que é uma citocina com capacidade para ativar o sistema imunitário. Assim, as células mononucleares são cultivadas ex-vivo com uma proteína de fusão, que resulta da ligação entre a PAP e o GM-CSF, que se designa de PAP-GM-CSF. O Sipuleucel-T tem a capacidade de desencadear uma resposta imune contra a PAP, pois durante a cultura com o PAP-GM-CSF, as células apresentadoras de antígeno captam o antígeno recombinante, transformando-o em peptídeos que são apresentados às células T, e que posteriormente, desencadearão uma resposta imune contra as células neoplásicas da próstata	

Farmacológicos	Quimioterapia	Citotóxicos que interferem com a tubulina	Docetaxel	Ligam-se à tubulina, promovendo a sua polimerização e estabilização dos microtúbulos. Este mecanismo bloqueia o ciclo celular, inibe a mitose e induz a morte celular. Os taxanos têm elevada afinidade à glicoproteína-P (responsável pelo efluxo de quimioterápicos das células), sendo que o cabazitaxel apresenta menor afinidade à glicoproteína-P do que o docetaxel	(51–57)
			Cabazitaxel		
		Citotóxicos que se intercalam no DNA	Mitoxantrona	Reage com o DNA e intercala-se através das ligações de hidrogénio, impedindo a sua replicação e transcrição. Também interfere com o ácido ribonucleico (RNA) e é inibidor da topoisomerase II. Habitualmente é associado com corticosteroides no tratamento paliativo do CP resistente à castração avançado, nomeadamente na diminuição da dor	
		Alquilantes	Estramustina	O fosfato de estramustina é um pró-fármaco que é convertido em estramustina e que, por sua vez, é metabolizada em estromustina. A estramustina e a estromustina são metabolizadas em estradiol e a estrona; assim, o estradiol e a estrona possuem atividade anti-gonadotrófica, resultando na redução dos níveis de testosterona; já a estramustina e a estromustina apresentam efeito anti mitótico nas células tumorais através da inibição/diminuição da polimerização de microtúbulos. Também modula a função da glicoproteína-P, potenciando a acumulação intracelular do fármaco	
	Inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase (iPARP)	Olaparib	Foi o primeiro iPARP a ser aprovado pela FDA (cancro do ovário avançado) e em 2020 foi aprovado para o tratamento de doentes com CP metastático resistente à castração, com mutações somáticas ou germinativas nos genes que intervêm na reparação por recombinação homóloga (RH) e que tenham progredido após o tratamento prévio com enzalutamida ou abiraterona; apresenta benefícios superiores quando administrado antes da quimioterapia com taxano; o estudo PROpel analisa a combinação de olaparib com abiraterona para doentes com CP metastático resistente à castração com ou sem alterações na reparação por RH; o estudo revelou que esta combinação aumentou a sobrevida livre de progressão independentemente da via de reparação por RH		(46,100)
		Rucaparib	Em 2020 foi aprovado pela FDA para o tratamento de doentes com CP metastático resistente à castração, com mutações somáticas ou germinativas nos genes BRCA1/2, que já haviam sido tratados com terapia de privação androgénica e quimioterapia com taxano; o estudo TRITON3 compara o rucaparib com docetaxel, abiraterona ou enzalutamida para doentes com CP metastático resistente à castração com mutações BRCA1/2 ou ATM; o estudo revelou que o rucaparib aumentou a sobrevida livre de progressão no grupo com mutações BRCA 1/2		(46,100–102)

Outros	Vigilância ativa	Monitorização do tumor através da determinação do PSA e do DRE efetuados a cada 3 meses nos primeiros 2 anos e, posteriormente, de 6 em 6 meses. Recomendada para homens com CP localizado com baixo risco de progressão, que poderão nunca necessitar de tratamento. No fundo, pretende-se evitar tratamentos excessivos em tumores em estadios iniciais e que poderão nunca evoluir, porém, caso se verifique a progressão do tumor, recomenda-se que se prossiga para o tratamento curativo	(6–8)
	Watchful waiting	Recomendado para homens de faixa etária mais elevada, com esperança média de vida inferior a 10 anos, que apresentem CP localizado assintomático. Não é feita a monitorização regular do tumor, contudo caso surja algum tipo de sintomatologia pode ser iniciado o tratamento	(7)
	Crioterapia	Tratamento relativamente recente para o CP, no qual se utiliza azoto ou argon, submetendo toda a próstata ou áreas específicas da mesma a temperaturas de - 40°C com o intuito de destruir as células neoplásicas através de apoptose e necrose causadas pelos danos provocados pelos cristais intracelulares que se geram neste procedimento. Uma das técnicas de crioterapia recorre ao azoto/argon e ao hélio que, respetivamente, criam um ciclo de congelamento-descongelamento que permite diminuir os efeitos secundários causados pelo procedimento. Inclui um dispositivo de aquecimento uretral, sondas de temperatura e sondas de ultrassonografia	(103,104)
	HIFU	O tratamento com ultrassons focalizados de alta intensidade do inglês high-intensity focused ultrasound (HIFU) consiste na utilização de ultrassons que ao serem absorvidos pelos tecidos se convertem em calor, induzindo a necrose das células tumorais da próstata	(105)
	Terapia fotodinâmica	Administração por via intravenosa de um agente fotossensibilizador que é ativado através de uma luz com um comprimento de onda específico. Este composto acumula-se nas células neoplásicas da próstata e, quando ativado, reage com o oxigénio tecidual formando espécies reativas de oxigénio que podem induzir a apoptose	(105)
	Terapia a laser	É colocada uma fibra laser nos tecidos tumorais através da qual se emite energia que pode levar a necrose celular	(105)
	Eletroporação irreversível	Produção de um campo elétrico com libertação de voltagens elevadas que alteram a integridade da membrana celular das células neoplásicas, levando à sua rotura	(105)

Relativamente à imunoterapia, para além da Sipuleucel-T, existem outras vacinas em investigação, designadamente a PROSTVAC-VF (vacina composta por dois vetores virais recombinantes e três moléculas co-estimuladoras que interferem com o PSA e desencadeiam uma resposta imune local), a ProstAtak (administração intratumoral de um gene que é introduzido num vetor adenoviral, seguindo-se a administração do pró-fármaco valaciclovir), PAN-301-1 (vacina de nanopartículas dirigida por uma proteína transmembranar), entre outras (95,98,99). Também decorrem ensaios clínicos no sentido de perceber se anticorpos monoclonais que já têm indicação terapêutica para outros tipos de tumores podem ser utilizados no tratamento do CP, tais como o ipilimumab que se liga ao antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos, o pembrolizumab e o nivolumab que bloqueiam a interação entre a proteína de morte celular programada-1 (PD-1) e os seus ligandos PD-L1 e PD-L2, o atezolizumab, o durvalumab e o avelumab que se ligam ao PD-L1, inibindo a ligação PD-1/PD-L1, o bevacizumab que se liga ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), impedindo a ligação aos seus recetores, entre outros (95,98,99).

Já na terapia dirigida, particularmente os iPARP olaparib e o rucaparib têm aprovação para o tratamento do CP metastático resistente à castração, distinguindo-se um do outro pois o olaparib é indicado para doentes com qualquer mutação na reparação por RH, enquanto o rucaparib é indicado apenas para doentes com mutações BRCA1 ou BRCA2, tornando-se fundamental a realização de testes genéticos de forma a selecionar o tratamento mais adequado e personalizado para cada doente (46,100–102). Para além destes iPARP destacam-se mais dois que ainda não têm aprovação pelas entidades reguladoras do medicamento no tratamento do CP, mas que estão atualmente em ensaios clínicos para esse fim, nomeadamente o niraparib, cujo ensaio MAGNITUDE visa analisar a combinação de niraparib com abiraterona mais prednisona para doentes com CP metastático resistente à castração com ou sem alterações na reparação por RH e que tem revelado que esta combinação melhorou significativamente o resultado clínico dos doentes, particularmente no grupo com mutações BRCA 1/2, sendo que o niraparib já tem aprovação para o tratamento de manutenção dos tumores epiteliais do ovário, trompas de Falópio ou peritoneais primários, recidivantes e sensíveis aos platinos (46,100,106). De igual modo, o ensaio clínico TALAPRO-2 pretende analisar a combinação de talazoparib com enzalutamida para doentes com CP metastático resistente à castração com ou sem alterações na reparação por RH, revelando que esta combinação aumentou a sobrevida livre de progressão independentemente da via de reparação. Contudo, o talazoparib já é usado no tratamento dos tumores da mama associados a mutações BRCA1/2 na linha germinativa, HER2 negativos, localmente avançados ou metastáticos (100,107).

Por fim, com o intuito de obter melhores resultados clínicos e de melhorar a sobrevivência dos doentes com CP, recorre-se frequentemente a abordagens terapêuticas multimodais que se complementam entre si (40,108). Para além disto, é sempre fundamental considerar outros tipos de abordagens terapêuticas quando o doente já possui metástases ósseas, visto que geralmente estas metástases são dolorosas, diminuem a qualidade de vida do doente e necessitam de um tratamento paliativo. Assim, os tratamentos convencionais para as metástases ósseas incluem analgésicos, anti-inflamatórios, corticosteróides, cirurgia, radioterapia externa, bifosfonatos (pamidronato de sódio e ácido zoledrónico), radiofármacos de radiação beta (estrôncio 89 (Sr-89) e samário 153 (Sm-153)), radiofármacos de radiação alfa (radio 223 (Ra-223)) e o anticorpo monoclonal denosumab, embora existam já alguns tratamentos promissores, nomeadamente com moléculas sinalizadoras e com antagonistas dos recetores da endotelina-1 (ET-1) (44,49,109–116).

1.1.12.1. Tratamentos promissores do cancro da próstata

No caso do CP metastático resistente à castração, o radiofármaco Actínio 225 (Ac-225) também poderá vir a ser opção de tratamento num futuro breve, pois emite radiação alfa, utilizando o PSMA como alvo terapêutico, uma vez que este se encontra sobreexpresso no CP metastático resistente à castração (117,118).

No que concerne às terapêuticas farmacológicas dirigidas destaca-se o inibidor da tirosina cinase, cabozantinib, que inibe determinados fatores de crescimento (VEGFR, MET, FLT3, AXL, KIT e RET) levando à diminuição da angiogénese, invasão celular, crescimento tumoral e metastização (97,119). Apesar do cabozantinib já estar aprovado para carcinomas renais, hepáticos e da tiróide, estudos *in vitro* demonstraram que no caso do CP este fármaco promove a morte celular e modula as células dendríticas, através da sua atividade imunoestimuladora. Por outro lado, mostrou bons resultados em combinação com a terapia de privação androgénica em doentes com CP metastático sem tratamento hormonal prévio, em ensaios clínicos em que foi combinado com prednisona em doentes com CP metastático resistente à castração e em ensaios clínicos em que foi combinado com atezolizumab também em doentes com CP metastático resistente à castração (119). Os inibidores da cinase dependente de ciclina 4 e 6 (CDK 4/6) também são promissores no tratamento do CP, devido ao efeito de sinalização que exercem nos RA e porque as CDK estão associadas ao controlo do crescimento celular e são frequentemente afetadas, desencadeando a tumorigénese. Portanto, fármacos que já se encontram comercializados para o tratamento de outras neoplasias, tais como o palbociclib, ribociclib e abemaciclib assumem um papel importante nos ensaios clínicos que decorrem para o CP e podem ter particular interesse quando administrados em combinação com outros fármacos (120).

Por último, os inibidores seletivos da proteína cinase B (Akt), designadamente o ipatasertib e capiversertib encontram-se em ensaios clínicos em associação com outros fármacos para o tratamento do CP metastático resistente à castração, pois é sabido que o CP está associado à desregulação da via fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) - proteína cinase B (Akt) - proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR), designada de via PI3K-Akt-mTOR, também associada à perda de função do PTEN (121).

1.2. Reaproveitamento de fármacos no cancro da próstata

Os fármacos reaproveitados têm de ser eficazes perante situações clínicas oncológicas, sendo este o critério mais relevante e mais difícil de provar. Porém, existem diversos fármacos com evidências significativas do seu benefício, nomeadamente no CP, sendo pertinente perceber quais os mecanismos de ação que lhes conferem este potencial. Portanto, após a seleção dos potenciais fármacos, é necessário validar as suas propriedades para comprovar que possuem as características necessárias para serem utilizados no tratamento do CP, sendo que diversos grupos farmacoterapêuticos já mostraram ser vantajosos, tais como antidiabéticos, antiparasitários, antiarrítmicos, anti-inflamatórios, antibacterianos, antivíricos, antidepressivos, anti-hipertensores, antifúngicos, imunossuppressores, antipsicóticos, antiepiléticos e anticonvulsivantes, bifosfonatos, medicamentos para o alcoolismo, entre outros (Figura 6).

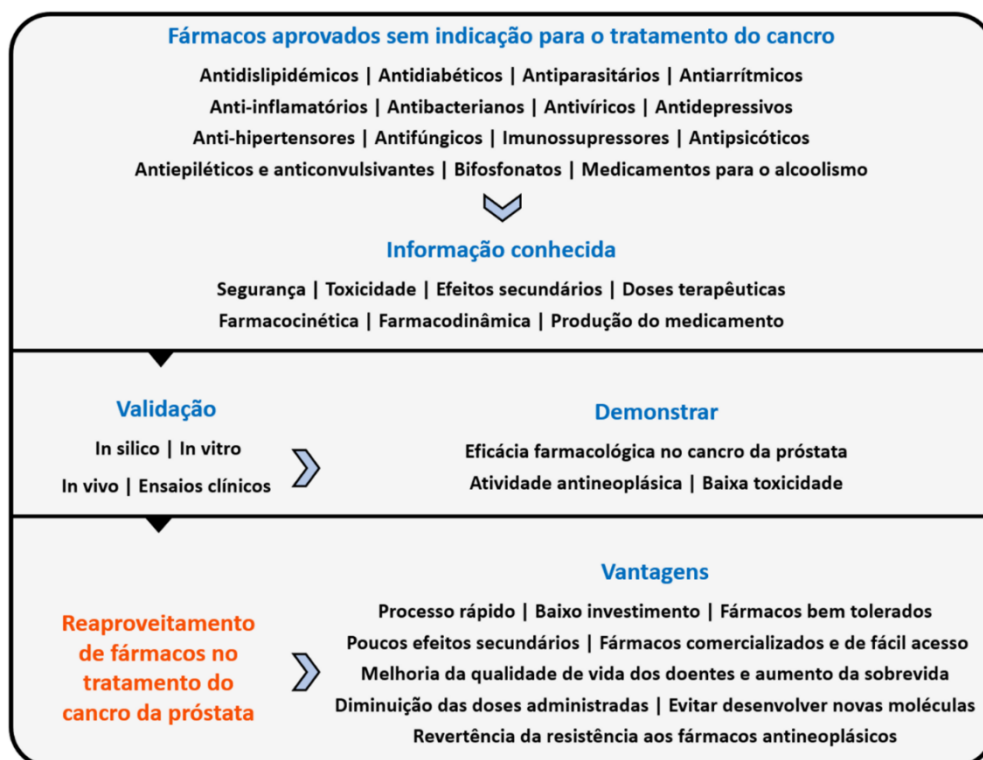


Figura 6: Processo de reaproveitamento de medicamentos no CP e as suas vantagens.

1.2.1. Antidislipídicos

De uma maneira geral, o CP é dependente dos níveis de androgénios circulantes, nomeadamente da testosterona, que tal como os outros androgénios é um derivado do colesterol (86). Assim, geralmente os doentes com CP apresentam uma elevada produção de colesterol, visto que as células neoplásicas prostáticas dependem mais da produção endógena de colesterol do que do colesterol oriundo da dieta. Deste modo, percebe-se que indivíduos com níveis elevados de colesterol sérico têm maior risco de desenvolvimento de CP, sendo este um dos fatores de risco associados a esta doença e, para além disto, sabe-se que o colesterol também desempenha um papel importante ao nível do crescimento, proliferação, migração e invasão de células neoplásicas (122). De facto, sabe-se que a terapia de privação androgénica inibe a síntese de androgénios nos testículos e, consequentemente, diminui os níveis de androgénios sistémicos, porém apesar da baixa disponibilidade de androgénios circulantes, a progressão tumoral continua a decorrer, visto que ocorre uma síntese intratumoral de andrógenios a partir do colesterol existente (123). Deste modo, as estatinas são agentes antidislipídicos, cujo mecanismo de ação consiste em inibir a enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, impedindo a produção de mevalonato que é um precursor do colesterol e que permite controlar a síntese de androgénios a partir do colesterol e que poderá justificar o efeito sinérgico das estatinas com a terapia de privação androgénica (9,13,122,123).

Por outro lado, sabe-se que a via metabólica do mevalonato está associada à proteína associada ao yes (YAP) e à proteína tafazzin (TAZ) que, por sua vez, estão relacionadas com o crescimento e progressão tumoral. Assim, as estatinas ao inibirem a HMG-CoA redutase, bloqueiam a produção de mevalonato e inibem a YAP/TAZ (124). Portanto, as estatinas reduzem os níveis séricos de colesterol e estudos in vitro e in vivo indicam que atenuam a progressão do CP e reduzem a incidência de CP letal sendo responsáveis por melhores prognósticos e taxas de sobrevida superiores, reduzindo quer o volume do tumor, quer os níveis séricos de PSA e ainda têm a capacidade de serem sensibilizadoras de radioterapia (9,13,122,124). Para além disto, as estatinas também demonstraram propriedades anti proliferativas, anti-inflamatórias e antioxidantes que se traduzem em efeitos anti tumorais, suprimem a produção de metabolitos essenciais para diversas funções celulares e para a modificação pós-traducional de proteínas de sinalização celular e ainda inibem a angiogénese, o aparecimento de metástases e a proliferação tumoral (124).

No mesmo sentido, sabe-se que as estatinas reduzem o colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (30 a 60%), o colesterol total (23 a 28%) e os triglicerídeos (25 a 45%), o que é extremamente útil no tratamento do CP, visto que nesta neoplasia se verifica

uma desregulação do metabolismo lipídico que resulta numa acumulação excessiva de lipídios. Assim, as estatinas eventualmente terão a capacidade de atuar tanto no colesterol sérico, como no colesterol intratumoral, o que é uma vantagem, dado que indivíduos com colesterol sérico elevado parecem ter maior risco de desenvolver neoplasias da próstata mais agressivas e apresentam taxas de mortalidade mais elevadas. Por outro lado, foram detetadas quantidades significativas de estatinas no tecido da próstata de vários indivíduos, o que permite deduzir que as estatinas têm um efeito direto nas células prostáticas, tendo sido demonstrado que após um tratamento de quatro semanas com estatinas, já é possível que estas sejam detetadas no tecido prostático (123).

Algumas das estatinas mais destacadas na literatura para tratamento do CP são a atorvastatina, fluvastatina, sinvastatina, mevastatina, lovastatina e rosuvastatina, administradas em monoterapia ou em combinação com outros fármacos, apesar de estudos recentes indicarem que o grande foco se encontra na atorvastatina e na sinvastatina (124). Num ensaio clínico com indivíduos com CP avançado, a atorvastatina reduziu os níveis séricos de PSA quando comparada com o placebo e após 27 dias de administração diminuiu a proliferação tumoral. Num outro estudo, após administração de 80 mg de atorvastatina durante 27 dias antes da prostatectomia, já foi possível detetar o fármaco no tecido prostático de 50% dos indivíduos avaliados. Por outro lado, a atorvastatina também apresenta benefícios quando combinada com radioterapia, visto que aumenta a radiosensibilidade das células neoplásicas da próstata induzidas por hipóxia através da diminuição da expressão do fator de transcrição induzido pela hipóxia (HIF-1 α). Outros estudos demonstraram que quando a prostatectomia é precedida pela administração de fluvastatina ocorre maior apoptose tumoral e que após 4 a 12 semanas de administração de 80 mg de fluvastatina, esta foi detetada no tecido prostático de 10 dos 28 pacientes avaliados com CP localizado e que o dipiridamol, um antiagregante plaquetário, quando administrado em combinação com fluvastatina reduz a dose de fluvastatina necessária para induzir a morte das células neoplásicas da próstata. Relativamente à sinvastatina, sabe-se que esta tem a capacidade de voltar a sensibilizar linhas celulares de CP que desenvolveram resistência à enzalutamida e que atua através da apoptose provocada pela depleção do colesterol e da inibição da via de sinalização da Akt (13,44,122–125). Por outro lado, também impede o crescimento tumoral, reduz a expressão dos níveis de PSA e quando administrada em combinação com irinotecano verifica-se a supressão do crescimento tumoral e indução da apoptose causadas pela inibição da proteína MCL-1 (124).

No que concerne à lovastatina e à sinvastatina, estas inibem a atividade da proteína RhoA, ativam a caspase 3, caspase 8 e caspase 9, induzem a apoptose, reduzem a

expressão da proteína do retinoblastoma (Rb), da Rb fosforilada, das ciclinas D1 e D3, da CDK4 e da CDK6, aumentando a expressão de p21 e p27 nas células neoplásicas da próstata (124). Já a atorvastatina, a mevastatina, a sinvastatina e a rosuvastatina diminuem as colónias de células neoplásicas da próstata e reduzem a sua migração devido à inibição da síntese de geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP) (124). Além disto, um estudo recente mostrou que as estatinas, particularmente a fluvastatina, pravastatina, rosuvastatina, atorvastatina, cerivastatina, sinvastatina e lovastatina, quando administradas numa dose diária cumulativa definida (DDCD) alta estavam associadas a um menor risco de CP e que a sua utilização durante períodos superiores a cinco anos pode reduzir a incidência do CP, o que permite concluir que DDCD altas e de longa duração estão associadas a menor risco de CP, nomeadamente a uma menor incidência e podem ser utilizadas para prevenir o seu aparecimento (126).

Por outro lado, o fenofibrato apesar de não pertencer ao grupo das estatinas também é um fármaco antilipídico e tem capacidade de ativação do recetor ativador da proliferação dos peroxissomas alfa (PPAR α) que desempenha um papel fundamental no metabolismo lipídico, tendo a capacidade de aumentar a lipólise. Portanto, ao nível do CP o fenofibrato tem a capacidade de induzir apoptose nas células tumorais e reduzir a sua disseminação, dificultando o processo de metastização, fenómenos que se devem à inibição da ciclina D1 e da proteína E2F1 e ao aumento da proteína pró-apoptótica Bax (124,127). O fenofibrato também diminui a expressão dos RA e dos seus genes-alvo através da diminuição dos níveis de Akt fosforilada e induz a apoptose através da produção de stress oxidativo, incluindo a inibição da enzima superóxido dismutase (SOD) (124).

Em suma, tanto as estatinas como o fenofibrato apresentam propriedades antiproliferativas, antimetastáticas e apoptóticas de células tumorais da próstata e também noutros tipos de neoplasias, tais como, melanomas, neuroblastomas e tumores gástricos, hepáticos, entre outros (9,127).

1.2.2. Antidiabéticos

A diabetes *mellitus* tipo 2 representa cerca de 90% dos casos de diabetes e é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de certas neoplasias, entre as quais a do fígado, pâncreas, colorretal, renal, bexiga, endométrio e mama. Para além disto, a diabetes está também associada a elevada mortalidade em situações oncológicas, nomeadamente no CP, porém vários estudos mostram que a diabetes *mellitus* tipo 2 parece reduzir o risco de incidência de CP, o que aparenta dever-se ao facto dos níveis plasmáticos do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) estarem mais baixos em indivíduos diabéticos do que em indivíduos não diabéticos (128).

Contudo, a metformina é um fármaco antidiabético que pertence ao grupo das biguanidas e tem a capacidade de diminuir a resistência dos tecidos à insulina, diminuir a produção de glicose hepática e, conseqüentemente, reduzir os níveis séricos de glicose. Para além disto, a metformina tem também demonstrado bons resultados no tratamento do CP, nomeadamente ao nível da apoptose de células do CP, dada a sua capacidade em desregular a via de sinalização da PI3K, minimizando o crescimento, proliferação e diferenciação celular tumoral. A metformina também está associada à redução da incidência e da mortalidade causada pelo CP, apresentando bons resultados quando combinada com quimioterapia (9,13,128).

Para além disto, sabe-se que a capacidade da metformina para inibir o crescimento do CP está relacionado com a ativação da proteína cinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK), visto que a AMPK bloqueia o ciclo celular e, conseqüentemente, impede o crescimento celular. Ou seja, a ativação da AMPK pela metformina, leva à inativação da Akt, da p70S6 cinase e da mTOR, resultando na inibição da via de sinalização Akt/mTOR, sendo que a inibição da mTOR e da acetil-CoA-carboxilase (ACC) impede a síntese proteica e a síntese de ácidos gordos, respetivamente. Por sua vez, a metformina também atua ao nível do REDD1 (inibidor da mTOR e da ciclina D1), inibe a GTPase Rac1 que leva à redução das metástases do CP e inibe o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT), diminui a expressão do oncogene c-MYC, do fator de transcrição SOX4 e do fator de transcrição FoxM1, sendo que estes dois últimos estão associados à migração celular do CP, aumenta a expressão do miR30a (supressor tumoral), inibe a fosforilação e oxidação da piruvato quinase M2 (PKM2) e diminui a incidência de lesões intraepiteliais da próstata (129,130).

A metformina reduz a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), prostaglandina E2 (PGE2) e STAT3, o que é uma vantagem pois o eixo COX-2/PGE2/STAT3 é responsável pelo aparecimento de resistências a medicamentos, metástases e recidivas tumorais. Outro dos mecanismos associados à metformina é capacidade de reduzir a sinalização dos RA, o que também pode estar relacionado com a ativação da AMPK (129,130).

Por outro lado, no grupo das sulfonilureias, destaca-se a glipizida que tem como mecanismo de ação o aumento da secreção de insulina a partir das células β do pâncreas que ocorre devido ao fecho dos canais de potássio na membrana destas células, originando a sua despolarização, seguida pela abertura dos canais de cálcio que leva à entrada dos iões de cálcio e, por sua vez, à saída da insulina (128). Desta forma, a glipizida inibe a angiogénese em modelos de CP in vivo, apesar de não impedir a proliferação celular, contudo são necessários estudos mais aprofundados em relação a este fármaco (13,128).

1.2.3. Antiparasitários

Dentro deste grupo de fármacos, tanto os anti-helmínticos como os antimaláricos parecem ser úteis no tratamento do CP. Assim sendo, relativamente aos anti-helmínticos, o mebendazol é originalmente utilizado em infeções causadas por parasitas, mas devido à sua capacidade para inibir a polimerização dos microtúbulos pode ser utilizado para o tratamento do CP, nomeadamente em combinação com docetaxel, visto que se desencadeia um efeito sinérgico ao nível da apoptose e do bloqueio do crescimento tumoral do CP que foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* (13,131). Esta combinação terapêutica apresentou bons resultados sinérgicos, visto que o docetaxel se liga à tubulina, promove a sua polimerização e, consequentemente, a estabilização dos microtúbulos, ao invés do mebendazol que inibe a sua polimerização, o que afeta a dinâmica dos microtúbulos e origina mitoses aberrantes, designadamente, problemas na formação do fuso acromático, aumento dos núcleos fragmentados, das divisões multipolares e das aneuploidias (131).

Já a niclosamida diminui a expressão de um grupo específico de RA, os recetores V7, que são de extrema importância no CP resistente à castração e que estão associados à resistência à enzalutamida, e por esse motivo, a niclosamida torna-se útil na sensibilização ao tratamento com enzalutamida (9,13,22). Para além disto, a niclosamida atua através da inibição de vias de sinalização que estão relacionadas com a oncogénese e com a progressão tumoral da próstata, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), Notch, mTORC1, STAT3 e Wnt/ β -catenina onde atua no coreceptor LRP6, degradando-o (9,124). Ainda no grupo dos anti-helmínticos, a ivermectina atua no CP através da paragem do ciclo celular, da indução da apoptose e da diminuição da expressão dos RA, sendo que estes fenómenos estão associados à diminuição dos níveis do antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA) e das ciclinas D e E e ao aumento do p21. A ivermectina também atua na proteína FOXA1 e no heterodímero Ku70/Ku80 da via non-homologous end joining (NHEJ), inibindo-os e bloqueando a sinalização dos RA, a expressão do E2F1 e a reparação dos danos do DNA, culminando na paragem do ciclo celular (132,133). Além disto, a ivermectina origina um efeito sinérgico em combinação com o docetaxel, reduz a viabilidade das células neoplásicas, provocando a sua apoptose e, consequentemente, diminui o tamanho do tumor, sendo que ainda não se conhece bem o mecanismo de sinergia destes dois fármacos, mas talvez possa estar relacionado com a inibição de MDR, do inglês multidrug resistance, causada pela ivermectina (132).

A literatura também refere o benefício da utilização de fármacos antimaláricos no tratamento do CP, designadamente da artemisinina, visto que tanto esta como alguns dos seus metabolitos (dihidroartemisinina) e derivados (artesanato) induzem a morte celular. Assim sendo, a atividade anticancerígena da dihidroartemisinina deve-se à sua capacidade

para inibir a expressão da proteína tumoral controlada por tradução (TCTP), enquanto o artesunato provoca a paragem do ciclo celular, inibição da autofagia e da angiogénese, diminuição da invasão tumoral e das metástases e se acumula nos lisossomas, promovendo a degradação da ferritina das células neoplásicas e o aumento da produção de espécies reativas de oxigénio, o que leva à morte celular (13,134,135).

Para além destes fármacos, também a cloroquina e o seu derivado, hidroxicloroquina, demonstraram capacidade para interagir com os nucleótidos e induzir a apoptose, tendo apresentado propriedades anti tumorais, anti proliferativas e anti mutagénicas, visto que são inibidores da autofagia e, por isso, impedem que as células neoplásicas recorram à autofagia para obter energia e nutrientes (13,136). Portanto, a cloroquina e a hidroxicloroquina permeabilizam a membrana dos lisossomas, ocorrendo a libertação das enzimas lisossomais que, por sua vez, permeabilizam a membrana mitocondrial, originando um apoptossoma que, conseqüentemente, desencadeia a apoptose (136). No caso específico da cloroquina, esta induz o p53, inibe processos anti-apoptóticos e de sobrevivência, promove o enrolamento da cromatina e, conseqüentemente, reduz os mecanismos de reparação do DNA (136). Assim, tanto a cloroquina como a hidroxicloroquina, parecem ser bons candidatos para serem administrados em associação com radioterapia e quimioterapia quer em regimes neoadjuvantes, quer adjuvantes ou até mesmo em concomitância, mas nunca de forma isolada, pois seriam necessárias doses extremamente elevadas para inibir o crescimento tumoral, contudo os seus efeitos sinérgicos seriam benéficos, visto que conseguem reter a quimioterapia dentro das células neoplásicas. Porém, a cloroquina e a hidroxicloroquina modulam a resposta imune do doente e, por esse motivo, apresentam a desvantagem de suprimirem a resposta imune contra o tumor quando administradas durante longos períodos, fruto da atividade imunossupressora (136). Também a quinacrina, outro antimalárico, mostrou resultados favoráveis que se devem à capacidade de ativação do p53, gene de supressão tumoral (13). Por fim, outro antiparasitário cujo reaproveitamento pode ser útil é a suramina que reduz os níveis séricos de PSA e que tem vindo a ser testado, particularmente em doentes com CP resistente à castração, no entanto, os mecanismos de ação anticancerígenos da quinacrina e da suramina ainda são desconhecido (13,51).

1.2.4. Antiarrítmicos

Na classe dos antiarrítmicos destacam-se a digoxina e a ouabaína que são glicosídeos cardíacos que inibem a bomba de sódio e potássio, levando à acumulação intracelular de cálcio e, em última instância, à apoptose das células neoplásicas da próstata, para além disto, também induzem a paragem do ciclo celular e a autofagia e apresentam

propriedades anti proliferativas (9,13,124). Assim, a literatura indica que a bomba de sódio e potássio é constituída pelas subunidades α e β , sendo que a subunidade α se encontra “downregulated” em situações oncológicas e a subunidade β glicosilada está envolvida no processo de metastização das células tumorais. Deste modo, estes fármacos apresentam potencial para serem reaproveitados no tratamento do CP, porém são necessários mais estudos que comprovem a sua eficácia, visto que os resultados existentes são limitados devido às amostras serem pequenas (124).

Assim, a digoxina inibe a enzima topoisomerase II, produz interleucina-8, diminui os níveis séricos de PSA e o crescimento tumoral, mostrou ter efeito inibitório sobre o CP e, quando administrada em concentrações nanomolares, inibe o HIF-1 α e o fator de transformação do crescimento β (TGF β), embora ainda não sejam conhecidos muitos dados acerca deste possível candidato (9,13,124). Por sua vez, a ouabaína sensibilizou as células neoplásicas da próstata para a apoptose, devido à inibição da survivina que bloqueia o processo apoptótico, aumentou a expressão de PAR-4, conduziu à perda do potencial de membrana mitocondrial, diminuiu a expressão do STAT3 e do HOXB-13 que se encontram sobreexpressos no CP, sendo que o HOXB-13 está associado ao aparecimento desta neoplasia e das suas metástases, dado que se encontra relacionado com a migração e invasão de células tumorais, ou seja, a ouabaína tem a capacidade de desencadear a apoptose através da inibição da expressão de HOXB-13. E por fim, a ouabaína também inibe as topoisomerase I e II, apresentando atividade anticancerígena no CP resistente à castração quando administrada em concentrações nanomolares (9,13,124).

1.2.5. Anti-inflamatórios

O mecanismo de ação dos AINEs relaciona-se com a inibição da COX que leva à inibição da síntese de prostaglandinas, contudo estes fármacos também atuam ao nível do bloqueio da proliferação celular e indução da apoptose, tendo mostrado bons resultados no tratamento do CP, nomeadamente em casos de doentes que desenvolveram resistência à terapêutica (9,13). Dentro do grupo dos AINEs, destacam-se os inibidores seletivos da COX-2, uma vez que a COX-2 se encontra expressa nas células neoplásicas prostáticas e na vasculatura que as alimenta, estando associada à angiogénese, portanto, fármacos como o celecoxib parecem ser benéficos, visto que para além disto também bloqueiam a fosforilação e a ativação da Akt, inibem a atividade do NF- κ B, entre outros mecanismos que conduzem à apoptose das células neoplásicas da próstata (9,13,21). Por outro lado, a combinação de atorvastatina com celecoxib em estudos in vivo parece bloquear o crescimento e a progressão tumoral precisamente devido à inibição da Akt, Erk1/2 e do

NF- κ B, sendo que in vitro esta combinação induz a autofagia em células neoplásicas da próstata (124,137). Todavia, existem outros AINEs que são inibidores não seletivos da COX e que também têm potencial antineoplásico, como é o caso da indometacina que inibe a angiogénese e o crescimento de células neoplásicas, através da inibição da COX-1, COX-2, proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), Wnt/ β -catenina e do comprometimento mitocondrial dependente do PKC-p38-DRP1, podendo ser eficaz quando utilizada em combinação com a enzalutamida, devido à diminuição da produção ou da utilização de androgénios pelas células neoplásicas (13).

Outro fármaco promissor é o diclofenac que inibe a COX, a síntese de prostaglandinas e a família de genes MYC que se encontra sobreexpressa em diversos tipos de tumores, interferindo com o metabolismo da glicose e com a sua captação pelas células do CP, o que ocorre devido à sobreexpressão do MYC estar associada à “upregulation” dos transportadores de glucose-1 (GLUT1) e da lactato desidrogenase-A (LDHA), culminando em altas taxas de captação de glicose e glicólise, sendo que ao inibir o MYC através da administração de diclofenac ocorrerá uma regulação do metabolismo da glicose pela diminuição da expressão do GLUT1 e da LDHA. O diclofenac também poderá ser útil quando combinado com radioterapia, dado que também apresentou propriedades radiosensibilizantes (9).

Por fim, à semelhança do que já foi abordado, o ácido acetilsalicílico também inibe a COX, inibe a síntese de prostaglandinas neoplásicas e inibe o NF- κ B induzido pelo fator de necrose tumoral (TNF), auxiliando na sobreexpressão de genes supressores tumorais e na diminuição da expressão dos genes anti-apoptóticos, podendo ser um candidato ao reaproveitamento de fármacos no CP e estando também a ser avaliada a sua eficácia em combinação com estatinas através da redução dos níveis da proteína ciclina D1, cuja sobreexpressão está associada ao desenvolvimento tumoral (13). Deste modo, vários estudos indicam que os AINEs podem reduzir a probabilidade de desenvolver CP através do seu potencial efeito profilático, reduzindo também os níveis de mortalidade associada ao CP (21,122).

Relativamente ao grupo dos anti-inflamatórios esteroides, também designados de corticosteroides, a dexametasona destacou-se em estudos in silico por inibir o oncogene ERG das células neoplásicas da próstata (9,13). Porém, atualmente, a dexametasona já é utilizada em diversos protocolos convencionais de quimioterapia e radioterapia, para diversos tipos de tumores, sendo que no primeiro caso é administrada com intuito de prevenir a emese induzida pela quimioterapia e no segundo caso como profilaxia da dor induzida pela radioterapia (9,112,138).

1.2.6. Antibacterianos

Os inibidores da monoamina oxidase-A (MAO-A) ganharam visibilidade no tema do reaproveitamento de fármacos do CP após a descoberta de que níveis elevados de MAO-A estavam associados à gravidade desta neoplasia, devido à produção de espécies reativas de oxigênio, sendo que estes fármacos demonstraram capacidade para diminuir as metástases e aumentar a sobrevida em ensaios in vivo, particularmente a isoniazida que é um inibidor irreversível da MAO-A. Assim, a isoniazida pode ter particular interesse no CP metastático e em estadios mais avançados em que ocorre resistência ao tratamento quimioterápico, visto que a expressão da MAO-A também aumenta após os tratamentos com docetaxel, traduzindo-se em resistência ao tratamento quimioterápico (139).

Relativamente à minociclina, trata-se de um derivado da tetraciclina que inibe as citocinas pró-inflamatórias e as metaloproteínases que estão associadas à invasão tumoral e ao desenvolvimento de metástases e, por esse motivo, este fármaco encontra-se em ensaios associados ao tratamento do CP, tendo sido verificado que a minociclina inibe a cinase LYN, inibe o STAT3, suprime o EMT e, conseqüentemente, bloqueia o aparecimento de metástases (9,140). Já a tetraciclina quimicamente modificada, do inglês *chemically modified tetracycline* (CMT), particularmente a CMT-3, ao ativar a caspase-3 e a caspase-9 e ao inibir as metaloproteínases mostrou capacidade para induzir a apoptose em células neoplásicas de CP (9,13).

Através de estudos in silico, concluiu-se que a sulfametoxipiridazina e a azlocilina também podem vir a ser administradas no tratamento do CP, dado que estas atuam ao nível dos recetores do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) que no caso concreto do CP estão associados à angiogénese e à progressão tumoral, havendo ainda muita falta de informação acerca do efeito destes dois fármacos no tratamento do CP (141). No que diz respeito ao clofoctol, este inibe a tradução de proteínas das células neoplásicas da próstata, inibindo o crescimento do CP propriamente dito, o que se deve à indução de stress no retículo endoplasmático e aos mecanismos de proteção contra as proteínas mal enroladas que impedem a tradução proteica, para além disto, também inibe as ciclinas e promove a paragem do ciclo celular (9,13). Por fim, a nitroxolina inibe a proliferação de células endoteliais, limita a angiogénese, induz a paragem do ciclo celular através da inibição do eixo ciclina D1-Rb-Cdc25A e a apoptose das células tumorais, visto que ativa a AMPK e inibe a mTOR, diminui a expressão da proteína Cdc25A que é essencial para o bom funcionamento do ciclo celular, diminui os níveis das ciclinas D1, E, A e B1 e inibe a fosforilação da Rb (9,13,142).

1.2.7. Antivíricos

No que concerne ao grupo dos antivíricos, o nelfinavir mostrou ser um bom candidato para o tratamento do CP, tanto em monoterapia como em combinação com radioterapia ou quimioterapia, uma vez que inibe a proteólise intramembranar regulada, o STAT3 e a Akt, induz a apoptose e a autofagia, ativa a caspase 9 e a caspase 6, inibe a angiogénese e a ativação dos RA (9,13,143). Portanto, o nelfinavir impede a clivagem da endopeptidase S2P e promove a acumulação de SREBP-1 e ATF6 que induzem o stress do retículo endoplasmático e desencadeia o mecanismo de proteção contra as proteínas mal enroladas, que após ser excedido conduz à apoptose (143). O nelfinavir também inibe a ativação e expressão da enzima sintase de ácidos gordos que catalisa a síntese de ácidos gordos de cadeia longa e que se encontra sobreexpressa em diversos tumores, tendo sido classificada como um oncogene, ou seja, a sua inibição leva ao bloqueio do crescimento e da sobrevivência tumoral (143).

Os fármacos didanosina, entecavir (ETV), aciclovir, valganciclovir (VGCV), penciclovir, ganciclovir e valaciclovir demonstraram em estudos *in silico* que podem ser bons candidatos para o tratamento do CP, pois inibem a enzima PARP-1 que desempenha um papel fundamental na sinalização e reparação dos erros no DNA, portanto, ao inibir a PARP em células neoplásicas ocorrerá uma acumulação de erros que não são reparados e que levarão à morte celular, sendo que a PARP é expressa nos tumores da mama, ovário e próstata (100,144). Particularmente o ETV e o VGCV vão ter destaque mais adiante onde será abordado este e outros mecanismos de ação que lhes estão associados.

Por outro lado, o glecaprevir e o simeprevir também são fortes candidatos para serem reaproveitados no tratamento do CP, pois atuam ao nível do GPR 160 e do CRHR2 que fazem parte dos recetores acoplados à proteína G (GPCRs) que regulam o crescimento e o metabolismo celular e estão envolvidos na tumorigénese, angiogénese e apoptose de células neoplásicas. Assim sendo, determinados membros dos GPCR, nomeadamente os GPR 160 e CRHR2, estão sobreexpressos em várias neoplasias, nomeadamente no CP, sendo alvos promissores no tratamento do CP (145).

O saquinavir também apresentou bons resultados *in vitro*, quer em monoterapia, quer em combinação com 5-FU, podendo reduzir a toxicidade associada à quimioterapia (146). Deste modo, o saquinavir diminui a proliferação e a invasão celular e apresenta propriedades anti-tumorais, anti-angiogénicas e capacidade de induzir apoptose, mais concretamente através da inibição do proteossoma 20s e 26s e da inativação do NF- κ B e da PI3K/Akt. O saquinavir também mostrou propriedades radiosensibilizantes nas células neoplásicas da próstata devido à sua capacidade em inibir a função do proteossoma (146).

1.2.8. Antidepressivos

No que diz respeito aos antidepressivos tricíclicos, a nortriptilina mostrou efeitos antineoplásicos, particularmente no CP, visto que inibe a proliferação celular e induz a apoptose devido ao aumento do cálcio intracelular nas células neoplásicas da próstata e induz citotoxicidade através da interrupção do ciclo celular pela inibição da CDK1 e por inibir a expressão da Rb, afetando o complexo Rb/E2F e, conseqüentemente, inibindo a expressão de genes-alvo de E2F, visto que é necessário que ocorra a fosforilação da Rb para o E2F ser separado do complexo Rb/E2F e ativar a expressão de genes necessários para a transição da fase S (147–149).

Relativamente ao grupo dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina, a sertralina reduz a proliferação das células neoplásicas da próstata tanto in vitro como in vivo, pois também aumenta a concentração intracelular de cálcio nas células do CP e é capaz de parar o ciclo celular, induzir apoptose através da disfunção mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigénio, aumentar os níveis de peróxido de hidrogénio e da peroxidação lipídica, diminuir a glutathione, inibir a tumorigénese e a angiogénese e reduzir o potencial metastático do CP (10,135). Na base destes fenómenos destaca-se a capacidade de a sertralina diminuir os níveis da TCTP, uma proteína envolvida na tumorigénese e no crescimento celular, sendo que para além disto também diminuiu a expressão da enzima aldeído desidrogenase-1 que está associada à resistência à quimioterapia e à formação de células-estaminais cancerígenas, do CD44, do fator de transcrição 8 e do fator de ligação do intensificador linfóide 1 (135). Este fármaco também mostrou aumentar os níveis de autofagia, a caspase-3 clivada e a PARP-1 clivada e interrompe a viabilidade das células estaminais do CP através da modulação da homeostase do ferro, contudo, apesar de ainda não se conhecer o significado deste fenómeno, sabe-se que o desequilíbrio no metabolismo do ferro induz a morte celular e gera espécies reativas de oxigénio mediadas pelo ferro (135).

Portanto, as células-estaminais cancerígenas são responsáveis pela progressão tumoral e pela resistência à quimioterapia, tendo também sido descrito que o stress está associado ao desenvolvimento do CP e que a sua redução é importante para o sucesso do tratamento oncológico e daí surgiu a necessidade de se avaliar a sertralina no tratamento do CP e percebeu-se que este antidepressivo diminui a viabilidade celular das células estaminais do CP, suprime o seu crescimento, inibe a proliferação celular, a angiogénese e a migração celular tumoral e induz a autofagia nas células-estaminais cancerígenas (135).

1.2.9. Anti-hipertensores

O propranolol é um antagonista dos recetores β -adrenérgicos que parece ser vantajoso no tratamento do CP, dado que interrompe a proliferação das células neoplásicas, induz a apoptose e também inibe a enzima fosfatase ácido fosfatídico, que se encontra sobreexpressa em diversas neoplasias e, ao ser inibida, leva à acumulação de marcadores de autofagia, tais como o LC3-II e o p62. Contudo, estes resultados foram obtidos após indução com um análogo da glicose, a 2-desoxi-D-glicose (13). Deste modo, o propranolol revela-se promissor no tratamento do CP neuroendócrino, visto que diminui os marcadores neuroendócrinos, inibe a angiogénese e bloqueia as vias metabólicas CREB1-EZH2-TSP1. Assim, os antagonistas dos recetores β -adrenérgicos são fármacos de particular interesse para serem reaproveitados no tratamento do CP, pois sabe-se que a ativação destes recetores está relacionada com a angiogénese e com a proliferação e migração de células tumorais (124).

Já a prazosina é um anti-hipertensor do grupo dos antagonistas dos recetores α -adrenérgicos que demonstrou atividade anti proliferativa através da indução da paragem do ciclo celular causada pela inativação da CDK1 e posterior apoptose das células neoplásicas da próstata. A prazosina aumenta a fosfo-p38 α , a caspase 8 e a caspase 3, reduz a cinase S6 e inibe a fosforilação da PI3K dos recetores HER2/Neu, EGF e VEGF, entre outros indutores da apoptose mitocondrial (13,150). Dentro dos diuréticos, a hidroflumetiazida também apresentou resultados *in silico*, apesar do seu mecanismo de ação no CP ainda não se encontrar descrito na literatura (141).

Outra classe de anti-hipertensores que parece ser benéfica no tratamento do CP são os bloqueadores dos canais de cálcio, nomeadamente a nifedipina que demonstrou em ensaios *in vivo* que inibe o crescimento deste tipo de tumor, visto que interfere com a replicação do DNA, com o ciclo celular e com o metabolismo energético (148). Por outro lado, a nifedipina também altera o transporte de cálcio que permitem a acumulação de cálcio intracelular e que pode conduzir ao fenómeno da apoptose, sendo que este fármaco também parece inibir a angiogénese e modula a expressão génica mediada por RA, induzindo citotoxicidade nas linhas celulares que expressam estes recetores e bloqueia a proliferação celular em células neoplásicas da próstata, visto que inibe proteínas envolvidas na replicação do DNA e no ciclo celular, tais como PCNA, MCM6, MCM3 e MCM4, sendo que este fármaco afeta diversos processos metabólicos, nomeadamente o metabolismo da alanina, aspartato e glutamato (148,151).

1.2.10. Antifúngicos

A terbinafina é um fármaco antifúngico cujos estudos indicam que bloqueia a proliferação de células neoplásicas humanas, regula a progressão tumoral, influencia a angiogénese e, quando administrado por vias sistémicas, reduz a mortalidade do CP em 47% (152). Para além do mais, a terbinafina está envolvida na sinalização do p53, desencadeando a apoptose, é capaz de inibir a síntese de DNA de modo a impedir a proliferação tumoral e diminuir a síntese de esteroides, onde se inclui o colesterol que geralmente é produzido em quantidades elevadas em doentes oncológicos, dado que este fármaco inibe a monooxigenase do esqualeno que é uma enzima fundamental na síntese do colesterol (152). Contudo, ainda não se sabe ao certo qual o mecanismo de ação que permite à terbinafina ser um bom candidato para o reaproveitamento de fármacos no caso particular do CP (152).

Por outro lado, o clotrimazol também diminui a proliferação neoplásica e reduziu o número de células neoplásicas em ensaios in vitro, sendo que os mecanismos que estão associados ao potencial antineoplásico deste fármaco são a interferência no transporte iónico da membrana plasmática, a indução da paragem do ciclo celular e a inibição de enzimas glicolíticas que são fundamentais no processo do crescimento tumoral e se encontram expressas em várias neoplasias (15,153). Para além disto, o clotrimazol bloqueia a ligação da hexocinase à mitocôndria, originando a morte celular através da libertação de proteínas apoptóticas, uma vez que esta enzima fosforila a glicose no processo da glicólise e, ao ser inibida impede que a glicólise ocorra, reduzindo os níveis de ATP celular. Portanto, a hexocinase está relacionada com o crescimento tumoral, encontrando-se expressa em vários tumores e bloqueia a libertação do citocromo c da membrana mitocondrial externa, impedindo a apoptose. Deste modo, o clotrimazol também inativa a Akt, aumentando o efeito da dissociação da hexocinase, para além de afetar a fosfofrutocinase e a aldolase e de exercer um efeito agonista sobre a calmodulina e bloquear os canais de potássio ativados pelo cálcio, reduzindo proliferação celular tumoral e induzindo a apoptose (153).

Já o itraconazol, também inibe a angiogénese dado que se liga ao VDAC1 e bloqueia a sua ação no metabolismo mitocondrial e inibe a proliferação celular através da ativação da AMPK e da inibição da mTOR e de VEGFR2 e também atua na Wnt/ β -catenina, sendo que o itraconazol quando administrado em doses de 600 mg/dia apresenta atividade antineoplásica em indivíduos com CP metastático resistente à castração (9,13,154). O itraconazol parece ser benéfico tanto em monoterapia como em combinação com fármacos quimioterápicos, sendo que neste último caso melhora a taxa de sobrevivência do doente (9). Para além disto, também reverte a resistência à quimioterapia mediada pela

glicoproteína-P, particularmente no caso do docetaxel, em que o itraconazol ressensibiliza as células que lhe são resistentes (9,155).

Por fim, o cetoconazol é um antifúngico que atua de uma forma idêntica à abiraterona, ou seja, inibe seletivamente a enzima CYP17, ocorrendo uma diminuição dos níveis de testosterona circulante (86,89,156). Sabe-se que após 2 horas da administração de 200 mg de cetoconazol pela via oral os níveis séricos de testosterona total e livre reduzem significativamente, atingindo-se o nadir num período de 8 horas, sendo que este efeito é reversível, com a testosterona a atingir os níveis basais em 24 horas. Contudo, ao contrário da terapia de privação androgénica que afeta principalmente a síntese de androgénios gonadais, o cetoconazol consegue inibir a síntese de androgénios gonadais e adrenais, tendo particular interesse em doentes que apresentam variações no gene HSD3B1 que é um biomarcador de resistência à castração. Outro estudo mostrou que a administração de cetoconazol reduziu mais de 50% dos níveis de PSA em 20-75% dos indivíduos e aumentou o tempo necessário para ocorrer o aumento do PSA (3 a 14 meses) (156).

Deste modo, o cetoconazol já é considerado em alguns países um fármaco de segunda linha para o tratamento do CP resistente à castração, pois apesar de, em monoterapia, não aumentar a sobrevida dos doentes com CP, apresentou eficácia como adjuvante ou neoadjuvante da quimioterapia (156). Portanto, no caso em que o cetoconazol é administrado antes do docetaxel, verifica-se uma melhoria na sintomatologia dos doentes com CP metastático resistente à castração e aumenta a sua sobrevida global, apesar de ser expectável que os doentes respondam ao tratamento com docetaxel, independentemente do tratamento anterior com cetoconazol. No caso em que o cetoconazol é administrado após o docetaxel no CP metastático resistente à castração, percebeu-se que também apresenta benefícios, visto que num estudo com 20 indivíduos com CP metastático resistente à castração com cerca de 7 ciclos de tratamento com docetaxel, os doentes que tiveram terapia adjuvante com cetoconazol revelaram uma melhora significativa de 2 meses no tempo de progressão do tumor (156). Portanto, para além de poder ser utilizado como terapia adjuvante ou neoadjuvante, o cetoconazol também pode ser administrado em combinação com o docetaxel, nomeadamente cetoconazol 400 mg duas vezes ao dia com 55 mg/m² de docetaxel, durante 21 dias, sendo que neste caso verificou-se atividade anti tumoral significativa e o tratamento foi razoavelmente bem tolerado pelos pacientes, apesar de alguns apresentarem neutropenia e cansaço (156).

1.2.11. Imunossupressores

A primeira indicação terapêutica da talidomida foi para o tratamento dos enjoos em grávidas, no entanto, induziu diversas malformações nos fetos (13,51). Apesar disto, pode ser um dos fármacos reaproveitados no tratamento do CP, uma vez que esta apresenta atividade anti-angiogénica e o CP é conhecido por ser bastante vascularizado em comparação com o tecido benigno adjacente, contudo o seu mecanismo anti-angiogénico ainda não é totalmente claro, havendo estudos que indicam poderá estar relacionado com a inibição da secreção de citocinas angiogénicas e inibição do VEGF, FGF, PI3K/Akt/NF- κ B e mTOR (51,157). Assim sendo, foi feito um estudo em que se administrou docetaxel em combinação com talidomida e estes doentes tiveram uma menor progressão do tumor, aumento da sobrevida e melhoria dos níveis de PSA, quando comparados com os doentes que receberam apenas docetaxel (51).

Também a leflunomida poderá ser reaproveitada, visto que inibe as tirosina cinases e recetores de fatores de crescimento, como os EGFR, FGFR e PDGFR, tendo o PDGFR particular interesse no caso do CP, visto que se encontra expresso em mais de 80% dos CP resistentes à castração (9). Este fármaco mostrou inibir as células neoplásicas do CP e, quando administrado em monoterapia, reduziu o PSA em mais de 50% dos indivíduos e revelou melhoria da dor, havendo também estudos de terapias combinadas com leflunomida (9,157). Por outro lado, o sirolimus, também designado de rapamicina, inibe a mTOR e, deste modo, impede a progressão do ciclo celular, inibindo o crescimento celular do CP resistente à castração e também diminui os níveis de PSA em cerca de 50%, sendo outro dos potenciais fármacos imunossupressores a serem reaproveitados no CP (13,158).

1.2.12. Antipsicóticos

No grupo dos antipsicóticos, a risperidona destaca-se por inibir a 17- β -hidroxiesteroide desidrogenase 10 (17HSD10) que é responsável pela sobrevivência das células neoplásicas da próstata após o tratamento com terapia de privação androgénica e que se encontra sobreexpressa no CP e nas suas metástases, estando associada ao crescimento celular e tornando as células mais resistentes ao stress oxidativo, o que culmina no favorecimento da tumorigénese e em células tumorais mais agressivas, para além de ser uma enzima mitocondrial catalisadora de diversas vias metabólicas e dos seus principais substratos serem os estrogénios e androgénios (9,13,159,160). Por outro lado, no CP a 17HSD10 permite a síntese de esteroides e também está envolvida na síntese de dihidrotestosterona na ausência de testosterona, sendo um alvo útil no tratamento do CP (159,160).

Deste modo, a combinação de risperidona com ácido ruménico, à qual se atribuiu a designação de VAL401, foi testada em linhas celulares de CP e mostrou um decréscimo significativo na proliferação, crescimento e atividade celular, melhorando a sobrevivência dos doentes, o que permite concluir que será um bom candidato para o tratamento do CP. Nesta combinação administrada por via oral, o VAL401 funciona como excipiente funcional, dado que é fundamental para que a risperidona atue nas células tumorais (159,160).

Ainda no grupo dos antipsicóticos, a pimozida já tinha mostrado ser eficaz no tratamento dos tumores hepáticos, através da supressão do STAT3 e, por esse motivo, também foi estudada para o tratamento do CP, no qual induziu a paragem do ciclo celular e a apoptose, inibiu a migração de células neoplásicas da próstata, assim como o seu crescimento, através da inibição da ativação da proteína STAT3 que está envolvida na proliferação celular, angiogénese e na resistência a fármacos utilizados no tratamento desta neoplasia. A pimozida também diminuiu a expressão da ciclina D1, entre outros mecanismos que lhe permitem ser um candidato promissor para o tratamento do CP já que é bem tolerada, apesar de poder induzir toxicidade cardíaca, contudo continua a ser considerada um medicamento seguro (161,162).

1.2.13. Antiepiléticos e anticonvulsivantes

O ácido valpróico inibe as acetilases das histonas de classe I, sendo que a região do DNA que contem os principais genes anticancerígenos está associada a estas enzimas que ao serem inibidas pelo ácido valpróico deixam de silenciar estes genes. A sua administração durante longos períodos diminui a proliferação do CP, aumenta a atividade das caspases-2 e das caspases-3, diminui o processo inflamatório associado ao tumor, a proliferação de células neoplásicas e a angiogénese, aumenta a expressão do miR-34a que inibe a migração das células tumorais da próstata e estimula a proteína supressora de metástases NDRG1 (9,13). Contudo, tratamentos agudos com ácido valpróico resultaram num aumento da expressão dos RA e no aumento dos níveis de PSA, sendo possível reverter este efeito com uma administração prolongada do ácido valpróico (9). Portanto, o ácido valpróico demonstrou bons resultados quando é administrado em monoterapia prolongada, mas apresentou resultados ainda mais promissores quando administrado em combinação com fármacos citotóxicos, tais como 5-FU, epirrubicina, ciclofosfamida e doxorrubicina (141). O ácido valpróico também apresentou bons resultados com a metformina e com a sinvastatina, dois dos fármacos com potencial para serem reaproveitados no tratamento do CP e que foram anteriormente abordados, visto que com a metformina induzem uma apoptose sinérgica e inibem fortemente a proliferação de células neoplásicas da próstata e com a sinvastatina sensibilizam as células do CP para

o tratamento com docetaxel, diminuindo o fenómeno de resistência através da inibição da YAP que funciona como reguladora da transcrição e está associada ao CP (13,141).

Relativamente ao levetiracetam, este atua na proteína SV2A que se encontra sobreexpressa em CP neuroendócrinos e em mastócitos que infiltram o adenocarcinoma da próstata e, por esse motivo, em estudos in vitro e in vivo o levetiracetam inibiu a proliferação de células do CP neuroendócrino e a desgranulação dos mastócitos. Assim, o levetiracetam pode inibir o desenvolvimento do CP neuroendócrino após a terapia de privação androgénica e bloquear a progressão do adenocarcinoma através da inibição dos mastócitos. Por outro lado, à semelhança do ácido valpróico, também inibe as desacetilases das histonas, porém este estudo demonstrou que são necessárias doses extremamente elevadas de levetiracetam para provocar estes efeitos (163).

1.2.14. Bifosfonatos

O ácido zoledrónico pertence ao grupo dos bifosfonatos e é administrado em situações de osteoporose visto ter a capacidade de prevenir e tratar as lesões ósseas, pois inibe a atividade dos osteoclastos nos ossos (9,13,44,109). Devido à sua ação no osso, também tem vindo a ser utilizado no tratamento das metástases ósseas, nomeadamente no caso do CP metastático (49) e, para além disto, também demonstrou exercer mecanismos antineoplásicos no CP, nomeadamente a paragem do ciclo celular, inibição da proliferação e viabilidade celular tumoral, inibição da angiogénese, indução da apoptose associada à via do mevalonato, ativação da caspase-3 e caspase-9 e alterações na expressão das metaloproteínases. Também inibe a migração das células tumorais e impede a formação de micrometástases do CP através da inibição entre o ligando do recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL) e recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) (9,13,164).

Portanto, o ácido zoledrónico aumenta os níveis de espécies reativas de oxigénio, a expressão da proteína pró-apoptótica Bax, a permeabilidade da membrana celular e diminui a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, desencadeando a apoptose em células de CP. Além disto, o ácido zoledrónico também atua ao nível da via Ras/Erk1/2, visto que inibe a proteína Ras que está associada à sobrevivência das células tumorais e, consequentemente, o Erk 1/2, Akt e HIF-1 α , reduz a glicólise, inibe a fosforilação da Bcl-2 e da Bad e inibe a glicoproteína-P, STAT3, VEGF, FGF-2 e PDGF-BB (164).

Este bifosfonato também apresenta benefícios quando é administrado em combinação com outros fármacos, designadamente com docetaxel, em que aumentou a sobrevida dos indivíduos com CP resistente à castração, e com o celecoxib, apesar de neste caso não aumentar a sobrevida (9,13). Portanto, devido a todas estas propriedades, o ácido

zoledrónico já é utilizado em alguns países como medicamento reaproveitado no tratamento do CP (9).

1.2.15. Medicamentos para o tratamento do alcoolismo

O dissulfiram é um inibidor da glicoproteína-P com capacidade para inibir o efluxo de quimioterapia, sendo que a glicoproteína-P se encontra sobreexpressa em células neoplásicas, levando à resistência de determinados tratamentos (165). Assim sendo, quando se administra dissulfiram em combinação com doxorubicina, observa-se um aumento da citotoxicidade do fármaco quimioterápico (165). Por outro lado, o dissulfiram inibe a 5-metil citosina e a aldeído desidrogenase e, conseqüentemente, leva à acumulação de acetaldeído no sangue e inibe a oxidação do formaldeído nas células neoplásicas, originando apoptose (13). Também tem capacidade de restaurar os genes de supressão tumoral, visto que atua como um inibidor das DNA metiltransferases, diminui a metilação do APC e RARB, induz a expressão das metalotioneínas e a desmetilação do DNA em células do CP e reduz o crescimento tumoral in vivo (9,13).

1.2.16. Outros

O ormeloxifeno é um modulador dos recetores de estrogénio e mostrou ser um bom candidato ao reaproveitamento de fármacos em várias neoplasias, nomeadamente no CP, no qual bloqueou a invasão de células neoplásicas e impediu a metastização, induziu a apoptose e atrasou o crescimento tumoral o que poderá estar relacionado com a capacidade para inibir a sinalização oncogénica da β -catenina, e conseqüentemente, inibir o EMT (9,13). Este fármaco também ativa a GSK3 β , inibe o fator de transcrição 4, Mcl-1, ciclina D1 e CDK4 e induz a p21 e p27, havendo estudos que indicam que pode ser utilizado no tratamento do CP tanto em monoterapia como em combinação com outros medicamentos (166).

A mifepristona é um esteroide com ação antiprogestacional aprovado para a interrupção da gravidez, contudo mostrou ser útil no tratamento do CP hormono-sensível e CP resistente à castração devido à indução de fatores de transcrição pró-apoptóticos, à inibição do crescimento tumoral, ao bloqueio de recetores sobreexpressos nas células neoplásicas da próstata, tais como os recetores de progesterona, de estrogénio e de glucocorticoides. Assim, a administração combinada de mifepristona com outros fármacos, como corticosteroides, cetoconazol ou inibidores da 5 α -reductase evita o aumento dos níveis de androgénios em doentes com CP (9,13).

O cinacalcet é utilizado no tratamento do hiperparatiroidismo secundário e mostrou que quando administrado em combinação com irinotecano pode obter bons resultados no

tratamento do CP, o que se deve à ação do cinacalcet no GPR 160 e no CRHR2 e à ação do irinotecano no GPR 160 (145).

Relativamente ao fármaco amlexanox, este tem indicação terapêutica para o tratamento de úlceras, rinite alérgica e asma e foi envolvido em ensaios para analisar o seu potencial no tratamento do CP, visto que é um inibidor das cinases IKBKE/TBK1 que demonstrou parar o ciclo celular e induzir a apoptose (167). Portanto, após a inibição do IKBKE verificou-se uma diminuição dos níveis da proteína c-MYC e, por consequência, uma diminuição da ligação do c-MYC aos RA e como o c-MYC é regulado pela YAP, ao inibir o IKBKE os níveis da YAP também diminuiriam, porém, contraditoriamente os investigadores detetaram que a inibição da IKBKE aumentou a expressão do mRNA da YAP, o que permitiu deduzir que a diminuição nos níveis da proteína se deve a um turnover da YAP. Verificou-se também que o IKBKE está relacionado com os RA, visto que após a inibição do IKBKE ocorreu uma diminuição da expressão génica regulada pelos RA que culminou na inibição da proliferação, migração e capacidade de formação de colónias das células do CP e na redução do tamanho do tumor e no aumento da sobrevivência (167). Já o naftopidil, um antagonista dos recetores adrenérgico alfa-1-D, administrado no tratamento dos sintomas urinários associados à HBP demonstrou melhorar os resultados obtidos nas sessões de radioterapia em ensaios in vitro, verificando-se a inibição do crescimento tumoral prostático e inibição da fosforilação da Akt (9,13). Por outro lado, o naftopidil quando administrado em períodos superiores a 3 meses reduziu a incidência do CP, reduziu os níveis de Bcl2 que é um marcador da resistência à apoptose, inibiu a fosforilação de Smad2 ativada, induziu a apoptose e apresentou citotoxicidade em linhas celulares do CP (150).

Por último, a memantina é utilizada no tratamento da doença de Alzheimer, contudo induz apoptose em células neoplásicas da próstata através do aumento da caspase-3, caspase-9, da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e da CDK4, da diminuição do CCND1 e também diminuiu a expressão da proteína c-MYC, da Bcl-2, da survivina, da HIF-1 α e inibiu a progressão do ciclo celular (168). Para além disto, a memantina é um antagonista dos recetores NMDA, tal como o ifenprodil que também apresentou resultados promissores, sendo que os recetores NMDA parecem ser um alvo útil no tratamento de várias neoplasias, estando sobreexpressos no CP e o seu bloqueio aumenta a sobrevivência em doentes com tumores metastáticos. Deste modo, os antagonistas dos recetores NMDA, designadamente a memantina e o ifenprodil, também inibem linhas celulares de CP (141).

1.3. Fármacos em estudo e a sua aplicabilidade em oncologia

1.3.1. Fármaco reaproveitado: valganciclovir

O VGCV (Figura 7) é utilizado no tratamento da retinite causada por citomegalovírus em doentes adultos com síndrome de imunodeficiência adquirida e na prevenção da doença causada por citomegalovírus em adultos e crianças citomegalovírus negativos submetidos a transplante proveniente de um dador citomegalovírus positivo.

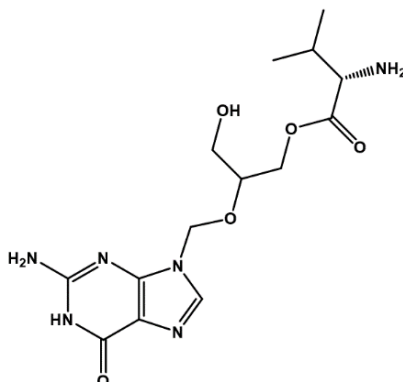


Figura 7: Estrutura química do VGCV.

Deste modo, no caso da população pediátrica, existe uma fórmula de cálculo específica para determinar a dose mais adequada de VGCV, enquanto a posologia mais comum, no caso dos adultos, é de 900 mg uma ou duas vezes ao dia. Contudo, após administração por via oral, o VGCV é metabolizado pelas esterases intestinais e hepáticas em ganciclovir (Tabela 7), sendo que 900 mg de VGCV oral, duas vezes por dia, são equivalentes em termos terapêuticos a 5 mg/kg de ganciclovir intravenoso, duas vezes por dia. Portanto, uma vez que o VGCV é um pró-fármaco do ganciclovir, os efeitos secundários do VGCV são comuns aos observados com o ganciclovir, tais como neutropenia, anemia e trombocitopenia (169).

Tabela 7: Propriedades farmacocinéticas do VGCV.

Farmacocinética	Descrição	Referências bibliográficas
Absorção	Bem absorvido no trato gastrointestinal Exposição sistêmica transitória e baixa Biodisponibilidade do ganciclovir a partir de VGCV oral: 60%	(169)
Distribuição	Ligação às proteínas plasmáticas: não foi determinada devido a rápida conversão em ganciclovir O volume de distribuição do ganciclovir intravenoso está relacionado com o peso corporal O ganciclovir atinge o líquido cefalorraquidiano	
Metabolismo	Metabolizado em ganciclovir na parede intestinal e no fígado Não foram detetados outros metabolitos O ganciclovir não é metabolizado de forma significativa	
Excreção	Predominantemente renal	

De facto, o ganciclovir continua a ser um dos fármacos de primeira linha no tratamento do citomegalovírus, contudo devido à má absorção do ganciclovir administrado por via oral foi desenvolvido o VGCV, um éster L-valina do ganciclovir, que apresenta uma biodisponibilidade 10 vezes superior, possibilitando que sejam administradas doses orais mais baixas, com menor frequência e atingindo os níveis pretendidos de ganciclovir após a metabolização do VGCV (170). Assim, o ganciclovir é um análogo sintético do nucleósido 2'-desoxiguanosina e inibe a replicação do citomegalovírus humano, vírus herpes simplex 1 e 2, vírus herpes humano 6, 7 e 8, vírus Epstein-Barr, vírus varicela-zoster e vírus da hepatite B. Porém, em células infetadas por citomegalovírus, o ganciclovir é fosforilado pela cinase viral proteica pUL97 a monofosfato de ganciclovir, seguindo-se a fosforilação pelas cinases celulares que originam o trifosfato de ganciclovir que é lentamente metabolizado. Portanto, a atividade antivírica do ganciclovir deve-se ao facto de ser um inibidor competitivo da desoxiguanosina-trifosfato e, consequentemente, inibe as DNA polimerases virais e a síntese de DNA viral e, para além disto a incorporação do trifosfato de ganciclovir no DNA viral também provoca a terminação da cadeia de DNA viral ou minimiza a sua elongação (169,170).

1.3.1.1. Importância do citomegalovírus

Existem alguns estudos do VGCV em glioblastomas, visto que o citomegalovírus foi detetado em mais de 90% dos glioblastomas, afetando a progressão tumoral. De facto, verificou-se que doentes com glioblastoma que têm baixa carga viral de citomegalovírus apresentam taxas de sobrevivência mais elevadas, ou seja, elevadas cargas virais de citomegalovírus parecem estar associadas à agressividade do tumor e tratamentos anti-citomegalovírus em murganhos diminuíram o crescimento tumoral e melhoraram a sobrevida. Para além disto, outro estudo mostrou que 102 doentes com glioblastoma primário tratados com VGCV e com o tratamento standard do tumor tiveram uma taxa de sobrevivência significativamente maior que os 231 doentes controlo (24,1 versus 13,3 meses) e 8 doentes com glioblastoma secundário tratados com VGCV e com o tratamento de segunda linha do tumor tiveram uma taxa de sobrevivência significativamente maior que os 36 doentes controlo (19,1 versus 12,7 meses), o que revela que o tratamento do citomegalovírus, nomeadamente com VGCV pode vir a ser uma terapêutica do glioblastoma (171). Assim sendo, no caso do glioblastoma, o efeito anti tumoral do VGCV parece dever-se à sua ação na replicação do vírus, sendo que estes mecanismos são semelhantes para outros tumores citomegalovírus positivos, prevendo-se que o VGCV também seja benéfico no tratamento de outros tumores citomegalovírus positivos, entre os quais o meduloblastoma, neuroblastoma, mama, cólon, próstata e ovário (171).

A literatura refere que o citomegalovírus pode ter particular interesse em situações oncológicas, visto que o seu DNA e as suas proteínas são expressos em diversos tumores e metástases, contudo estes não foram detetados nos tecidos não tumorais adjacentes e, particularmente no CP sabe-se que as infeções sexualmente transmissíveis aumentam risco de CP e que o citomegalovírus tem potencial oncogénico, tendo inclusivamente sido detetado em tecidos prostáticos malignos e pré-malignos. Para além disto, estudos com células PC-3 mostraram que o citomegalovírus promove angiogénese e ativa vias de sinalização celular cruciais na apoptose, diferenciação e proliferação celular, nomeadamente c-MYC, MAPK, p38 e Bcl-2 e há referências de que o citomegalovírus provoca inflamação da próstata, contudo os estudos indicam que não existe associação entre o citomegalovírus e o risco de aparecimento de CP, apesar de investigações mais antigas afirmarem o contrário. Outros estudos mostraram que o citomegalovírus também interfere com elementos essenciais no controlo do ciclo celular, tais como o p53, Rb, ciclinas e p21 e promove a ativação da AKT, MAPK, PI3K e mTOR, assim como elevadas taxas de divisão celular e, para além disto, o citomegalovírus controla a produção de fatores de crescimento como PDGF, IGF, EGFR e VEGF, promovendo a proliferação e migração celular e a angiogénese. Por fim, o citomegalovírus induz inflamação através da produção de citocinas pró-inflamatórias e da expressão da COX2 e da 5-lipoxigenase e neutraliza as respostas imunes que tentam eliminar as células tumorais, promovendo a sua sobrevivência (171–174).

1.3.1.2. Inibidor da PARP

Relativamente à sua potencial capacidade de iPARP importa esclarecer o mecanismo que está por trás desta ação, ou seja, o aparecimento de mutações no DNA pode desencadear a tumorigénese, sendo que as células saudáveis desenvolveram mecanismos de defesa em diversas vias moleculares que se designam DNA damage response (DDR) e que têm a capacidade de identificar e reparar o dano, contribuindo para a integridade do genoma. Portanto, a DDR inclui a reparação de danos de cadeia dupla, do inglês double-strand DNA damage breaks (DSB), nomeadamente a reparação por RH e recombinação não homóloga, assim como a reparação de danos de cadeia simples, do inglês single-strand breaks (SSB), onde se inclui a reparação por excisão, base excision repair (BER). Assim, as proteínas BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, CHEK1, CHEK2 e RAD51 estão envolvidas na reparação por RH, enquanto as PARP-1 e a PARP-2, estão associadas à via BER (46,100).

Assim, algumas destas proteínas encontram-se frequentemente mutadas nos doentes com CP, nomeadamente a BRCA2 (12–18%), seguida pela ATM (3–6%), CHEK2

(2–5%) e BRCA1 (<2%). Portanto, verifica-se uma associação entre mutações deletérias na linha germinativa de genes DDR e o CP, mais concretamente mutações germinativas BRCA1 e BRCA2 que estão associadas a um risco aumentado de CP, assim como CP mais agressivo e com maior risco de envolvimento nodal e aparecimento de metástases, uma vez que os genes BRCA1 e BRCA2 são genes supressores tumorais envolvidos na regulação da transcrição e na reparação dos DSB, nomeadamente na via RH. Ou seja, as disfunções nas DDR ocorrem tanto no CP localizado, como no CP metastático e, particularmente as mutações germinativas BRCA1 e BRCA2 contribuem para a progressão de tumores localizados e para uma evolução mais agressiva de tumores avançados. Contudo, as mutações somáticas também estão associadas ao CP, designadamente mutações somáticas BRCA1 e BRCA2 e ATM que também contribuem para a progressão do tumor e para a sua evolução para doença metastática (46).

Por sua vez, as PARP para além de atuarem como reguladoras do processo de identificação e reparação dos SSB do DNA através da BER, também participam na reparação dos DSB, pois promovem a ativação da reparação por RH e inibem as vias de reparação menos conservadoras, como a via NHEJ. Assim sendo, devido à elevada ocorrência de mutações genéticas associadas ao CP e na tentativa de aumentar a eficácia da terapêutica oncológica, aliando a isso a redução da sua toxicidade, o aumento da qualidade de vida dos doentes e a possibilidade de sensibilizar as células neoplásicas para a quimioterapia ou a radioterapia, surgiram os iPARP que consistem numa classe de fármacos anti-neoplásicos que atua nas vias de reparação do DNA, visto que a ausência das PARP contribui para a disfunção da reparação por RH, tornando as vias de reparação do DNA não conservadoras como vias dominantes (46,100).

Além disto, os iPARP atuam através do princípio da letalidade sintética, no qual a perda funcional de dois genes resulta na morte celular, enquanto a perda funcional de apenas um deles é compatível com a viabilidade celular. Isto é, células que apresentem perda funcional nos genes BRCA1 e BRCA2 não conseguem reparar danos no DNA, dependem da capacidade das PARP para os detetar e ativar vias de reparação alternativas e, portanto, tornam-se particularmente vulneráveis aos iPARP. Deste modo, os iPARP têm indicação terapêutica no tratamento de tumores com mutações nos genes BRCA1/2 ou em tumores BRCAness, visto que apresentam défices na reparação por RH, pois apesar da perda funcional de um dos genes (BRCA ou PARP) ser compatível com a viabilidade celular, a inibição da PARP em células com mutações BRCA torna-as incapazes de reparar danos no DNA, levando à acumulação erros e, conseqüentemente à morte celular (46,100).

Deste modo, os iPARP convencionais (olaparib, rucaparib, niraparib e talazoparib) podem ser utilizados quer em monoterapia, quer em combinação com outros fármacos, tais

como quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e outras terapias alvo, possibilitando a existência de efeitos sinérgicos e dificultando o desenvolvimento de resistências à terapêutica (46,100). Deste modo, especula-se que o VGCV também atue através da inibição das PARP e, caso se confirme, talvez se possa introduzir na prática clínica de forma semelhante aos iPARP convencionais.

Em suma, perante os resultados obtidos com o VGCV no glioblastoma, percebendo a influência do citomegalovírus nas diversas vias de sinalização celular e no CP, o papel dos iPARP no CP e conhecidas as premissas enunciadas anteriormente para o CP é pertinente testar o VGCV em células neoplásicas prostáticas.

1.3.2. Fármaco reaproveitado: entecavir

O ETV (Figura 8) tem indicação terapêutica para o tratamento da infeção causada pelo vírus da hepatite B, nomeadamente no tratamento de primeira linha de situações de hepatite B crónica (HBC) de doentes adultos e pediátricos com idade superior a 2 anos, sendo que o tratamento destes últimos deve ter por base a avaliação criteriosa das necessidades individuais do doente, as normas de orientação clínica do tratamento pediátrico e a informação histológica basal. A posologia recomendada do ETV é de 0,5 mg ou 1 mg uma vez por dia e está disponível em comprimidos e em solução oral, sendo que os efeitos secundários mais frequentes incluem cefaleias, insónia, fadiga, tonturas, sonolência, vômitos, diarreia, náuseas, dispepsia e aumento dos níveis de enzimas hepáticas (175,176).

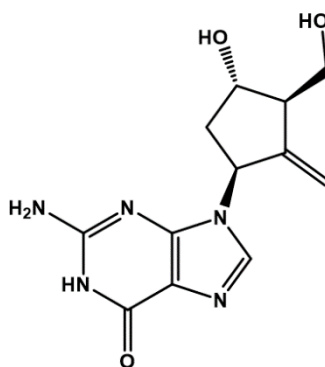


Figura 8: Estrutura química do ETV.

A atividade antivírica do ETV deve-se ao facto de ser um análogo do nucleósido guanosina com atividade contra a polimerase do vírus da hepatite B. Assim, o ETV sofre fosforilação intracelular, sendo convertido em ETV-trifosfato (forma ativa) que compete com a desoxiguanosina trifosfato que é um substrato natural da transcriptase reversa do vírus da hepatite B e, portanto, o ETV-trifosfato inibe todas as etapas do processo de replicação viral que dependem da atividade da polimerase viral, designadamente a iniciação da

polimerase do vírus da hepatite B, a transcrição reversa da cadeia negativa do DNA do vírus da hepatite B a partir do RNA mensageiro pré-genômico e a síntese da cadeia positiva do DNA do vírus da hepatite B (175–177).

De uma forma geral, o ETV é um medicamento bem tolerado, mas visto que é maioritariamente excretado pelos rins (Tabela 8) deve ser cautelosamente coadministrado com fármacos que diminuem a função renal e como não é metabolizado pelo citocromo P450 é pouco expectável que ocorram interações mediadas por estas enzimas (175).

Tabela 8: Propriedades farmacocinéticas do ETV.

Farmacocinética	Descrição	Referências bibliográficas
Absorção	Rapidamente absorvido Pico das concentrações plasmáticas: 0,5-1,5 horas Biodisponibilidade: pelo menos 70% Estado estacionário: 6-10 dias após administração 1 vez ao dia Comprimido e solução oral são bioequivalentes	(175,176)
Distribuição	Extensivamente distribuído nos tecidos Baixa ligação às proteínas séricas humanas: 13%	
Metabolismo	Não é substrato, inibidor ou indutor do citocromo P450 Fosforilado para a forma ativa de ETV-trifosfato	
Excreção	Predominantemente renal Ocorre filtração glomerular e secreção tubular Tempo de semivida do metabolito fosforilado: 15 horas	

1.3.2.1. Elevada barreira genética

O aparecimento de mutações virais/resistências genotípicas é uma situação que poderá ocorrer após a administração prolongada de determinadas terapias antivirais, inclusivamente em tratamentos da HBC, nomeadamente com lamivudina e adefovir que apresentam baixa barreira genética à resistência. Esta situação está associada ao aumento dos níveis de DNA do vírus da hepatite B e da concentração sérica das enzimas aminotransferases intracelulares hepáticas e a um agravamento da doença hepática que poderá desencadear insuficiência hepática aguda e levar à morte (178,179).

Portanto, as mutações que levam ao desenvolvimento de resistências modificam a interação entre a polimerase viral e o fármaco, modificando o efeito inibitório do fármaco sobre a polimerase do vírus da hepatite B (178). Assim, a resistência viral está dependente da capacidade de replicação do vírus em determinado ambiente, sendo que os vírus mutantes têm maior capacidade de sobrevivência na presença de antivíricos e apresentam uma capacidade de replicação idêntica à do vírus não mutante; Depende também da eficácia do antivírico e da sua capacidade e rapidez em inibir a polimerase do vírus da hepatite B; E da barreira genética à resistência, que se relaciona com o número de

mutações que o vírus precisa de acumular para se replicar na presença do antivírico, sendo que fármacos com elevada barreira genética terão menor probabilidade de desenvolver resistências. Para além destes fatores, destaca-se ainda a suscetibilidade de doentes imunodeprimidos, a não adesão à terapêutica, a dificuldade em atingir concentrações efetivas do fármaco em indivíduos obesos, a atividade enzimática do indivíduo e o uso prévio de antivíricos, que podem conduzir a resistências à terapia antivírica (179).

Porém, verifica-se que após tratamentos prolongados com ETV são poucos os doentes que desenvolvem resistência à terapêutica, sendo que em doentes-naïve a taxa de resistência ao ETV após um ano é de 0% e inferior a 1% após 2 anos, portanto o ETV apresenta uma baixa taxa de resistência antiviral, o que provavelmente se deve a três fatores, nomeadamente ao seu forte efeito antivírico, à elevada barreira genética à resistência, o que se resume à necessidade de múltiplas mutações para que seja possível o aparecimento da resistência, e aos erros de replicação das variantes resistentes (179,180). De facto, as resistências são mais frequentes em doentes não-naïve e no caso do ETV a resistência aumenta até 51% após 5 anos de tratamento com ETV em doentes resistentes à lamivudina e apenas 1,2% em doentes-naïve, sendo recomendado que no caso de doentes resistentes à terapêutica se administre uma terapia combinada, por exemplo com ETV e tenofovir, e em resistências ao ETV poderá optar-se pela monoterapia com tenofovir (178). Ou seja, a resistência ao tratamento com ETV é superior em indivíduos resistentes à lamivudina, devido à existência de mutações primárias de resistência à lamivudina e pelo desenvolvimento de mutações compensatórias de resistência ao ETV. Porém, ainda não se sabe se a resistência ao ETV pode aumentar a taxa de mutações resistentes ao tenofovir. Deste modo, apesar da elevada barreira genética à resistência, as resistências ao ETV aumentaram de 6,04% para 15,02% entre 2011 e 2017, provavelmente devido à utilização frequente de antivíricos com baixa barreira à resistência (181).

Portanto, em indivíduos com carga viral inicial elevada verifica-se que é necessário mais tempo para que se atinjam os resultados pretendidos com o tratamento e para que ocorra a diminuição da carga viral do vírus da hepatite B, sendo que a taxa de supressão viral aumenta com o tempo. Para além disto, sabe-se que indivíduos com elevada carga viral inicial de vírus da hepatite B tendem a desenvolver resistência ao ETV. Deste modo, destaca-se a necessidade de monitorizar a carga viral dos indivíduos infetados com o vírus da hepatite B de forma a poder controlar melhor o desenvolvimento de resistências (182).

1.3.2.2. Inibidor da PARP

Tal como acontece com o VGCV, estudos in silico demonstraram que o ETV pode ser um potencial candidato para o tratamento do cancro da mama, ovário e próstata, visto

que poderá inibir a enzima PARP-1 que desempenha um papel fundamental na sinalização e reparação dos erros no DNA (144). Portanto, ao inibir a PARP em células neoplásicas ocorrerá uma acumulação de erros que não são reparados e que levarão à morte celular, sendo que o iPARP só será útil na presença de mutações BRCA, como acontece em determinados tumores da mama, ovário e próstata (100,144).

1.3.2.3. Entecavir antes do início da quimioterapia

A reativação do vírus da hepatite B após tratamentos de quimioterapia e/ou imunossupressores pode ocorrer em indivíduos já curados ou em situações de HBC, tanto em tratamentos de tumores hematológicos como de tumores sólidos, estando relacionada com as características do doente (imunidade, sexo, idade, doenças pré-existentes), com as características do vírus, com a doença e com os fármacos utilizados (alto risco: anticorpos monoclonais anti-CD20 e anti-CD52, quimioterapia sistêmica; risco moderado: inibidores da tirosina cinase, corticosteroides administrados durante mais de 4 semanas; baixo risco: outros imunossupressores e corticosteroides administrados durante menos de 4 semanas), verificando-se que indivíduos com cancro da mama tratados com antraciclinas apresentam um particular risco de reativação, assim como os indivíduos com doenças reumatológicas e inflamatórias tratados com imunossupressores ou medicamentos biológicos e doentes tratados com agentes depletos de células B, nomeadamente rituximab e ofatumumab (183–185). Outros autores referem que os tratamentos com inibidores da PD-1/PDL-1 também merecem particular atenção, pois também poderão levar à reativação do vírus da hepatite B (185).

Deste modo, a reativação do vírus da hepatite B pode ocorrer no início da quimioterapia/terapia imunossupressora (2 primeiras semanas) ou até um ano após a sua interrupção, sendo uma situação que merece preocupação, visto que pode dificultar a realização dos tratamentos e levar à progressão da doença e, por outro lado, pode desencadear insuficiência hepática aguda grave e ser fatal para o doente, tornando-se fundamental o desenvolvimento de estratégias de profilaxia da reativação do vírus da hepatite B nestes doentes. Portanto, é essencial que exista uma avaliação dos doentes antes de iniciarem tratamentos quimioterápicos/ imunossupressores e, na impossibilidade de rastrear todos, tentar efetuar uma triagem dos que apresentam risco elevado ou moderado de reativação e, de seguida, iniciar o tratamento profilático antiviral que impeça a reativação do vírus da hepatite B, sendo que o ETV pode ser uma opção viável devido à sua elevada barreira genética e mostrou ser mais eficaz que a lamivudina comparativamente ao risco de hepatite (0% versus 13,3%), reativação do vírus da hepatite B (6,6% versus 30,0%) e interrupção da quimioterapia (1,6% versus 18,3%). Ou seja, a

profilaxia com o ETV não só reduziu o risco de reativação como também diminui a possibilidade de ocorrência de hepatite viral e ainda minimiza a probabilidade de interrupção da quimioterapia, contudo ainda é necessário avaliar a duração ótima da terapia antiviral profilática (183,184).

1.3.2.4. Inibidor da KDM5B como alvo terapêutico

As desmetilases específicas da histona lisina (KDM5) desempenham um papel fundamental na expressão génica e na regulação epigenética de vários cancros, inclusive são essenciais nos processos transcricionais através do controlo da metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4), nomeadamente a desmetilase 5B específica da lisina (KDM5B) que é uma enzima que se encontra sobreexpressa em diversos tumores (Tabela 9) e que está envolvida na resposta hormonal, reparação dos erros de DNA, regeneração de células-estaminais, estabilidade genómica, proliferação e diferenciação celular. A enzima KDM5B, também designada de PLU1 ou JARID1B, desmetila a H3K4 e atua como repressor transcricional em genes supressores tumorais, inativando-os (186,187). Além disto, a sobreexpressão da KDM5B leva ao desenvolvimento de resistências a medicamentos em alguns tipos de tumores, ao aparecimento de metástases e à estimulação da angiogénese através da diminuição da HOXA5 (188,189).

Assim, percebe-se que a KDM5B pode ser um alvo útil no tratamento de diversos tumores e, na verdade, sabe-se que o ETV, para além da sua atividade antivírica, atua como inibidor da KDM5B e, portanto poderá vir a ser um fármaco muito útil no combate tumoral, podendo ser utilizado com fármaco reaproveitado, tal como já comprovam alguns estudos *in silico* (186).

Deste modo, percebe-se que o ETV apresenta evidências de que poderá vir a ser reaproveitado no tratamento do cancro, sendo necessário acelerar os estudos relativos a este fármaco promissor para que possa ser testado na prática clínica o quanto antes.

Tabela 9: Importância da KDM5B no processo tumoral.

Tumor	Dados acerca da KDM5B	Referências bibliográficas
Mama	A KDM5B está associada a tumores de pior prognóstico, à resistência à terapêutica, resposta inflamatória, desenvolvimento de metástases e proliferação de células de cancro da mama através da repressão de supressores tumorais, nomeadamente BRCA1, HOXA5 e CAV1; a isoforma KDM5B-NTT está presente nas células do cancro da mama; o TFAP2C-Myc-KDM5B está associado à repressão do p21, à tumorigénese e à falha terapêutica; a inibição da KDM5B permite a expressão da HEXIM1 (supressor tumoral) e, consequentemente leva à inibição da proliferação de células tumorais e do aparecimento de metástases; a KDM5B reprime o supressor tumoral miRNA let-7e e ativa a ciclina D1; a KDM5B interage com a EMSY e suprime o miR-31 através da desmetilação da H3K4me3, para além disto também interage com os recetores de estrogénio e estimula o crescimento tumoral de cancros ER+; geralmente, cancros da mama luminais expressam mais KDM5B e os triplos negativos expressam menos KDM5B quando comparados com os ER+; os tumores HER2+ e os luminais são sensíveis à inibição da KDM5 e os inibidores da KDM5 apresentam efeito sinérgico com o trastuzumab e o lapatinib; curiosamente, nos cancros da mama triplos negativos existem entendimentos diferentes quanto ao papel da KDM5B, havendo investigadores que sugerem que poderá agir como supressor tumoral e outros que afirmam que promove as metástases e a progressão deste tipo de tumor	(186,187,189–191)
Pulmão	Tecidos tumorais pulmonares apresentam elevada expressão da KDM5B; a diminuição da expressão da KDM5B leva ao abrandamento do crescimento tumoral através da via E2F/RB1; a KDM5B está associada à resistência aos fármacos gefitinib, cisplatina e doxorrubicina; a KDM5B está relacionada com a proliferação e invasão celular, com a regulação negativa do p53, com o processo de EMT (aumento de ZEB1 e ZEB2 e diminuição do miR-200) e, consequentemente, com a migração das células tumorais e com o aparecimento de metástases (particularmente metástases cerebrais no cancro do pulmão de não-pequenas células); no cancro do pulmão de não-pequenas células a KDM5B ativa a via c-MET, leva a piores prognósticos e desencadeia resistência aos tratamentos radiológicos; contudo, existem diversos estudos contraditórios: a H3K4me3 diminui a reparação dos erros do DNA; a KDM5B facilita a reparação do DNA em células tumorais sujeitas a tratamento radiológico; a inibição da KDM5B prejudica a reparação dos danos do DNA, sensibilizando as células tumorais à radiação	(186,187,192, 193)
Pele	A influência da KDM5B no melanoma ainda não é clara, sendo que alguns estudos mostram que a KDM5B está associada a células tumorais e a metástases, enquanto outros estudos apontam que a KDM5B atua como supressor tumoral através da regulação da proteína do retinoblastoma; a KDM5B encontra-se sobreexpressa em tumores benignos e nos de evolução lenta em doentes que não respondem à inibição dos checkpoints imunológicos; a KDM5B é pouco expressa em tumores agressivos e metastáticos; a KDM5B está associada a resistências terapêuticas, sendo que a redução da sua expressão aumentou a sensibilidade dos melanócitos ao tratamento; a existência de diversas isoformas de KDM5B pode levar à progressão tumoral, sendo que a RBP2-H1 está associada a tumores de mau prognóstico; a KDM5B diminui a heterogeneidade intratumoral e também está associada à fosforilação oxidativa	(186,187,190, 193)
Bexiga	A KDM5B regula o ciclo celular das células tumorais da bexiga e constata-se uma relação inversa entre a KDM5B e a conexina 26 na qual a KDM5B se encontra sobreexpressa, ao contrário da conexina 26; a inibição da KDM5B aumenta a imunogenicidade em células tumorais da bexiga com mutação FGFR3	(186,190,194)

Estômago	A KDM5B encontra-se sobreexpressa em tumores gástricos, estando relacionada com a proliferação, migração e invasão tumoral, com a menor infiltração de células imunes no tumor e com maus prognósticos, funcionando como um promotor tumoral; a infecção pela <i>Helicobacter pylori</i> induz a sobreexpressão da KDM5B; os miR-194 e miR-29c diminuem a expressão da KDM5B e, consequentemente diminuem a proliferação e o crescimento celular tumoral, sendo que a <i>Helicobacter pylori</i> diminui o miR-29c e, consequentemente, leva à sobreexpressão da KDM5B; a KDM5B é regulada pelos fatores de transcrição E2F1, p53, Sp1 e Sp3; a sobreexpressão da KDM5B está relacionada com a resistência à cisplatina e com o aparecimento de metástases através da via Akt, sendo que os inibidores da Akt diminuem a migração das células tumorais gástricas; a KDM5B aumenta a expressão da CCND1 (proteína reguladora do ciclo celular que induz a proliferação celular e está associada ao desenvolvimento tumoral) através da H3K27me3, sendo que a diminuição da KDM5B impede a expressão da CCND1; ao inibir o NEK2, verifica-se uma diminuição da KDM5B e, consequentemente o aumento da H3K4me3; por sua vez, a sobreexpressão do NEK2 leva ao aumento da KDM5B e diminuição da H3K4me3, o que sugere que o NEK2 pode regular a expressão da KDM5B e da H3K4me3 através da via β-catenina/Myc; a via de sinalização NEK2/β-catenina/Myc/KDM5B/H3K4me3 desempenha um papel importante na carcinogênese	(186,195–197)
Fígado	A KDM5B está sobreexpressa nos hepatocarcinomas, nomeadamente nos que estão associados ao vírus da hepatite B; relaciona-se com o processo de EMT e com o desenvolvimento de metástases, proliferação tumoral, tumores de pior prognóstico e diminuição da sobrevida global; a expressão da KDM5B está relacionada com o tamanho do tumor, o estadiamento e o grau de diferenciação, além disso, quanto mais expressa estiver a KDM5B menor a inibição do miR-448; a KDM5B leva à progressão do hepatocarcinoma através do eixo miR-448/YTHDF3/ITGA6; a KDM5B inativa o PTEN, enquanto o seu silenciamento diminui a proliferação celular tumoral e induz a paragem do ciclo celular; a sobreexpressão da KDM5B desencadeia a sinalização da AKT e a diminuição da expressão da KDM5B reduz a sinalização da AKT; a depleção da KDM5B inibe a proliferação celular através da regulação das proteínas p15 e p27 e do aumento da trimetilação da H3K4; ensaios in vivo revelaram que a KDM5B e a KDM5C estão envolvidas no desenvolvimento de fibrose causada pelo consumo de álcool em murganhos fêmea através da regulação negativa do recetor de aril hidrocarboneto nas células estreladas hepáticas, enquanto os machos desenvolvem fibrose através de outro mecanismo. Neste caso, a diminuição da KDM5B e da KDM5C levou ao aumento da expressão do recetor de aril hidrocarboneto, de Arnt e de Aip em murganhos fêmea evitando a fibrose; o ETV (inibidor da KDM5B) melhora significativamente a histopatologia hepática e reduz a progressão da HBC, diminuindo a probabilidade de desenvolvimento de hepatocarcinomas e aumentando a sobrevida de indivíduos com tumor hepático relacionado com o vírus da hepatite	(180,186,188, 193,198–200)
Colorretal	A KDM5B está sobreexpressa neste tipo de tumores e está associada à progressão tumoral e a maus prognósticos, sendo que a diminuição da sua expressão aumenta a trimetilação da H3K4 na região p16/INK4A que suprime o tumor; a diminuição da KDM5B leva à apoptose e inibição da migração, invasão e proliferação das células tumorais HT-29 e em ensaios in vivo também diminui o crescimento tumoral, já a sua sobreexpressão diminui a CCL14 e ativa a via Wnt/β-catenina, levando à progressão tumoral; a KDM5B inibe a expressão da CDX2 (fundamental para a sinalização da via Wnt/β-catenina) através da desmetilação da H3K4me3; a sobreexpressão do NEK2 é associada à menor expressão de β-catenina ao nível da membrana celular e à acumulação de β-catenina no citoplasma e no núcleo das células tumorais	(186,197,201, 202)

Próstata	Avaliou-se a utilização de microRNA na regulação da KDM5B e constatou-se que a expressão do miR-29a inibe a proliferação de células neoplásicas da próstata e induz a sua apoptose através da diminuição da expressão da KDM5B e que o miR-137 atua como supressor tumoral do CP; a H3K4me3 está associada à carcinogênese prostática, sendo que a inativação do Skp2 diminuiu a H3K4me3 e, consequentemente reduziu a proliferação e a migração celular; foi possível detetar a KDM5B em adenocarcinomas metastáticos e tumores neuroendócrinos; o gene supressor tumoral PTEN encontra-se mutado em vários tipos de tumores e atua como uma fosfatase que desfosforila o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) em fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), sendo que a proporção de PIP3/PIP2 é equilibrada não só pela atividade da PTEN, mas também pela PI3K. Portanto, a perda de função do PTEN leva à acumulação de PIP3 na membrana celular e ao aumento da atividade da via PI3K/AKT, o que culmina na desregulação de diversas vias de sinalização. Assim sendo, a literatura indica que a KDM5B ativa a via de sinalização PI3K/AKT, enquanto a diminuição da expressão da KDM5B diminui a sinalização da AKT e reduziu significativamente os níveis de P110α (subunidade da PI3K) e de PIP3, culminando na diminuição da proliferação de células de CP e na supressão da tumorigênese; a KDM5B está sobreexpressa nos tecidos tumorais prostáticos, nomeadamente em murganhos com CP que não expressam PTEN e que apresentam uma hiperativação da AKT devido à ausência da PTEN; A KDM5B está associada a tumores de estadio avançado e de mau prognóstico; a KDM5B liga-se aos RA (essenciais para o desenvolvimento/progressão do CP) e aumenta a sua atividade transcricional; 5–6% dos indivíduos com CP apresentam amplificação do número de cópias KDM5B e uma percentagem inferior a 1% apresenta deleção heterozigótica da KDM5B; a KDM5B está associada à viabilidade das células neoplásicas prostáticas	(186–189,193,203)
Outros	À semelhança dos outros tumores, a KDM5B também se encontra sobreexpressa em situações de leucemia linfoblástica aguda, cancro da cabeça e pescoço, esófago, rim, ovário, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, glioma, leucemia mielóide crónica, entre outros; na maioria destes casos a KDM5B também desempenha um papel importante no desenvolvimento de metástases e na proliferação de células tumorais, enquanto o seu silenciamento diminui o crescimento celular	(186,187,193)

1.3.3. Fármaco de referência: fluorouracilo

O 5-FU (Figura 9) é um fármaco quimioterápico que pertence à classe dos antimetabolitos e à família das fluoropirimidinas, sendo um análogo do uracilo com um átomo de flúor em vez do átomo de hidrogênio. Ou seja, embora as dimensões do átomo de flúor sejam semelhantes às do hidrogênio, esta substituição altera a reatividade do anel. Assim, o 5-FU interfere com a síntese do DNA após a conversão no desoxinucleótido ativo e bloqueia a conversão do ácido desoxiuridílico em ácido timidílico através da inibição da enzima timidilato sintetase. Além do mais, o 5-FU liga-se ao DNA, provocando danos na sequência de nucleotídeos e, em última instância também interfere com a síntese de RNA e, conseqüentemente, com a síntese proteica (64,204,205).

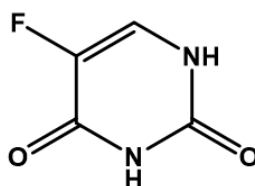


Figura 9: Estrutura química do 5-FU.

O fármaco 5-FU tem indicação terapêutica para o tratamento de diversos tumores, tais como o colorretal, gástrico, pancreático, esofágico, mama e cabeça e pescoço, podendo nestes casos ser administrado por via intravenosa e/ou intra-arterial, sendo que as doses variam de acordo com os diferentes protocolos de tratamento, o tipo de tumor e as características do doente (64). Por outro lado, o 5-FU também se encontra comercializado em formas farmacêuticas de uso tópico para ser administrado em lesões pré-cancerígenas, tais como a queratose actínica (205). Porém, o 5-FU é uma molécula polar com baixa afinidade à membrana celular e, conseqüentemente quando administrado topicamente apresenta baixa capacidade de penetração nas camadas profundas da pele (Tabela 10), baixa biodisponibilidade e pouca eficácia, necessitando de doses elevadas para obter o efeito terapêutico pretendido, o que origina um aumento dos efeitos secundários e o desenvolvimento de resistências (205).

Curiosamente, o 5-FU continua a ser dos fármacos mais utilizados nos regimes de quimioterapia atuais, apesar dos efeitos secundários graves e muito frequentes que incluem mielossupressão, anemia, alopecia, hiperuricemia, toxicidade cardíaca e gastrointestinal, mucosites, aparecimento de infecções, náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, entre outros (64,204).

Tabela 10: Propriedades farmacocinéticas do 5-FU.

Farmacocinética	Descrição	Referências bibliográficas
Absorção	Uso tópico: cerca de 10% da dose é absorvida sistemicamente	(64,206)
Distribuição	Uso sistêmico: distribuído rapidamente pelos fluídos corporais, sendo captado maioritariamente por tecidos com divisão celular ativa. Penetra no líquido cefalorraquidiano e no tecido cerebral	
Metabolismo	Uso sistêmico: 80-85% é metabolizado pela enzima di-hidropirimidina desidrogenase originando o di-hidro-5-fluorouracilo e, por sua vez, a di-hidropirimidinase cliva o anel da pirimidina para produzir o ácido 5-fluoro-ureidopropiónico que é clivado pela β -ureido-propionase em α -fluoro- β -alanina que será eliminada na urina	
Excreção	Uso sistêmico: eliminado ao final de 3 horas Cerca de 15% da dose é excretada inalterada na urina após 6 horas e a restante é metabolizada no fígado em metabolitos inativos	

Apesar do 5-FU não estar indicado para o tratamento do CP, a verdade é que este mostrou capacidade para radiosensibilizar células tumorais prostáticas e, sendo que o 5-FU é potenciado pela redução de folatos e sabendo que as células do CP sobreexpressam PSMA que é uma folato hidrolase verifica-se que fármaco também tem efeito no CP, existindo inclusivamente alguns países que o utilizam no tratamento do CP (146,205).

2. Objetivos

Apesar de já terem sido identificados diversos fármacos com potencial para serem reaproveitados no tratamento do CP, ainda é necessário percorrer um longo caminho na tentativa de encontrar uma terapêutica capaz de colmatar as lacunas dos tratamentos atualmente utilizados, tentando diminuir as resistências à terapêutica e os efeitos secundários exacerbados, aumentando a qualidade de vida dos doentes oncológicos e a sua esperança média de vida (207). Neste sentido, é necessário acelerar o processo do reaproveitamento de fármacos, nomeadamente testar in vitro aqueles que demonstraram bons resultados em estudos in silico, tentando perceber também se podem ser combinados com outros fármacos de referência.

Assim, pretende-se avaliar se o VGCV e o ETV apresentam efeitos citotóxicos e terapêuticos (atividade anticancerígena) em células PC-3 da próstata quando testados isoladamente. Em caso afirmativo, seguir-se-ão os testes de combinação com o fármaco quimioterápico de referência 5-FU e, deste modo, perceber-se-á se os resultados dos estudos de combinação são superiores aos resultados obtidos com os fármacos isoladamente. Contudo, o 5-FU não é um fármaco de primeira linha no tratamento do CP e, por esse motivo, avaliar-se-á também a sua eficácia no tratamento do CP.

3. Material e métodos

3.1. Produtos químicos

O meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com uma solução de penicilina-estreptomicina a 1% e soro bovino fetal (FBS) a 10%, tendo sido adquiridos na Millipore Sigma (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), assim como o tampão fosfato salino (PBS) e o dimetilsulfóxido (DMSO). Já a solução de tripsina-ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,25% e o azul de tripano foram obtidos na Gibco (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Os fármacos VGCV, ETV e 5-FU e o brometo de tiazolil azul de tetrazólio (MTT) foram obtidos via Sigma-Aldrich (Merck, Algés, Portugal).

3.2. Linha celular e cultura de células

Foi utilizada a linha celular PC-3 da próstata de um homem caucasiano de 62 anos que apresentava um adenocarcinoma prostático de grau IV com metástases ósseas para avaliar a citotoxicidade do VGCV, ETV e 5-FU (208). As células foram adquiridas na American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), mantidas numa incubadora a 37°C e 5% de dióxido de carbono em DMEM suplementado com uma solução de penicilina-estreptomicina a 1% e FBS a 10%, sendo que o meio de cultura era substituído 2 vezes por semana em que uma delas coincidia com o split das células.

É também importante referir que os procedimentos foram realizados numa câmara de fluxo laminar vertical utilizando material esterilizado.

3.3. Plaqueamento das células

Quando as células PC-3 se encontram confluentes (entre 75-80%) é necessário remover o meio de cultura e efetuar a lavagem com PBS, aspirando-o de seguida. Posteriormente é preciso destacar as células da parede do frasco e para isso efetua-se a tripsinização das células com uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% seguida de uma incubação de 5 minutos a 37°C e 5% de dióxido de carbono. Depois disto, o efeito da tripsina é inibido pela adição de meio de cultura e a suspensão celular obtida é centrifugada durante 5 minutos a 1100 rotações por minuto, seguindo-se a substituição do sobrenadante por meio de cultura novo e a ressuspensão das células.

De seguida, é feita a contagem das células viáveis com recurso ao azul de tripano que cora exclusivamente as células que apresentam a membrana celular comprometida, com

a câmara de Neubauer e com o microscópio Leica DMI 6000B equipado com câmara Leica DFC350 FX (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Portanto, pretendia-se que as placas de 96 poços contivessem 5000 células PC-3 por poço, tendo sido deixadas a aderir durante 24 horas.

3.4. Tratamento das células

A citotoxicidade do ETV sozinho foi avaliada após períodos de 24 horas, 48 horas e 72 horas com concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μM . Já o VGCV e o 5-FU sozinhos foram avaliados apenas após 48 horas usando também concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μM . Para além disto, também se analisou qual a metade da concentração inibitória máxima (IC_{50}) de 5-FU, ou seja, o IC_{50} do 5-FU também foi estudado sozinho após um período de 48 horas. Relativamente aos estudos de combinação, foi analisado o IC_{50} de 5-FU de 48 horas em combinação com ETV nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μM após 24 horas, 48 horas e 72 horas, sendo que a exposição aos fármacos foi feita ao mesmo tempo.

No que diz respeito às células de controlo, estas foram expostas a uma concentração de 0,1% de DMSO. Para além disto, o DMSO também foi utilizado para dissolver o VGCV, ETV e 5-FU (Figura 10).

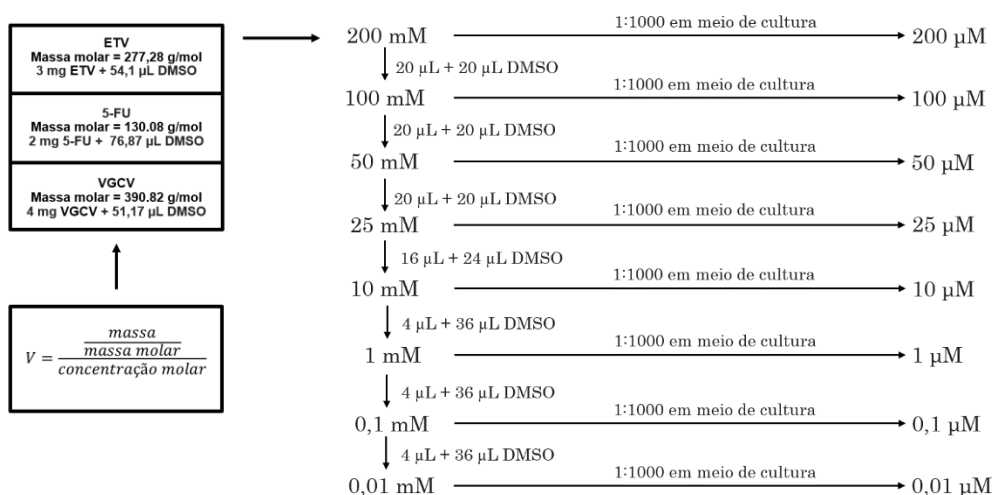


Figura 10: Preparação das diferentes concentrações de cada um dos fármacos estudados.

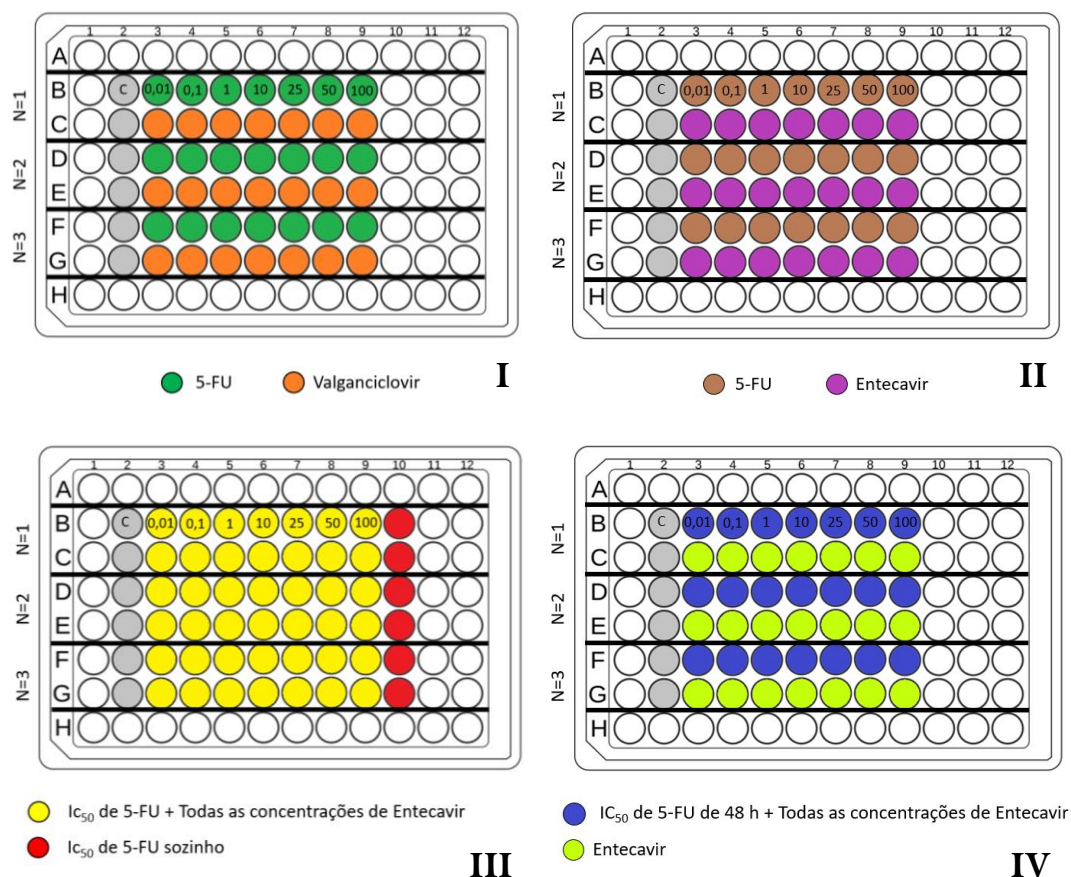


Figura 11: I - Design da placa de 5-FU sozinho e VGCV sozinho em concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μ M (48 horas); II - Design da placa de 5-FU sozinho e ETV sozinho em concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μ M (48 horas); III - Design da placa de IC_{50} de 5-FU sozinho (48 horas) e IC_{50} de 5-FU de 48 horas em combinação com ETV em concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μ M (48 horas); IV - Design da placa do IC_{50} de 5-FU de 48 horas em combinação com ETV em concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μ M e ETV sozinho (uma placa para 24 horas e outra para 72 horas).

3.5. Avaliação morfológica

A avaliação morfológica das células PC-3 foi feita após o tempo de exposição determinado para cada experiência e foi realizado com recurso ao microscópio Leica DMI 6000B equipado com câmara Leica DFC350 FX e as imagens foram obtidas através do software de imagem Leica LAS X (v3.7.4) (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.6. Avaliação da viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade utilizado foi o método colorimétrico do MTT que avalia a viabilidade das células após o tratamento com os fármacos em comparação com as células controlo, ou seja, este ensaio avalia a função mitocondrial das células PC-3 e, portanto se as mitocôndrias estiverem funcionais o MTT

é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais, formando cristais de formazan que consiste num produto de cor arroxeadada e, quanto mais intensa for a cor em cada poço, maior a viabilidade celular e, conseqüentemente, maior o valor de absorvância (209).

Assim, o ensaio do MTT é feito na ausência de luz e consiste em aspirar o meio de cultura dos poços, após o tempo delineado para a atuação do fármaco, seguido da adição de 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em PBS) a cada poço da placa e da incubação de 2 horas a 37°C e 5% de dióxido de carbono durante a qual se formarão os cristais de formazan. Após este período, aspira-se o MTT e adiciona-se 100 µL de DMSO a cada poço com o intuito de solubilizar os cristais de formazan e, seguidamente, a placa é colocada num leitor de placas automático (Tecan Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) que a submeterá a agitação e lerá a absorvância a 570 nm.

3.7. Análise estatística

O software utilizado para realizar os gráficos de viabilidade celular foi o GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), sendo os resultados apresentados através da média da viabilidade celular $\pm$ desvio padrão.

Assim, para efetuar a comparação entre o grupo de controlo e o grupo experimental de cada concentração de fármaco estudado isoladamente foi utilizado o teste ANOVA de um fator, através do método de comparações múltiplas de Dunnett. Relativamente ao estudo de combinações, recorreu-se ao teste ANOVA de dois fatores que tem como objetivo comparar o resultado da combinação com os resultados de cada fármaco isoladamente na respetiva concentração. Para além disto, a significância estatística foi estabelecida para valores de $p < 0,05$, sendo representados através de *, **, *** e **** que representam, respetivamente $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$.

No que diz respeito às curvas dose-resposta, os resultados foram primeiramente normalizados, sendo comparados com a média da absorvância dos controlos, e foram posteriormente apresentados usando a regressão não-linear das concentrações logarítmicas dos fármacos. O IC_{50} foi obtido através do mesmo software, recorrendo às curvas dose-resposta obtidas.

4. Resultados

4.1. Citotoxicidade do 5-FU

Foi avaliada a eficácia do 5-FU isoladamente no tratamento do CP (células PC-3), nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μM em 48 horas, sendo que este estudo foi efetuado em três experiências independentes cada uma com $n=3$. De seguida, através da curva dose-resposta, obteve-se o valor do IC_{50} de 5-FU referente ao estudo de 48 horas que, por sua vez, também foi testado isoladamente durante um período de 48 horas.

Deste modo, os resultados da avaliação morfológica e da viabilidade celular do 5-FU testado isoladamente estão representados nas Figura 12 e Figura 13, respetivamente, podendo observar-se que após 48 horas o 5-FU diminui significativamente a viabilidade celular das células PC-3, sendo que, de uma maneira geral, a viabilidade celular é menor em concentrações superiores do fármaco. Ou seja, concentrações iguais ou superiores a 10 μM estão relacionadas com menor viabilidade celular e com concentrações iguais ou superiores a 25 μM é possível diminuir a viabilidade celular para cerca de 50%.

O IC_{50} corresponde à concentração necessária para inibir a viabilidade celular em 50% e foi obtido através da curva dose-resposta para 48 horas, através da qual se obteve o valor de 3,219 μM (Figura 14), o que comparativamente aos resultados do gráfico de barras da viabilidade celular revelou ser um valor foi muito baixo, visto que na Figura 13 a viabilidade celular só atinge aproximadamente 50% com concentrações iguais ou superiores a 25 μM de 5-FU, porém a Figura 15 comprova que a concentração de 3,219 μM de 5-FU durante 48 horas diminui a viabilidade celular para cerca de 50%.

Conclui-se que o 5-FU provoca redução da viabilidade celular nas células PC-3, principalmente em concentrações mais elevadas, embora pareça ter uma menor atividade citotóxica no CP do que nos tumores em que é usado como tratamento de primeira linha.

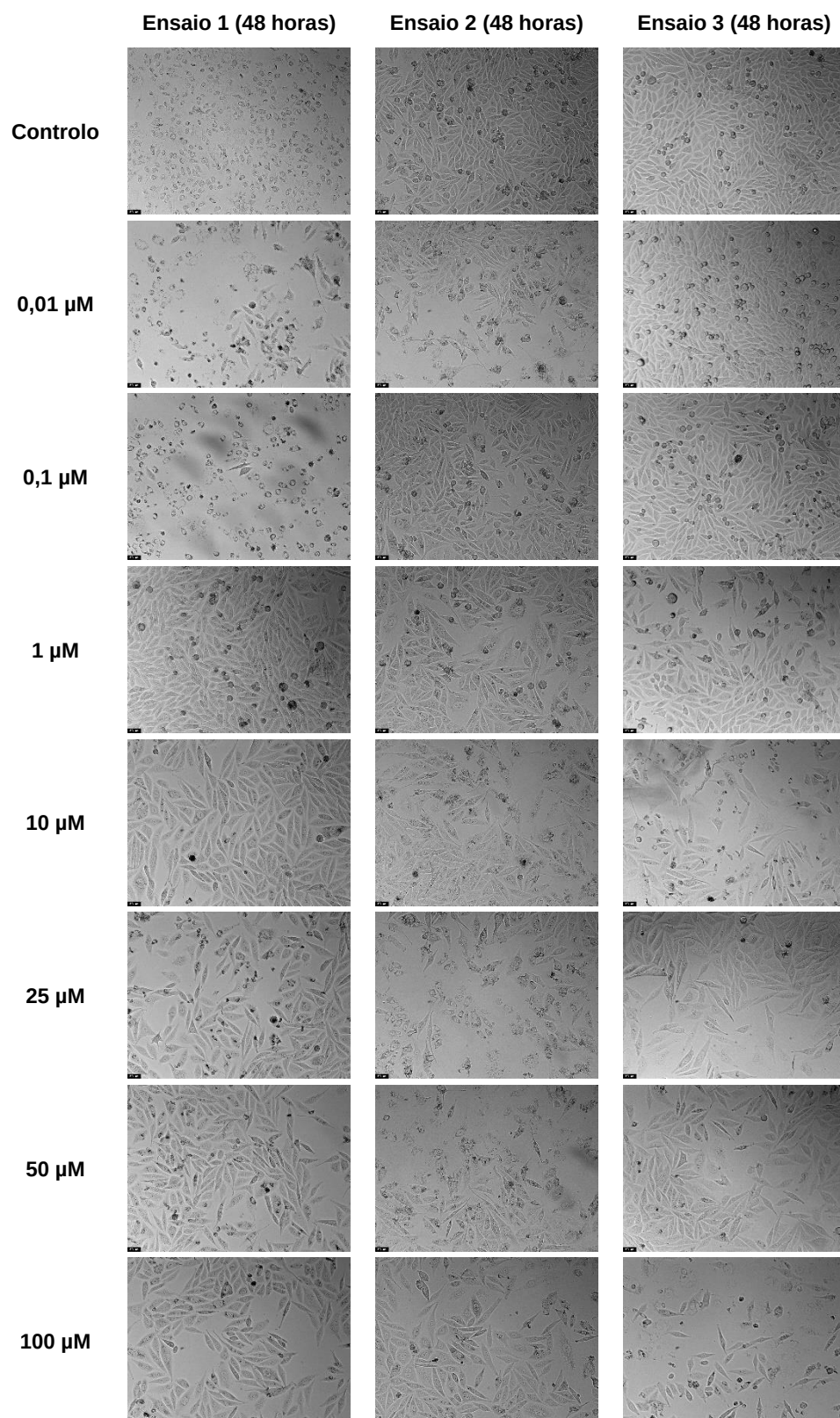


Figura 12: Resultados referentes a três experiências independentes onde se efetuou a avaliação morfológica de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de 5-FU (0,01-100 μM) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 μm .

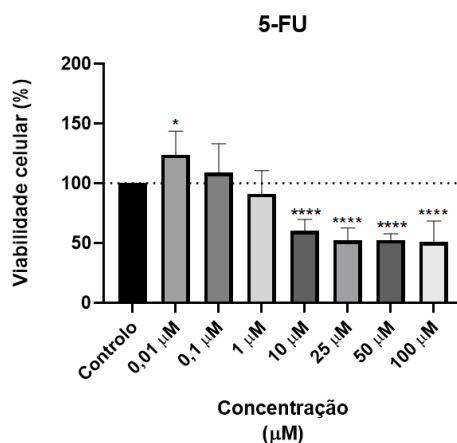


Figura 13: Resultados da viabilidade celular das células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de 5-FU (0,01-100 µM) durante 48 horas. A viabilidade celular reflete a citotoxicidade do 5-FU e foi determinada com recurso ao ensaio do MTT, sendo que as células controlo foram tratadas com 0,1% de DMSO (veículo). Os resultados são apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=9). * Estatisticamente significativo vs. controlo (veículo) com $p < 0,05$; **** Estatisticamente significativo vs. controlo (veículo) com $p < 0,0001$.

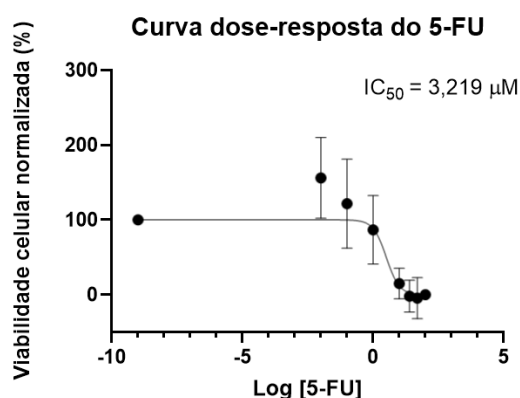


Figura 14: Resultados do IC_{50} e da curva dose-resposta obtida após exposição das células PC-3 a concentrações crescentes de 5-FU (0,01-100 µM) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A viabilidade celular foi determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados foram normalizados e apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=9).

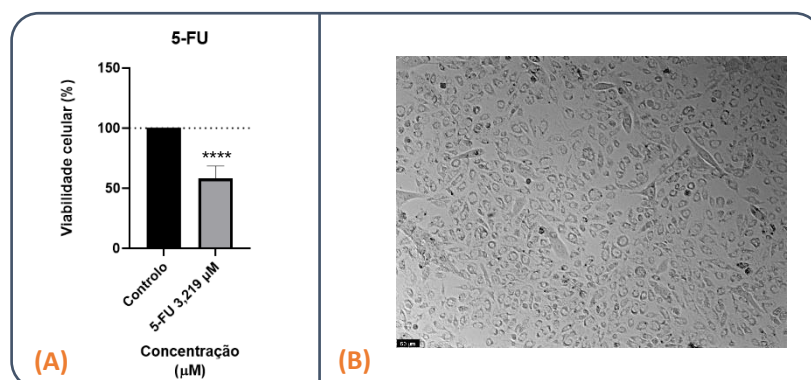
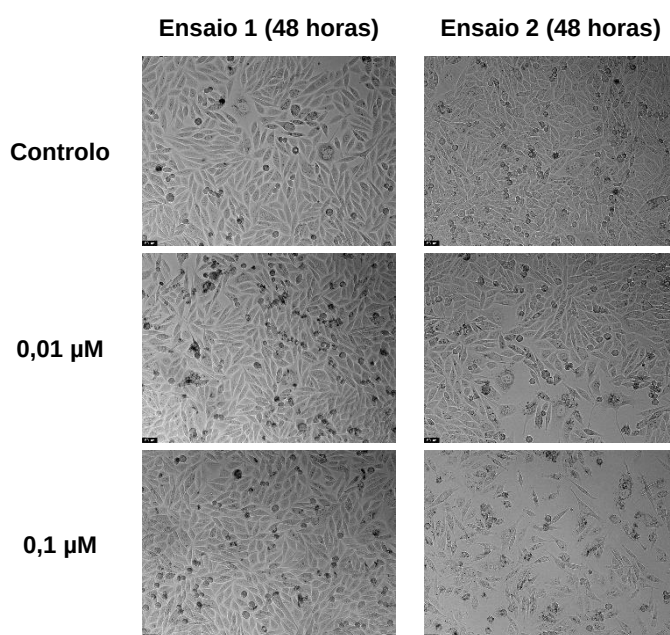


Figura 15: (A) Resultados da viabilidade celular de células PC-3 após exposição à concentração de 3,219 µM de 5-FU (correspondente ao valor de IC_{50}) durante 48 horas. A viabilidade celular reflete a citotoxicidade do 5-FU e foi determinada com recurso ao ensaio do MTT, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). Os resultados são apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=3). **** Estatisticamente significativo vs. controlo (veículo) com $p < 0,0001$. (B) Resultados da avaliação morfológica de células PC-3 após exposição à concentração de 3,219 µM de 5-FU (correspondente ao valor de IC_{50}) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 µm.

4.2. Citotoxicidade do VGCV

O VGCV foi um dos fármacos reaproveitados que suscitou interesse e que foi selecionado para ser testado nas células PC-3, de modo a perceber se teria efeito citotóxico nesta linha celular. A atividade do VGCV nas células PC-3 começou por ser testada isoladamente nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μM em 48 horas ($n=3$), porém como os resultados obtidos não foram os pretendidos, foi realizada uma repetição desta experiência com as mesmas concentrações e a mesma duração, ou seja, no total, foram realizadas 2 experiências independentes cada uma com $n=3$.

Assim, os resultados da avaliação morfológica e da viabilidade celular do VGCV testado isoladamente estão representados nas Figura 16 e Figura 17, respetivamente, podendo observar-se que após 48 horas o VGCV não diminui a viabilidade celular das células PC-3, não existindo citotoxicidade significativa nem relação entre o aumento da dose de VGCV e a viabilidade celular, verificando-se resultados discrepantes quando comparados os dois ensaios. Consequentemente, também não foi possível determinar o IC_{50} através da curva dose-resposta para 48 horas (Figura 17). Conclui-se, assim, que o VGCV não teve capacidade para diminuir a viabilidade celular da linha PC-3 no estudo de 48 horas, o que levou a que este fármaco não fosse testado noutros períodos de tempo nem nos estudos de combinação, visto não provocar citotoxicidade nesta linha celular.



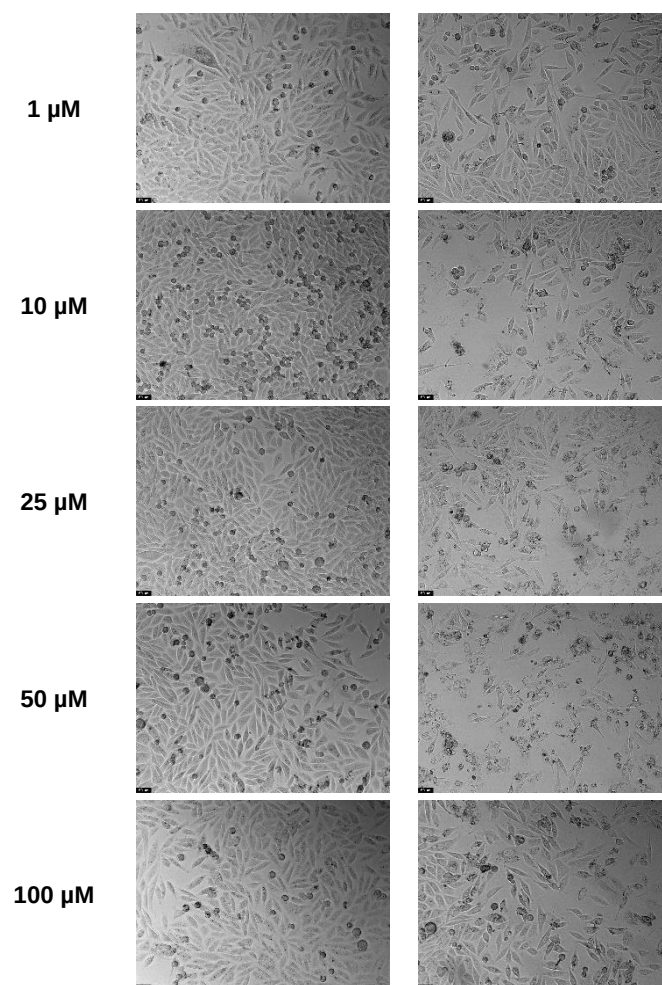
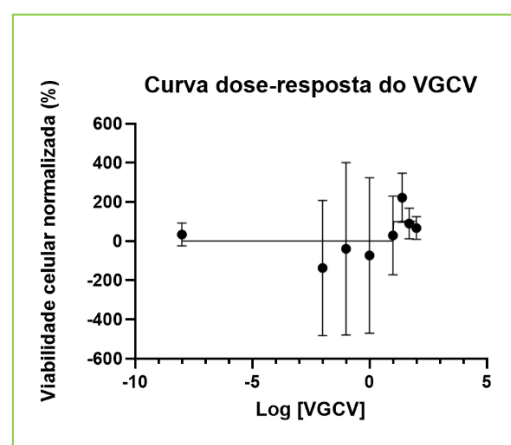
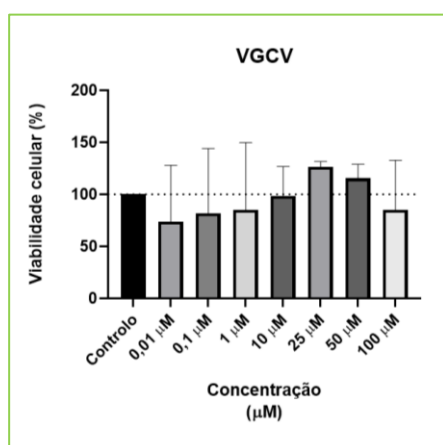


Figura 16: Resultados referentes a duas experiências independentes onde se efetuou a avaliação morfológica de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de VGCV (0,01-100 μM) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 μm .



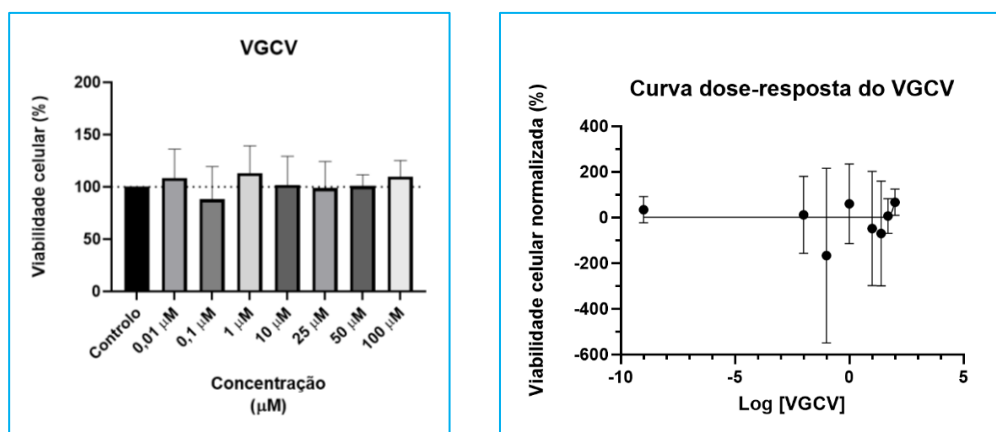


Figura 17: Os resultados a verde referem-se ao ensaio 1, enquanto os resultados a azul remetem para o ensaio 2. À esquerda apresentam-se os resultados da viabilidade celular de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de VGCV (0,01-100 μM) durante 48 horas. A viabilidade celular reflete a inexistência de citotoxicidade provocada pelo VGCV e foi determinada com recurso ao ensaio do MTT, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). Os resultados são apresentados através da média ± desvio padrão (n=3 e n=3). À direita é possível observar as respetivas curvas dose-resposta obtidas após exposição das células PC-3 a concentrações crescentes de VGCV (0,01-100 μM) durante 48 horas, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). Não foi possível calcular o IC₅₀ do VGCV, embora a viabilidade celular tenha sido determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados foram normalizados e apresentados através da média ± desvio padrão (n=3 e n=3).

4.3. Citotoxicidade do ETV

O ETV foi o outro fármaco reaproveitado testado nas células PC-3, tendo-se avaliado a sua eficácia isoladamente no tratamento do CP nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μM a três tempos (24, 48 e 72 horas). De seguida, através da curva dose-resposta relativa ao ensaio de 48 horas, obteve-se o valor do IC₅₀ de ETV. Deste modo, os resultados da avaliação morfológica e da viabilidade celular do ETV testado isoladamente estão representados nas Figura 18 e Figura 19, respetivamente, podendo observar-se que o ETV diminuiu a viabilidade celular das células PC-3 em todas as concentrações e tempos testados, havendo uma aparente relação com o fator tempo. Assim, a viabilidade celular começando a diminuir claramente após as 72 horas, sendo que, de uma maneira geral, a viabilidade celular é menor em concentrações superiores do fármaco e a concentração de 50 μM (72 horas) está relacionada com menor viabilidade celular, diminuindo-a para cerca de 50% (Figura 19). O IC₅₀ obtido através da curva dose-resposta para 48 horas foi 0,06057 μM (Figura 20), o que comparativamente aos resultados do gráfico de barras da viabilidade celular revelou ser um valor extremamente baixo. Porém, em 48 horas observou-se que o valor de IC₅₀ do ETV foi inclusivamente mais baixo do que o do 5-FU (3,219 μM).

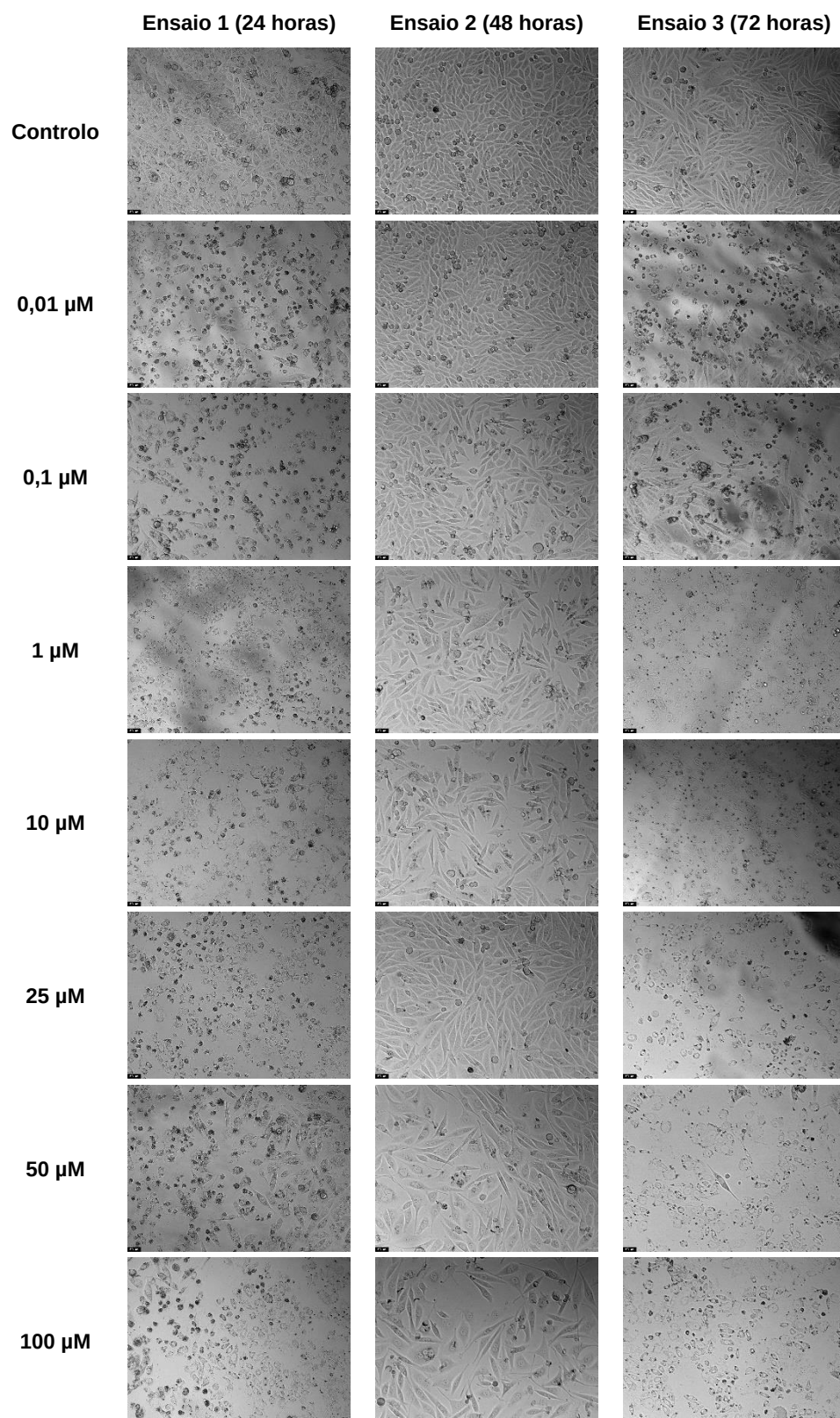


Figura 18: Resultados referentes a três experiências independentes onde se efetuou a avaliação morfológica de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de ETV (0,01-100 μM) durante 24 horas (primeira coluna), 48 horas (segunda coluna) e 72 horas (terceira coluna), sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 μm .

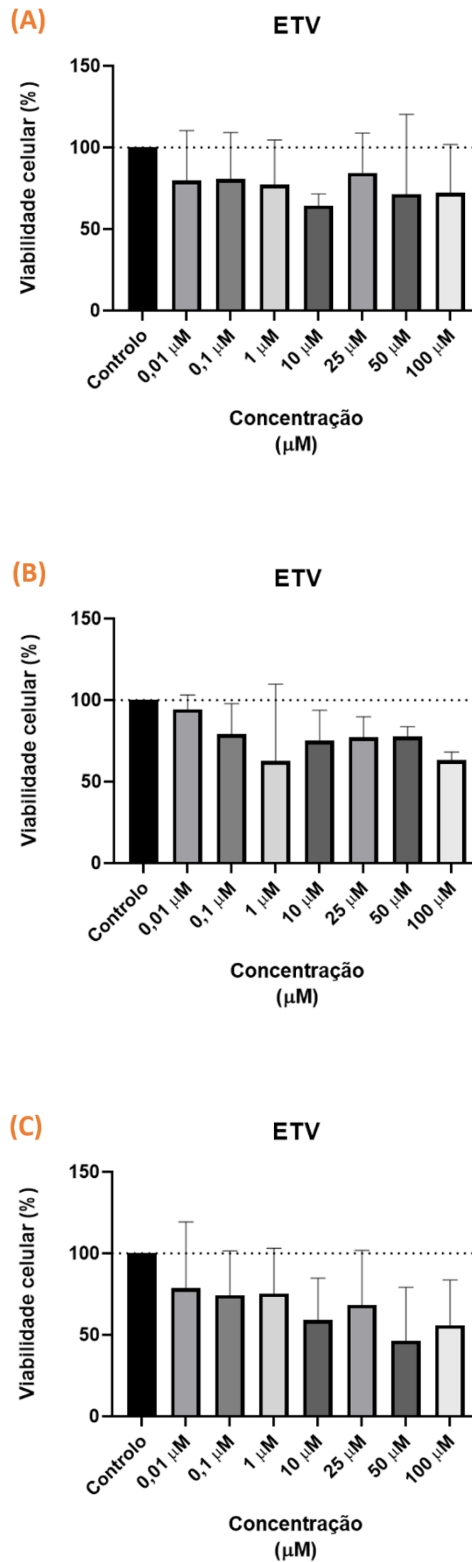


Figura 19: Resultados da viabilidade celular de células PC-3 após exposição a concentrações crescentes de ETV (0,01-100 μM) durante 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). A viabilidade celular reflete a citotoxicidade do ETV e foi determinada com recurso ao ensaio do MTT, sendo que as células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). Os resultados são apresentados através da média $\pm$ desvio padrão (n=3 para 24, 48 e 72 horas).

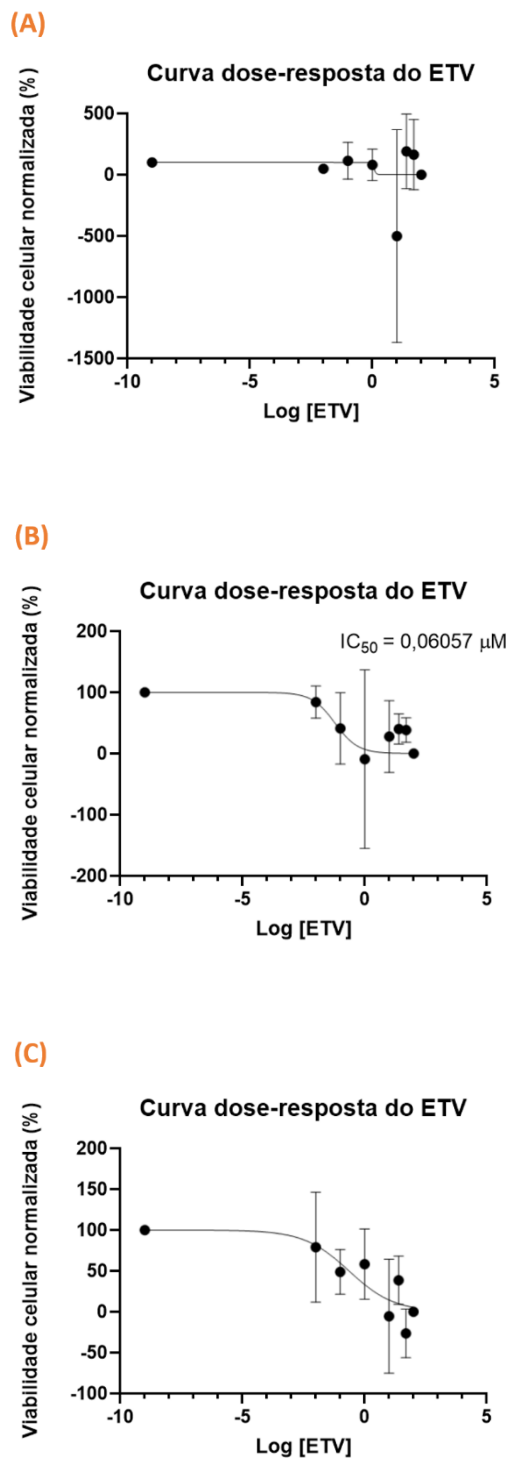


Figura 20: Resultados do IC_{50} e das curvas dose-resposta obtidas após exposição das células PC-3 a concentrações crescentes de ETV (0,01-100 μM) durante 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C), sendo que as células controle foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A viabilidade celular foi determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados foram normalizados e apresentados através da média $\pm$ desvio padrão ($n=3$ para 24, 48 e 72 horas).

4.4. Citotoxicidade das combinações

Anteriormente determinou-se o IC₅₀ do 5-FU e do ETV, ao contrário do que aconteceu com o VGCV que mostrou não ser ativo na linha celular PC-3. Assim, após testar cada fármaco isoladamente seguiu-se a testagem das combinações do 5-FU e do ETV, não tendo sido feitos estudos de combinação do 5-FU com o VGCV precisamente pelos fracos resultados obtidos anteriormente. Portanto, foi testado o IC₅₀ do 5-FU obtido nos estudos de 48 horas com todas as concentrações de ETV (0,01-100 µM) durante 24, 48 e 72 horas, tratando-se de uma combinação com os fármacos a serem adicionados ao mesmo tempo.

Os resultados da avaliação morfológica e da viabilidade celular são apresentados na Figura 21 e Figura 22, respectivamente. A combinação do valor do IC₅₀ do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 µM) com concentrações crescentes de ETV (0,01-100 µM) adicionados ao mesmo tempo no estudo de 24 horas não mostrou uma relação direta entre o aumento da dose de ETV e a diminuição da viabilidade celular, havendo variabilidade da viabilidade celular (Figura 22A). Já no estudo de 48 horas, foi possível verificar uma ligeira relação entre o aumento da dose do ETV e a diminuição da viabilidade celular (Figura 22B), porém é no estudo de 72 horas que se percebe verdadeiramente que a combinação do valor do IC₅₀ do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 µM) com concentrações crescentes de ETV (0,01-100 µM) adicionados ao mesmo tempo apresenta melhores resultados do que os fármacos isoladamente (Figura 22C), sendo possível observar que existe uma relação com o fator tempo, visto que os resultados do estudo de 72 horas foram superiores aos restantes e, inclusivamente, no estudo de 72 horas os 50 µM de ETV apresentam efeito citotóxico superior ao IC₅₀ do 5-FU de 48 horas e quando combinados são melhores do que testados isoladamente, o que permite concluir que o ETV foi responsável por grande parte do efeito (Figura 23).

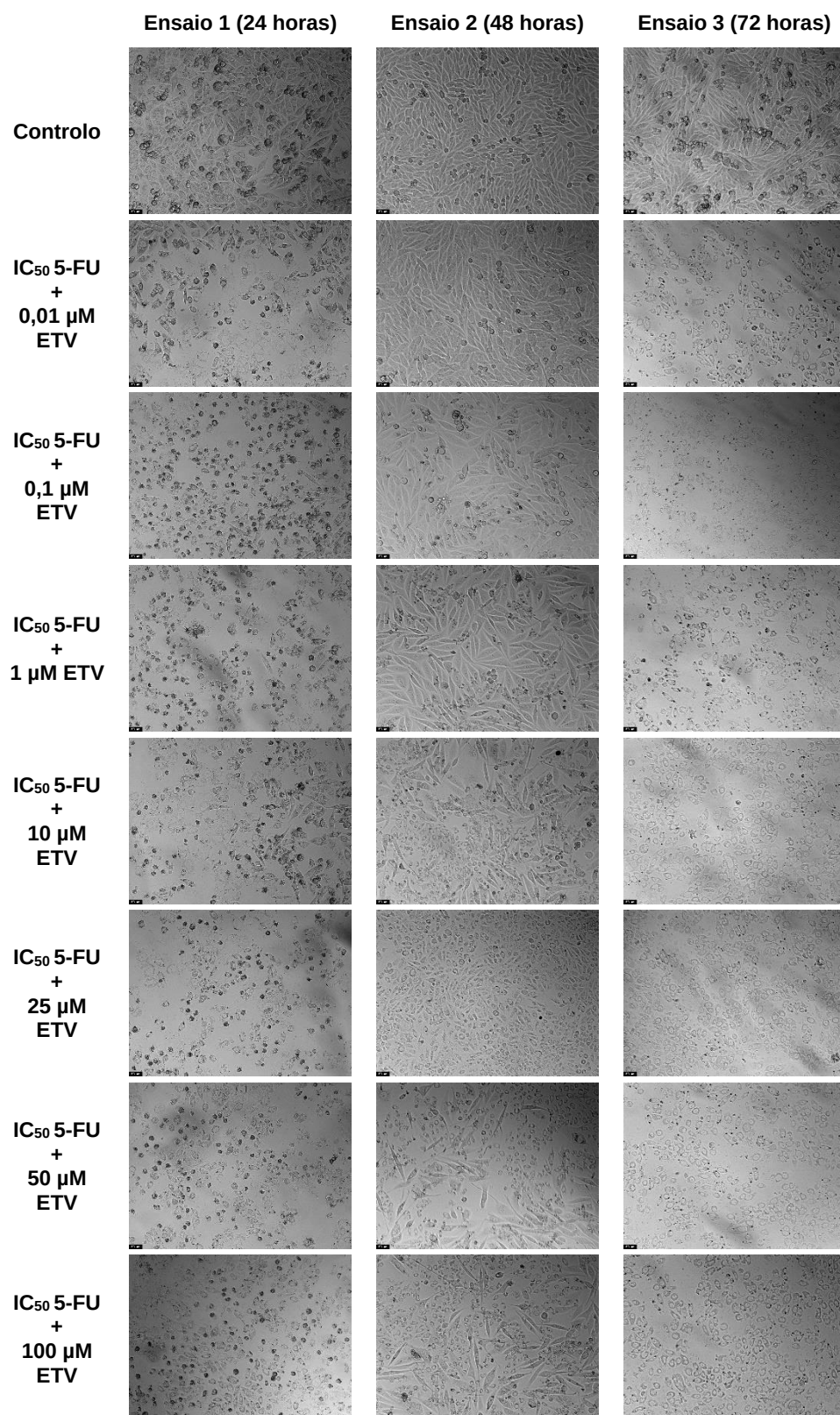


Figura 21: Resultados referentes a três experiências independentes onde se efetuou a avaliação morfológica de células PC-3 após exposição à combinação do valor do IC₅₀ do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 µM) com concentrações crescentes de ETV (0,01-100 µM) adicionados ao mesmo tempo e avaliados após um período de 24 horas (primeira coluna), 48 horas (segunda coluna) e 72 horas (terceira coluna), sendo as células controlo tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo). A barra de escala é de 50 µm.

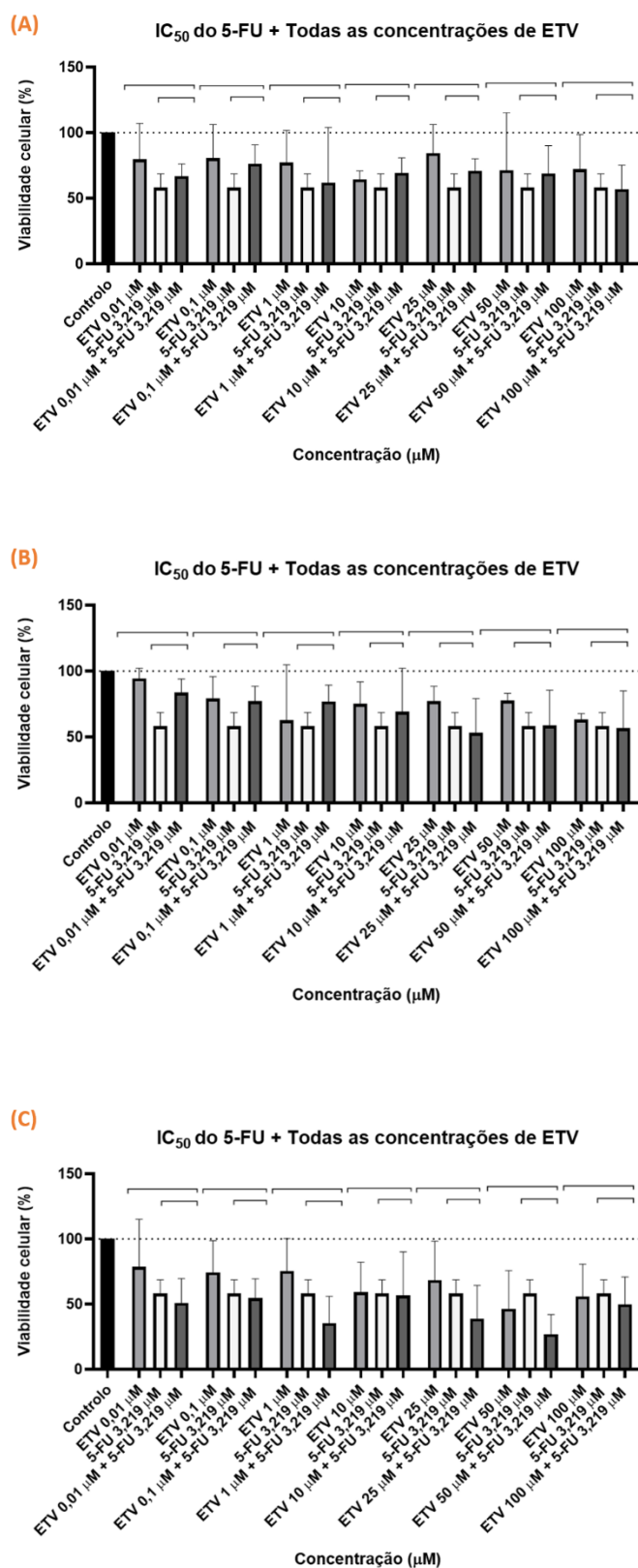


Figura 22: Resultados que demonstram os efeitos citotóxicos na linha celular PC-3 após exposição à combinação do valor do IC_{50} do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 μM) com concentrações crescentes de ETV (0,01-100 μM) adicionados ao mesmo tempo e avaliados após um período de 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). As células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo), a viabilidade celular foi determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados são apresentados através da média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ para 24, 48 e 72 horas).

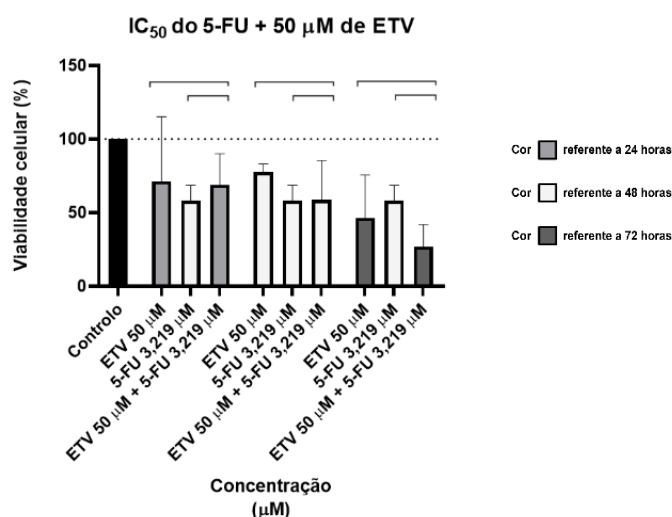


Figura 23: Resultados que demonstram os efeitos citotóxicos na linha celular PC-3 após exposição à combinação do valor do IC_{50} do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 μM) com 50 μM de ETV adicionados ao mesmo tempo e avaliados após um período de 24 horas (cinzento-claro), 48 horas (branco) e 72 horas (cinzento-escuro), comparativamente com 50 μM de ETV e com o IC_{50} do 5-FU obtido no estudo de 48 horas (3,219 μM). As células controlo foram tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO (veículo), a viabilidade celular foi determinada com recurso ao ensaio do MTT e os resultados são apresentados através da média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ para 24, 48 e 72 horas).

5. Discussão dos resultados

O CP é uma neoplasia bastante frequente no universo masculino, afetando particularmente indivíduos com idades superiores a 45 anos e, sendo um tumor que está associado ao envelhecimento, contribui consideravelmente para o aumento das taxas de mortalidade. Portanto, existem diversas opções de tratamento do CP, que deverão ser selecionadas tendo em consideração não só o estadio da doença, como também a idade do indivíduo e os efeitos secundários advindos de cada uma, entre outros aspetos. De facto, estas abordagens terapêuticas podem ser utilizadas de forma isolada ou até mesmo em combinação entre si, contudo o tratamento do CP apresenta alguns desafios que torna necessário o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que, de uma maneira geral, sejam mais eficazes, com menos efeitos secundários e que minimizem o desenvolvimento de resistências (210).

Assim, nos últimos anos, surgiu o conceito do reaproveitamento de fármacos em oncologia que consiste na identificação de fármacos já existentes e cuja aprovação original não seja antineoplásica, mas que apresentem atividade anticancerígena, sendo que já foi possível identificar diversos medicamentos que provaram atuar em vias de sinalização cruciais para desenvolvimento do CP e que demonstraram através estudos *in vitro*, *in vivo* ou *in silico* que são potencialmente úteis e eficazes no tratamento do CP quer em monoterapia quer em combinação com fármacos antineoplásicos, nomeadamente com quimioterapia (9,10,13). Contudo, ainda nenhum destes fármacos ou combinações de

fármacos é utilizada atualmente como primeira linha de tratamento, portanto é fundamental continuar a investigação para que num futuro breve os doentes possam beneficiar de tratamentos eficazes com fármacos reaproveitados.

Como já foi referido, existem diversos grupos farmacoterapêuticos que já foram massivamente estudados para poderem ser reaproveitados no tratamento do CP, destacando-se particularmente os antilipídicos, nomeadamente as estatinas, assim como antidiabéticos, antiparasitários, antiarrítmicos, anti-inflamatórios, antibacterianos, antidepressivos, anti-hipertensores, antifúngicos, imunossuppressores, antipsicóticos, antiepiléticos e anticonvulsivantes, bifosfonatos, medicamentos para o alcoolismo, entre outros (11,211). Na verdade, os antiviricos também já foram propostos para este fim, mas, de uma maneira geral, foram ainda pouco estudados no CP e, portanto, são uma janela de oportunidade para encontrar candidatos promissores.

Deste modo, o VGCV é um pró-fármaco do ganciclovir (análogo sintético do nucleósido 2'-desoxiguanosina) que apresenta atividade antivírica e é recomendado no tratamento da retinite causada por citomegalovírus em doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida e na prevenção da infeção por citomegalovírus (169,170). Assim sendo, devido ao potencial oncogénico do citomegalovírus, cujo DNA e proteínas são expressos em situações tumorais e metastáticas, devido à sua capacidade para induzir angiogénese e vias de sinalização associadas à proliferação tumoral e, visto que as infeções sexualmente transmissíveis aumentam o risco de CP, o VGCV reúne características que o tornam promissor para vir a ser reaproveitado no tratamento do CP, para além de já ter mostrado benefícios no tratamento do glioblastoma e de ser apontado como um possível inibidor das PARP-1 (enzimas fundamentais na sinalização e reparação dos erros do DNA, sendo que atualmente já existem iPARP com indicação terapêutica no tratamento do CP, tais como o olaparib e o rucaparib) (100,144,171–174).

Já o ETV é um análogo do nucleósido guanosina com atividade contra a polimerase do vírus da hepatite B, o que lhe confere a atividade antivírica para o tratamento da infeção causada pelo vírus da hepatite B, sendo particularmente usado no tratamento de primeira linha da HBC. No entanto, para além da sua atividade antivírica, o ETV parece inibir as PARP-1 e as KDM5B (enzimas sobreexpressas no CP e que estão associadas à tumorigénese, progressão tumoral e resistência à terapêutica), sendo dois mecanismos de ação extremamente interessantes e pertinentes para auxiliarem no combate do CP. Para além disto, o ETV possui uma elevada barreira genética, o que se torna uma grande vantagem para ser um fármaco reaproveitado em oncologia, pois diminui a probabilidade do aparecimento de resistências e também consegue evitar a reativação do vírus da hepatite B em doentes oncológicos que são tratados com inibidores do checkpoint

imunológico, quimioterapia e/ou corticosteroides (46,100–102,144,175–178,183–185,188,189).

No que diz respeito ao 5-FU, este é um fármaco quimioterápico de referência comumente usado no tratamento do cancro colorretal, gástrico, mama, cabeça e pescoço, esófago e pâncreas, havendo alguma literatura que refere que também poderá ser usado no tratamento do CP, porém não é um tratamento de primeira linha nesta neoplasia. De qualquer forma, não se tratando de um fármaco reaproveitado, considerou-se pertinente perceber se diminuiria a viabilidade celular das células tumorais prostáticas, à semelhança do que acontece noutros tumores. Inclusivamente, a literatura indica que o 5-FU tem propriedades radiosensibilizantes nas células tumorais prostáticas e que o seu efeito é melhorado pela redução dos folatos, sendo que o CP sobreexpressa PSMA, que é justamente uma folato hidrolase (146). Portanto, estes foram os motivos que levaram a que o 5-FU fosse selecionado como o fármaco de referência para ser incluído neste estudo.

Assim sendo, pelos motivos elencados anteriormente e, visto que o VGCV e o ETV se mostraram fármacos tão promissores no tratamento do CP e por terem sido ainda pouco estudados para este fim, estes foram os dois fármacos reaproveitados selecionados para serem objeto de estudo deste trabalho e o 5-FU foi escolhido como fármaco de referência. Nesta investigação pretendia-se avaliar se o VGCV, o ETV e o 5-FU diminuía a viabilidade da linha celular PC-3 quando testados isoladamente e, em caso afirmativo, seriam testados em combinação, de forma a avaliar se poderiam ser eficazes no tratamento do CP, dado que a combinação de medicamentos reaproveitados com medicamentos antineoplásicos será, à partida, uma estratégia que permitirá obter melhores resultados do que os que se obteriam isoladamente, possibilitando a administração de doses menores de cada um dos fármacos, diminuindo os efeitos secundários do doente e minimizando a resistência à terapêutica.

Relativamente à escolha da linha celular PC-3, esta motivou-se pelo facto de serem células tumorais de estadió avançado/metastático e que se revelam resistentes aos tratamentos comumente usados, nomeadamente resistentes à castração, visto que não expressam RA. Assim, tratando-se de tumores metastáticos resistentes à castração, torna-se mais desafiante encontrar terapêuticas que sejam verdadeiramente eficazes, sendo também um tipo de tumor no qual é fundamental desenvolver terapêuticas que aumentem a sobrevida dos doentes com este diagnóstico. Para além disto, são células mais agressivas e de rápida migração e proliferação, o que possibilita a obtenção de bastantes resultados num período de tempo relativamente curto (212).

Portanto, a viabilidade celular após a exposição das células PC-3 a todos os fármacos foi obtida através do ensaio do MTT. No caso do estudo com concentrações de 0,01, 0,1,

1, 10, 25, 50 e 100 μM de VGCV após 48 horas, os resultados obtidos numa primeira experiência não foram os pretendidos e, por esse motivo, repetiu-se o estudo, porém os resultados obtidos nesta segunda tentativa também não foram os esperados, não sendo possível determinar o IC_{50} através da curva dose-resposta para 48 horas em nenhum deles. Ou seja, apesar dos resultados discrepantes nos dois ensaios, foi possível concluir que não existe qualquer relação entre o aumento da dose de VGCV e a diminuição da viabilidade celular, sendo que nenhuma das concentrações testadas induziu citotoxicidade suficiente para diminuir significativamente a viabilidade das células PC-3, logo o VGCV mostrou não ser ativo nesta linha celular. Assim sendo, optou-se por não testar o VGCV noutros períodos de tempo (24 e 72 horas) e por não se realizar os estudos de combinação com o 5-FU, visto que isoladamente o VGCV não mostrou ter benefício no tratamento do CP por não apresentar atividade citotóxica na linha celular PC-3.

Tal como mencionado acima, o VGCV é utilizado no tratamento da retinite causada por citomegalovírus sendo que o citomegalovírus já foi detetado em tecido prostático maligno, contudo não foi possível saber se a linha celular utilizada estaria infetada ou não com este herpes-vírus. Seria oportuno saber esta informação e tentar relacionar os fracos resultados obtidos com a eventual ausência do citomegalovírus ou, por outro lado, perceber se linhas celulares de doentes com citomegalovírus e com CP responderiam da mesma forma ao VGCV. Por outro lado, o VGCV é um pró-fármaco do ganciclovir, portanto é necessário que o VGCV seja metabolizado para que ocorra a sua ativação e para que exista um verdadeiro efeito terapêutico e, visto que a próstata não é conhecida pela sua atividade metabolizadora pode também advir daí a ineficácia do VGCV, ou seja, especula-se que como as células PC-3 não são metabolizadoras por excelência talvez não tenham tido a capacidade de metabolizar o VGCV em ganciclovir e, conseqüentemente, não houve diminuição da viabilidade celular. Seria interessante estudar também o ganciclovir nesta linha celular, visto que neste caso já não seria necessário que ocorresse a sua metabolização pelas células PC-3. No entanto, caso o ganciclovir apresentasse bons resultados nos ensaios in vitro, o VGCV poderia também ter a sua pertinência de utilização na prática clínica do tratamento do CP, apesar dos seus fracos resultados neste estudo, já que o ganciclovir é mal absorvido quando administrado por via oral.

Relativamente ao ETV, optou-se por testar concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μM de ETV após 48 horas, tendo sido possível obter o valor do IC_{50} através da curva dose-resposta para 48 horas que foi de 0,06057 μM . Após perceber que o ETV em 48 horas tinha capacidade para diminuir a viabilidade celular das células PC-3, procedeu-se aos ensaios para 24 e 72 horas igualmente com concentrações crescentes de ETV (0,01-100 μM), de modo a perceber se existia influencia temporal na viabilidade celular. Assim,

foi possível perceber que o ETV diminuiu a viabilidade celular em todas as concentrações tanto em 24 horas, 48 horas como 72 horas, apesar de haver uma clara relação com o efeito temporal, visto que a viabilidade celular foi significativamente menor nas 72 horas, destacando-se inclusivamente os 50 μ M de ETV que atingiram valores de viabilidade celular abaixo dos 50%. Por outro lado, verificou-se a existência de variabilidade na viabilidade celular com o aumento das concentrações de ETV, não sendo possível estabelecer uma relação direta entre o aumento da concentração de ETV e a diminuição da viabilidade celular.

Como referido anteriormente, o IC_{50} obtido para 48 horas foi 0,06057 μ M, que comparativamente aos resultados do gráfico de barras da viabilidade celular revelou ser um valor extremamente baixo, o que pode ser explicado pelo facto do IC_{50} ser calculado através da curva dose-resposta que no fundo consiste numa projeção matemática que visa determinar a concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular das células tumorais. Assim, o ideal será obter valores baixos de IC_{50} que indicam que o fármaco em questão é eficaz em concentrações baixas e, consequentemente, levará a uma menor toxicidade quando administrado, porém, o valor do IC_{50} consiste numa estimativa que poderá não estar totalmente de acordo com as respostas biológicas obtidas e, consequentemente, com os valores reais de viabilidade celular (213,214). Por outro lado, a literatura menciona que relativamente à inibição do vírus da hepatite B in vitro os valores de IC_{50} do ETV variam de 0,36 nM a 3,6 nM (215). Contrariamente neste estudo, o IC_{50} das células PC-3 obtido foi bastante superior, indicando que são necessárias concentrações mais elevadas de ETV para inibir as células tumorais prostáticas do que para inibir o vírus da hepatite B.

De facto, não existem publicações de testes in vitro onde o ETV tenha sido testado em células PC-3, sendo este um estudo pioneiro cujos resultados obtidos corroboram a informação teórica disponível na literatura. Assim, o ETV exerceu efeito citotóxico na linha de células tumorais prostáticas, efeito esse que pode dever-se a diversos mecanismos de ação que ainda carecem de confirmação, nomeadamente por inibir a KDM5B, a via de sinalização PI3K/AKT e/ ou a PARP-1. No caso, seria pertinente conhecer algumas características das células PC-3 utilizadas neste estudo, de forma a perceber qual o mecanismo de ação que está por trás do seu efeito citotóxico, nomeadamente a expressão da KDM5B e a expressão dos genes BRCA1 e BRCA2, sendo que o interesse pela expressão dos genes BRCA1 e BRCA2 prende-se com o facto de perceber se o ETV é efetivamente um iPARP. Ou seja, como os iPARP atuam através do princípio da letalidade sintética, no qual é necessário a perda funcional de dois genes para desencadear a morte celular, só os doentes com mutações nos genes BRCA1/2 ou com tumores BRCAness

tirariam partido de terapias com ETV para o CP, visto que a inibição da PARP em células com mutações BRCA torna-as incapazes de reparar danos no DNA, levando à acumulação erros e, conseqüentemente à morte celular (46,100).

No que diz respeito ao 5-FU, optou-se por testar concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 μM após 48 horas, tendo sido possível obter o valor do IC_{50} através da curva dose-resposta que foi de 3,219 μM , sendo que este valor foi corroborado pela experiência em que se testou o IC_{50} após 48 horas num outro estudo de 48 horas isoladamente e foi possível verificar que, efetivamente, a viabilidade das células PC-3 reduzia para aproximadamente 50%. De facto, o IC_{50} obtido para o 5-FU foi 3,219 μM o que comparativamente aos resultados do gráfico de barras da viabilidade celular revelou ser um valor muito baixo, tal como aconteceu com o ETV. Contudo, o IC_{50} de 3,219 μM para o 5-FU está de acordo com o intervalo de IC_{50} com capacidade para inibir a proliferação in vitro de diversas linhas celulares tumorais humanas que é descrito na literatura (3,18 μM a 17,7 μM), apesar destes valores não serem específicos de células PC-3 (216).

Porém, ao contrário do ETV que conseguiu diminuir a viabilidade celular com todas as concentrações testadas, o 5-FU apenas teve capacidade para o fazer com concentrações iguais ou superiores a 1 μM , no entanto, pode ser estabelecida uma relação entre o aumento da concentração do 5-FU e a diminuição da viabilidade celular, sendo que concentrações compreendidas entre os 25-100 μM , inclusive, reduziram a viabilidade celular para cerca de 50%. Apesar o 5-FU não apresentar uma redução da viabilidade celular tão exacerbada como noutras neoplasias, demonstrou citotoxicidade significativa nas células PC-3, podendo prosseguir para os estudos de combinação. Contudo, é pertinente mencionar que devido à sua capacidade radiosensibilizante talvez fosse possível obter níveis superiores de citotoxicidade caso fosse aplicada radiação nas células PC-3 (146). Assim, supõe-se que o 5-FU atue nas células PC-3 da mesma forma que atua noutras linhas celulares tumorais, ou seja, sendo um antimetabolito que interfere com a síntese do DNA após a conversão no desoxinucleótido ativo e que bloqueia a conversão do ácido desoxiuridílico em ácido timidílico através da enzima timidilato sintetase (64).

Por fim, realizaram-se os estudos de combinações em que testou o IC_{50} do 5-FU obtido para 48 horas (3,219 μM) com as concentrações crescentes de ETV (0,01-100 μM) para 24, 48 e 72 horas. O que se pretendia avaliar com estes estudos era se a combinação do 5-FU com o ETV era superior (mais citotóxica) aos fármacos isoladamente. No estudo de 24 horas, a combinação não apresentou melhores resultados do que o IC_{50} do 5-FU para 48 horas, exceto para IC_{50} do 5-FU combinado com 100 μM de ETV, embora muito ligeiramente. Porém, de uma maneira geral, a combinação foi melhor do que o ETV isoladamente, exceto nos 10 μM de ETV. Por outro lado, não há relação entre o aumento

da concentração de ETV e a diminuição da viabilidade celular causada pela combinação nem pelo próprio ETV, sendo que os 3,219 μM de 5-FU durante 48 horas reduzem mais a viabilidade celular do que todas as concentrações de ETV em 24 horas e as combinações (exceto IC_{50} do 5-FU para 48 horas com 100 μM de ETV) também em 24 horas.

No estudo de 48 horas, a combinação também não apresentou melhores resultados do que o IC_{50} do 5-FU durante 48 horas, exceto para IC_{50} do 5-FU combinado com 25 μM e com 100 μM de ETV, embora muito ligeiramente. Porém, a combinação foi sempre melhor do que o ETV sozinho, exceto para 1 μM de ETV. Neste estudo, verifica-se uma relação entre o aumento da concentração de ETV e a diminuição da viabilidade celular das combinações nas concentrações compreendidas entre 0,01-25 μM de ETV, inclusive. Já nas combinações do IC_{50} do 5-FU com 50 e 100 μM de ETV os resultados da viabilidade celular foram superiores aos valores obtidos com a combinação de IC_{50} do 5-FU com 25 μM de ETV, o que se poderá justificar pelo elevado desvio padrão existente nestas barras. Para além disto, os 3,219 μM de 5-FU durante 48 horas reduzem mais a viabilidade celular do que todas as concentrações de ETV em 48 horas e as combinações (exceto IC_{50} do 5-FU com 25 e 100 μM de ETV) também em 48 horas.

No estudo de 72 horas, a combinação apresentou melhores resultados do que o IC_{50} do 5-FU durante 48 horas e o ETV isoladamente. Contudo, não há relação entre o aumento da concentração de ETV e a diminuição da viabilidade celular causada pela combinação nem pelo próprio ETV, sendo que os 3,219 μM de 5-FU durante 48 horas reduzem mais a viabilidade celular do que todas as concentrações de ETV (exceto 50 e 100 μM) em 72 horas. Por outro lado, as combinações de 72 horas reduziram sempre mais a viabilidade celular do que o IC_{50} do 5-FU durante 48 horas.

Por exemplo, quando comparados os efeitos citotóxicos da exposição à combinação do valor do IC_{50} do 5-FU do estudo de 48 horas (3,219 μM) com 50 μM de ETV e avaliados após um período de 24 horas, 48 horas e 72 horas é facilmente observável o papel crucial do fator tempo, mostrando que para as 72 horas a combinação do 5-FU com o ETV induz mais citotoxicidade do que os fármacos isoladamente, algo que não ocorreu na combinação das mesmas concentrações para 24 e 48 horas. Assim sendo, o melhor resultado obtido em todo este estudo, ou seja, aquele que induziu maior citotoxicidade nas células PC-3 foi a combinação do IC_{50} do 5-FU de 48 horas (3,219 μM) com 50 μM de ETV durante 72 horas, verificando-se uma mais-valia na combinação destes dois fármacos, o que provavelmente se deverá ao seu efeito sinérgico, isto é, o efeito da combinação dos dois fármacos é superior à soma dos efeitos individuais. Assim, uma das grandes vantagens do efeito sinérgico é a possibilidade de redução das doses individuais dos dois fármacos utilizados, comparativamente com a sua utilização individual, ocorrendo uma

otimização da terapêutica e uma diminuição da probabilidade de aparecimento de efeitos secundários graves, aumentando também a taxa de sucesso do tratamento, sendo que os diferentes mecanismos de ação dos fármacos envolvidos permitem retardar o aparecimento de resistências do organismo aos tratamentos (11,14).

Por fim, é importante mencionar que, de uma maneira geral os resultados foram apresentados com desvios-padrão significativos que poderão ter influência nos resultados obtidos, o que poderá dever-se à inexperiência no trabalho com células e possíveis variações na técnica ou até mesmo na utilização do equipamento e dos reagentes. É também pertinente esclarecer o motivo pelo qual se realizou a normalização dos resultados nas curvas dose-resposta, o que se relaciona com a necessidade de definir claramente qual o valor que corresponde a 100% e a 0%, ou seja, a normalização permite que os resultados variem entre 0 e 100, respetivamente o patamar inferior e superior do gráfico (217). Também se utilizou a regressão não-linear precisamente para obter uma curva matemática cuja interpretação dos resultados fosse facilitada pela apresentação das concentrações logarítmicas dos fármacos.

6. Conclusão

O CP é uma doença altamente prevalente em todo o mundo e que apresenta uma série de desafios, entre os quais a seleção de um tratamento devidamente eficaz, para o qual não se desenvolvam resistências e que apresente poucos efeitos secundários. Deste modo, o conceito do reaproveitamento de medicamentos para o tratamento do CP tem ganho força nos últimos anos, devido às suas inúmeras vantagens, portanto existem diversos fármacos cuja indicação terapêutica original não é antineoplásica, mas que provaram em estudos *in vitro*, *in vivo* ou *in silico* que são potencialmente úteis e eficazes no tratamento do CP quer em monoterapia quer em combinação com fármacos antineoplásicos, nomeadamente com quimioterapia.

De facto, verificou-se que o 5-FU continua a ser um dos fármacos mais comumente administrados nos tratamentos oncológicos e que provoca efeitos secundários graves para o doente. Portanto, torna-se essencial desenvolver estratégias que permitam reduzir esta toxicidade, nomeadamente através da combinação com fármacos reaproveitados que permitirão reduzir as doses de 5-FU e aumentar a qualidade de vida do doente.

Particularmente neste estudo, os resultados obtidos com o pró-fármaco VGCV não foram os esperados, porém seria pertinente repetir o estudo com o ganciclovir. Já o ETV mostrou exercer efeitos citotóxicos significativos nas células PC-3 particularmente porque esta não é a sua indicação terapêutica original. Relativamente ao fármaco de referência 5-FU, apesar de não ter sido tão eficaz como é noutros tipos de tumores, teve um desempenho favorável na inibição da viabilidade celular das células PC-3. Por outro lado, foi possível provar que a combinação de 5-FU com ETV é uma associação vantajosa, superando os resultados de cada fármaco isoladamente e sendo possível obter uma grande diminuição da viabilidade das células PC-3 após exposições de 72 horas.

Tendo por base os valores de IC_{50} que foram obtidos neste estudo, o ETV pareceu ser mais eficaz que o 5-FU, visto que apresentou um valor de IC_{50} inferior. Relativamente aos estudos de combinação, acredita-se que poderá ter ocorrido a potenciação da ação do 5-FU pelo fármaco reaproveitado ETV. Devido aos bons resultados obtidos com o ETV em células tumorais prostáticas e através dos mecanismos de ação que lhe poderão estar associados, será pertinente ponderar a testagem deste fármaco noutros tipos de tumores, nomeadamente aqueles em que a KDM5B também se encontra sobreexpressa (mama, pulmão, pele, fígado, estômago, colorretal, entre outros) ou aqueles em que há mutações nos genes BRCA1/2 (mama, ovário) ou tumores BRCAness.

Em suma, o reaproveitamento de fármacos mostrou ser uma estratégia eficaz no tratamento do CP, visto que já se encontraram diversos candidatos com características

que permitirão otimizar os tratamentos já existentes e poupar tempo e dinheiro na investigação do tratamento desta neoplasia. Particularmente neste estudo, foi possível provar a utilidade do reaproveitamento do ETV na área da oncologia, nomeadamente através da sua combinação com o fármaco de referência 5-FU, porém são necessários mais estudos para que se possa verificar a pertinência da inclusão do ETV como fármaco reaproveitado na prática clínica e para determinar a eficácia e efetividade de outros possíveis candidatos ao tratamento oncológico, não descurando a necessidade de terapias personalizadas e dirigidas às características de cada doente e de cada doença.

7. Referências Bibliográficas

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73:17–48.
2. Cancer [Internet]. [cited 2023 Sep 17]. Available from: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
3. Fatores de risco para o cancro [Internet]. [cited 2023 Sep 17]. Available from: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/fatores-de-risco-para-o-cancro/#quais-os-fatores-de-risco-para-o-cancro>
4. Promoting cancer early diagnosis [Internet]. [cited 2023 Sep 17]. Available from: <https://www.who.int/activities/promoting-cancer-early-diagnosis>
5. Cancer [Internet]. [cited 2023 Sep 17]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/diagnosis-treatment/drc-20370594>
6. Zerbib M, Zelefsky MJ, Higano CS, Carroll PR. Conventional treatments of localized prostate cancer. *Urology*. 2008;72:S25–35.
7. Knipper S, Ott S, Schlemmer HP, Grimm MO, Graefen M, Wiegel T. Options for curative treatment of localized prostate cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 2021;118:228–36.
8. Sayyid RK, Klotz L, Benton JZ, Ma M, Woodruff P, Satkunasingam R, et al. Active surveillance in favorable intermediate-risk prostate cancer patients: Predictors of deferred intervention and treatment choice. *Can Urol Assoc J*. 2021;16:E7–14.
9. Turanli B, Grøtli M, Boren J, Nielsen J, Uhlen M, Arga KY, et al. Drug Repositioning for Effective Prostate Cancer Treatment. *Front Physiol*. 2018;9:500.
10. Duarte D, Vale N. Antidepressant Drug Sertraline against Human Cancer Cells. *Biomolecules*. 2022;12:1513.
11. Pantziarka P, Verbaanderd C, Sukhatme V, Capistrano R, Crispino S, Gyawali B, et al. ReDO_DB: the repurposing drugs in oncology database. *Ecancermedicallscience*. 2018;12:886.
12. Agrawal P. Advantages and Challenges in Drug Re-Profiling. *J Pharmacovigil*. 2015;S2:e002.
13. Bahmad HF, Demus T, Moubarak MM, Daher D, Carlos J, Moreno A, et al. Overcoming Drug Resistance in Advanced Prostate Cancer by Drug Repurposing. *Med Sci*. 2022;10:15.
14. Sun W, Sanderson P, Zheng W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discov Today*. 2016;21:1189–95.
15. Duarte D, Vale N. Synergistic Interaction of CPP2 Coupled with Thiazole Derivates Combined with Clotrimazole and Antineoplastic Drugs in Prostate and Colon Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci*. 2021;22:11984.
16. Bhavsar A, Verma S. Anatomic Imaging of the Prostate. *Biomed Res Int*. 2014;2014:728539.
17. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Sistema Reprodutor. In: Lange MJ, editor. *Anatomia & Fisiologia*, 6ª Edição. Lisboa: Lusociência-Edições técnicas e científicas, Lda; 2003. p. 1027–44.
18. Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40:565–75.
19. Prostate Anatomy [Internet]. [cited 2022 Mar 1]. Available from:

<https://www.youtube.com/watch?v=cWTJsJFhjA4&feature=youtu.be>

20. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209–49.
21. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019;10:63–89.
22. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*. 2015;4:365–80.
23. Eastham J. Prostate cancer screening. *Investig Clin Urol*. 2017;58:217–9.
24. Merriel SWD, Funston G, Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther*. 2018;35:1285–94.
25. Bax C, Taverna G, Eusebio L, Sironi S, Grizzi F, Guazzoni G, et al. Innovative diagnostic methods for early prostate cancer detection through urine analysis: A review. *Cancers (Basel)*. 2018;10:123.
26. Descotes J-L. Diagnosis of prostate cancer. *Asian J Urol*. 2019;6:129–36.
27. Pérez-Ibave DC, Burciaga-Flores CH, Elizondo-Riojas MÁ. Prostate-specific antigen (PSA) as a possible biomarker in non-prostatic cancer: A review. *Cancer Epidemiol*. 2018;54:48–55.
28. Singh H, El-zaatari ZM, Ro JY. Histologic variants of acinar prostate carcinomas: Clinicopathologic importance. *Ann Urol Oncol*. 2020;3:36–46.
29. Chow K, Bedó J, Ryan A, Agarwal D, Bolton D, Chan Y, et al. Ductal variant prostate carcinoma is associated with a significantly shorter metastasis-free survival. *Eur J Cancer*. 2021;148:440–50.
30. Baig FA, Hamid A, Mirza T, Syed S. Ductal and Acinar Adenocarcinoma of Prostate: Morphological and Immunohistochemical Characterization. *Oman Med J*. 2015;30:162–6.
31. Sha J, Bo J, Pan J, Zhang L, Xuan H, Chen W, et al. Ductal adenocarcinoma of the prostate: immunohistochemical findings and clinical significance. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1501–6.
32. Inamura K. Prostatic cancers: Understanding their molecular pathology and the 2016 WHO classification. *Oncotarget*. 2018;9:14723–37.
33. Humphrey PA. Histopathology of prostate cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7:a030411.
34. Ranasinha N, Omer A, Philippou Y, Harriss E, Davies L, Chow K, et al. Ductal adenocarcinoma of the prostate: A systematic review and meta-analysis of incidence, presentation, prognosis, and management. *BJUI Compass*. 2021;2:13–23.
35. Arora K, Barbieri CE. Molecular Subtypes of Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2018;20:58.
36. Kulac I, Roudier MP, Haffner MC. Molecular Pathology of Prostate Cancer. *Surg Pathol*. 2021;14:387–401.
37. Kaffenberger SD, Barbieri CE. Molecular Subtyping of Prostate Cancer. *Curr Opin Urol*. 2017;26:213–8.
38. Matos T, Martins L, Conduto E, Gomes C, Silva M, Rocha M do C, et al. Os TDT no Cancro da Próstata. *News! TDT*. 2015;21:1–19.
39. Prostate Cancer [Internet]. [cited 2023 Apr 26]. Available from:

<https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer/chapter/classification-and-staging-systems>

40. Nazim SM, Abbas F. The role of surgery in locally advanced prostate cancer. *Pak J Med Sci*. 2015;31:710–6.
41. Wirth MP, Hakenberg OW, Froehner M. Optimal treatment of locally advanced prostate cancer. *World J Urol*. 2007;25:169–76.
42. Shou J, Zhang Q, Wang S, Zhang D. The prognosis of different distant metastases pattern in prostate cancer: A population based retrospective study. *Prostate*. 2018;78:491–7.
43. Turner B, Drudge-Coates L. Pharmacological treatment of patients with advanced prostate cancer. 2014;28:44–8.
44. Martinez M, Satheesh M. Prostate disease. In: Walker R, Whittlesea C, editors. *Clinical pharmacy and therapeutics*, 5ª Edição. Cardiff: Churchill Livingstone; 2012. p. 753–68.
45. FDA Drug Safety Communication: 5-alpha reductase inhibitors (5-ARIs) may increase the risk of a more serious form of prostate cancer [Internet]. [cited 2023 Feb 26]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-5-alpha-reductase-inhibitors-5-aris-may-increase-risk-more-serious>
46. Congregado B, Rivero I, Osmán I, Sáez C, López RM. PARP Inhibitors: A New Horizon for Patients with Prostate Cancer. *Biomedicines*. 2022;10:1416.
47. Sekhoacha M, Riet K, Motloung P, Gumenku L, Adegoke A, Mashele S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*. 2022;27:5730.
48. Choi E, Buie J, Camacho J, Sharma P, de Riese W. Evolution of Androgen Deprivation Therapy (ADT) and Its New Emerging Modalities in Prostate Cancer: An Update for Practicing Urologists, Clinicians and Medical Providers. *Res Reports Urol*. 2022;14:87–108.
49. Cathomas R, Bajory Z, Bouzid M, Ghoneimy A El, Gillessen S, Goncalves F, et al. Management of Bone Metastases in Patients with Castration-Resistant Prostate. *Urol Int*. 2014;92:377–86.
50. Coelingh Bennink H, Krijgh J, Egberts JFM, Slootweg M, van Melick HHE, Roos EPM, et al. Maintaining bone health by estrogen therapy in patients with advanced prostate cancer: a narrative review. *Endocr Connect*. 2022;11:e220182.
51. Shelley M, Harrison C, Coles B, Stafforth J, Wilt T, Mason M. Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;4:CD005247.
52. Song P, Huang C, Wang Y. The efficacy and safety comparison of docetaxel, cabazitaxel, estramustine, and mitoxantrone for castration-resistant prostate cancer: A network meta-analysis. *Int J Surg*. 2018;56:133–40.
53. Hurwitz M. Chemotherapy in Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2015;17:44.
54. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Jevtana. 2020.
55. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Docetaxel Hikma. 2021.
56. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Mitoxantrona Accord. 2017.

57. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Estracyt. 2021.
58. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Etoposido Accord. 2019.
59. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Paclitaxel Kabi. 2017.
60. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Solblastin. 2019.
61. Nader R, Amm J El, Ching JBA. Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2018;20:221–9.
62. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Carboplatina Kabi. 2012.
63. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Cisplatina Teva. 2016.
64. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Fluorouracilo Accord. 2022.
65. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Xeloda. 2006.
66. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Fauldexato. 2021.
67. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Endoxan. 2017.
68. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Doxorubicina Accord. 2016.
69. Garje R, Chennamadhavuni A, Mott SL, Chambers IM, Gellhaus P, Zakharia Y, et al. Utilization and outcomes of surgical castration in comparison to medical castration in metastatic prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2020;18:e157–66.
70. Yıkılmaz TN, Öztürk E, Hamidi N, Başar H. Comparison of subcapsular and total orchiectomy in patients with prostate cancer. *Bull Urooncology*. 2018;17:5–8.
71. Ploussard G, Bruyère F, Culine S, de La Taille A, Hennequin C, Oudard S, et al. Modalités de castration dans la prise en charge du cancer de la prostate: Sont-elles toutes équivalentes? *Prog en Urol*. 2016;26:319–28.
72. Fischer-Valuck BW, Rao YJ, Michalski JM. Intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer. *Transl Androl Urol*. 2018;7:297–307.
73. Zaorsky NG, Davis BJ, Nguyen PL, Showalter TN, Hoskin PJ, Yoshioka Y, et al. The evolution of brachytherapy for prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2017;14:415–39.
74. Stish BJ, Davis BJ, Mynderse LA, Deufel CL, Choo R. Brachytherapy in the management of prostate cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2017;26:491–513.
75. Hennrich U, Eder M. [177Lu]Lu-PSMA-617 (Pluvicto™): The First FDA-Approved Radiotherapeutic for Treatment of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals*. 2022;15:1292.
76. Ramnaraign B, Sartor O. PSMA-Targeted Radiopharmaceuticals in Prostate Cancer: Current Data and New Trials. *Oncologist*. 2023;28:392–401.
77. Prontuário Terapêutico on-line [Internet]. 2016 [cited 2022 Jun 27]. Available from: <https://app10.infarmed.pt/prontuario/frameprimeiraono.php?letra=Z&flag=1>
78. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Eligard. 2021.
79. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Zoladex. 2019.
80. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Decapeptyl.

2017.

81. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Firmagon. 2013.
82. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Orgovyx. 2022.
83. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Xtandi. 2018.
84. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Nubeqa. 2020.
85. Cattrini C, Caffo O, Olmos D, Castro E, De Giorgi U, Mennitto A, et al. Apalutamide, Darolutamide and Enzalutamide for Nonmetastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (nmCRPC): A Critical Review. *Cancers (Basel)*. 2022;14:1792.
86. Crawford ED, Heidenreich A, Lawrentschuk N, Tombal B, Pompeo ACL, Mendoza-Valdes A, et al. Androgen-targeted therapy in men with prostate cancer: evolving practice and future considerations. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2019;22:24–38.
87. Ito Y, Sadar MD. Enzalutamide and blocking androgen receptor in advanced prostate cancer: Lessons learnt from the history of drug development of antiandrogens. *Res Reports Urol*. 2018;10:23–32.
88. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Androcur. 2020.
89. Li Z, Bishop AC, Alyamani M, Garcia JA, Dreicer R, Bunch D, et al. Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumour activity in prostate cancer. *Nature*. 2015;523:347–51.
90. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Anandron. 2022.
91. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Prosneo. 2014.
92. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Bicastad. 2011.
93. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Erleada. 2019.
94. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Zytiga. 2016.
95. Rizzo A, Mollica V, Cimadamore A, Santoni M, Scarpelli M, Giunchi F, et al. Is There a Role for Immunotherapy in Prostate Cancer? *Cells*. 2020;9:2051.
96. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Provenge. 2015.
97. Rodrigues S, Dore M, Metrogos V, Rodrigues M, Gomes PN, Cabrita M, et al. Carcinoma da próstata metastático resistente à castração - novas abordagens terapêuticas. *Acta Urológica Port*. 2014;31:36–40.
98. Schepisi G, Farolfi A, Conteduca V, Martignano F, Lisi D De, Ravaglia G, et al. Immunotherapy for Prostate Cancer: Where We Are Headed. *Int J Mol Sci*. 2017;18:2627.
99. Sonnenburg DW, Morgans AK. Emerging Therapies in Metastatic Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2018;20:46.
100. Branco C, Paredes J. PARP Inhibitors: From the Mechanism of Action to Clinical Practice. *Acta Med Port*. 2022;35:135–43.
101. Wu MS, Goldberg H. Role of Rucaparib in the Treatment of Prostate Cancer: Clinical Perspectives and Considerations. *Cancer Manag Res*. 2022;14:3159–74.
102. ASCO GU 2023: Rucaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC): TRITON3 Interim Overall Survival and Efficacy of Rucaparib vs Docetaxel or Second-Generation Androgen Pathway Inhibitor Therapy [Internet]. [cited 2023 Apr 2]. Available from: <https://www.urotoday.com/conference-highlights/asco-gu-2023/asco-gu-2023-prostate-cancer/142455-asco-gu-2023-rucaparib-for-metastatic-castration-resistant-prostate-cancer-mcrpc-triton3-interim-overall->

survival-and-efficacy-of-rucaparib-vs-docetaxel-or-sec

103. Mercader C, Musquera M, Franco A, Alcaraz A, Ribal MJ. Primary cryotherapy for localized prostate cancer treatment. *Aging Male*. 2021;23:1460–6.
104. Phillips JM, Catarinichia S, Krughoff K, Barqawi AB. Cryotherapy in prostate cancer. *J Clin Urol*. 2014;7:308–17.
105. Atluri S, Mouzannar A, Venkatramani V, Parekh DJ, Nahar B. Focal therapy for localized prostate cancer - Current status. *Indian J Urol*. 2022;38:7–14.
106. Janssen Presents Updated Data Demonstrating Improved Outcomes from the Use of Niraparib in Combination with Abiraterone Acetate Plus Prednisone as a First-Line Therapy in Patients with BRCA-Positive Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer [Internet]. [cited 2023 Apr 2]. Available from: <https://www.janssen.com/janssen-presents-updated-data-demonstrating-improved-outcomes-use-niraparib-combination-abiraterone>
107. TALAPRO-2: Talazoparib Plus Enzalutamide Improves Progression-Free Survival in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer [Internet]. [cited 2023 Apr 2]. Available from: <https://ascopost.com/news/february-2023/talapro-2-talazoparib-plus-enzalutamide-improves-progression-free-survival-in-metastatic-castration-resistant-prostate-cancer/>
108. Pignot G, Maillet D, Gross E, Barthelemy P, Beauval B, Constans- F, et al. Systemic treatments for high- risk localized prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2018;15:498–510.
109. Ahmad I, Ahmed MM, Ahsraf MF, Naeem A, Ahmed M, Farooqi MS. Pain Management in Metastatic Bone Disease: A Literature Review. *Cureus*. 2018;10:e3286.
110. Moos R Von, Costa L, Ida C, Niepel D, Santini D. Improving quality of life in patients with advanced cancer: Targeting metastatic bone pain. *Eur J Cancer*. 2017;71:80–94.
111. Montgomery B, Kheoh T, Molina A, Li J, Bellmunt J, Tran N, et al. Impact of Baseline Corticosteroids on Survival and Steroid Androgens in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: Exploratory Analysis from COU-AA-301. *Eur Urol*. 2015;67:866–73.
112. Lim FMY, Bobrowski A, Agarwal A, Silva MF. Use of corticosteroids for pain control in cancer patients with bone metastases: a comprehensive literature review. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2017;11:78–87.
113. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Pamidran. 2021.
114. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Aclasta. 2015.
115. Liu J, Zhao C, Liu B, Liu H, Wang L. Analgesia and curative effect of pamidronate disodium combined with chemotherapy on elderly patients with advanced metastatic bone cancer. *Oncol Lett*. 2019;18:771–5.
116. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Xgeva. 2016.
117. Seitzer KE, Seifert R, Kessel K, Roll W, Schlack K, Boegemann M, et al. Lutetium-177 Labelled PSMA Targeted Therapy in Advanced Prostate Cancer: Current Status and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2021;13:3715.
118. Agrawal S. The role of 225Ac-PSMA-617 in chemotherapy-naive patients with advanced prostate cancer: Is it the new beginning. *Indian J Urol*. 2020;36:69–70.
119. Castellano D, Apolo AB, Porta C, Capdevila J, Viteri S, Rodriguez-Antona C, et al. Cabozantinib combination therapy for the treatment of solid tumors: a systematic review. *Ther Adv Med Oncol*. 2022;14:1 –37.

120. Kase AM, Copland JA, Tan W. Novel therapeutic strategies for CDK4/6 inhibitors in metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Onco Targets Ther.* 2020;13:10499–513.
121. Gasmi A, Roubaud G, Dariane C, Barret E, Beauval JB, Brureau L, et al. Overview of the development and use of Akt inhibitors in prostate cancer. *J Clin Med.* 2022;11:160.
122. Siltari A, Auvinen A, Murtola TJ. Pharmacoepidemiological Evaluation in Prostate Cancer - Common Pitfalls and How to Avoid Them. *Cancers (Basel).* 2021;13:696.
123. Craig EL, Allott EH, Freedland SJ, Hamilton RJ. Statins and prostate cancer - hype or hope? The epidemiological perspective. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2022;25:641–649.
124. Malik JA, Ahmed S, Momin SS, Shaikh S, Alafnan A, Alanazi J, et al. Drug Repurposing: A New Hope in Drug Discovery for Prostate Cancer. *ACS Omega.* 2022;8:56–73.
125. Longo J, Mullen PJ, Yu R, Leeuwen JE Van, Masoomian M, Woon DTS, et al. An actionable sterol-regulated feedback loop modulates statin sensitivity in prostate cancer. *Mol Metab.* 2019;25:119–30.
126. Xu M, An Y, Liu C, Xu J, Zhong X, Zeng N, et al. Association of Statin Use with the Risk of Incident Prostate Cancer: A Meta-Analysis and Systematic Review. *J Oncol.* 2022;2022:7827821.
127. Lian X, Wang G, Zhou H, Zheng Z, Fu Y, Cai L. Anticancer Properties of Fenofibrate: A Repurposing Use. *J Cancer.* 2018;9:1527–37.
128. Knura M, Garczor W, Borek A, Drzymala F, Rachwał K, George K. The Influence of Anti-Diabetic Drugs on Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13:1827.
129. Lee YHA, Zhou J, Hui JMH, Liu X, Lee TTL, Hui K, et al. Risk of New-Onset Prostate Cancer for Metformin Versus Sulfonylurea Use in Type 2 Diabetes Mellitus: A Propensity Score-Matched Study. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2022;20:674–82.
130. Wang NF, Jue TR, Holst J, Gunter JH. Systematic review of antitumour efficacy and mechanism of metformin activity in prostate cancer models. *BJUI Compass.* 2022;4:44–58.
131. Rushworth LK, Hewit K, Munnings-tomes S, Somani S, James D, Shanks E, et al. Repurposing screen identifies mebendazole as a clinical candidate to synergise with docetaxel for prostate cancer treatment. *Br J Cancer.* 2020;122:517–27.
132. Juarez M, Cabrera-Scholnik A, Dominguez-Gomez G, Chavez-Blanco A, Diaz-Chavez J, Duenas-Gonzalez A. Antitumor effects of ivermectin at clinically feasible concentrations support its clinical development as a repositioned cancer drug. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2020;85:1153–63.
133. Lv S, Wu Z, Luo M, Zhang Y, Zhang J, Pascal LE, et al. Integrated analysis reveals FOXA1 and Ku70/Ku80 as targets of ivermectin in prostate cancer. *Cell Death Dis.* 2022;13:754.
134. Yang N, Tan S, Ng S, Shi Y, Zhou J, Shyong K, et al. Artesunate Induces Cell Death in Human Cancer Cells via Enhancing Lysosomal Function and Lysosomal Degradation of Ferritin. *J Biol Chem.* 2014;289:33425–41.
135. Chinnapaka S, Bakthavachalam V, Munirathinam G. Repurposing antidepressant sertraline as a pharmacological drug to target prostate cancer stem cells: dual activation of apoptosis and autophagy signaling by deregulating redox balance. *Am J Cancer Res.* 2020;10:2043–65.

136. Plantone D, Koudriavtseva T. Current and Future Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Infectious, Immune, Neoplastic, and Neurological Diseases: A Mini-Review. *Clin Drug Investig.* 2018;38:653–671.
137. Zheng X, Cui X, Gao Z, Zhao Y, Lin Y, Shih WJ, et al. Atorvastatin and Celecoxib in Combination Inhibits the Progression of Androgen-Dependent LNCaP Xenograft Prostate Tumors to Androgen Independence. *Cancer Prev Res.* 2010;3:114–24.
138. Vorst MJDL van der, Toffoli EC, Beusink M, Linde ME van, Voorthuizen T van, Brouwer S, et al. Metoclopramide, Dexamethasone, or Palonosetron for Prevention of Delayed Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting After Moderately Emetogenic Chemotherapy (MEDEA): A Randomized, Phase III, Noninferiority Trial. *Oncologist.* 2021;26:e173–e181.
139. Lv Q, Wang D, Yang Z, Yang J, Zhang R, Yang X, et al. Repurposing antitubercular agent isoniazid for treatment of prostate cancer. *Biomater Sci.* 2018;7:296–306.
140. Yang L, Yang J, Liu H, Lan J, Xu Y, Wu X, et al. Minocycline binds and inhibits LYN activity to prevent STAT3-mediated metastasis of colorectal cancer. *Int J Biol Sci.* 2022;18:2540–52.
141. Turanli B, Zhang C, Kim W, Benfeitas R, Uhlen M, Yalcin K, et al. Discovery of therapeutic agents for prostate cancer using genome-scale metabolic modeling and drug repositioning. *EBioMedicine.* 2019;42:386–96.
142. Chang W, Hsu L, Leu W, Chen C, Guh J. Repurposing of nitroxoline as a potential anticancer agent against human prostate cancer - a crucial role on AMPK/mTOR signaling pathway and the interplay with Chk2 activation. *Oncotarget.* 2015;6:39806–20.
143. Guan M, Fousek K, Chow WA. Nelfinavir inhibits regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding protein-1 and activating transcription factor 6 in castration-resistant prostate cancer. *FEBS J.* 2012;279:2399–411.
144. Sherin DR, Manojkumar TK. Exploring the selectivity of guanine scaffold in anticancer drug development by computational repurposing approach. *Sci Rep.* 2021;11:16251.
145. Li S, Chen J, Chen X, Yu J, Guo Y, Li M, et al. Therapeutic and prognostic potential of GPCRs in prostate cancer from multi-omics landscape. *Front Pharmacol.* 2022;13:997664.
146. Pereira M, Vale N. Repurposing Alone and in Combination of the Antiviral Saquinavir with 5-Fluorouracil in Prostate and Lung Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23:12240.
147. Bİber A, Durusu İZ, Özen C. In vitro anticancer effect of tricyclic antidepressant nortriptyline on multiple myeloma. *Turkish J Biol.* 2018;42:414–21.
148. Cheng X, Zhao W, Zhu M, Wang B, Wang X, Yang X, et al. Drug repurposing for cancer treatment through global propagation with a greedy algorithm in a multilayer network. *Cancer Biol Med.* 2021;19:74–89.
149. Pan C, Shaw C, Huang J, Kuo C, Kuo D. Effect of Nortriptyline on Cytosolic Ca²⁺ Regulation and Viability in PC3 Human Prostate Cancer Cells. *Drug Dev Res.* 2010;71:323–30.
150. Batty M, Pugh R, Rathinam I, Simmonds J, Walker E, Forbes A, et al. The Role of α 1-Adrenoceptor Antagonists in the Treatment of Prostate and Other Cancers. *Int J Mol Sci.* 2016;17:1339.
151. Loughlin KR. Calcium channel blockers and prostate cancer. *Urol Oncol.* 2014;32:537–8.

152. Ji J, Sundquist J, Sundquist K. Use of terbinafine and risk of death in patients with prostate cancer: A population-based cohort study. *Int J Cancer*. 2019;144:1888–95.
153. Kadavakollu S, Stailey C, Kunapareddy CS, White S. Clotrimazole as a Cancer Drug: A Short Review. *Med Chem (Los Angeles)*. 2014;4:722–4.
154. Weng N, Zhang Z, Tan Y, Zhang X, Wei X, Zhu Q. Repurposing antifungal drugs for cancer therapy. *J Adv Res*. 2022;2090:00199.
155. Lima TS, Souza LO, Iglesias-Gato D, Elversang J, Jørgensen FS, Kallunki T, et al. Itraconazole Reverts ABCB1-Mediated Docetaxel Resistance in Prostate Cancer. *Front Pharmacol*. 2022;13:869461.
156. Patel V, Liaw B, Oh W. The role of ketoconazole in current prostate cancer care. *Nat Rev Urol*. 2018;15:643–651.
157. Ioannidou E, Moschetta M, Shah S, Parker JS, Ozturk MA, Pappas-gogos G, et al. Angiogenesis and Anti-Angiogenic Treatment in Prostate Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets. *Int J Mol Sci*. 2021;22:9926.
158. Aminsharifi A, Simon R, Polascik TJ, Robertson CN, Collins BH, Moul JW. Evaluation and Active Treatment versus Active Surveillance of Localized Prostate Cancer in Renal Transplant Patients in the Era of Low and Very Low Risk Prostate Cancer. *J Urol*. 2019;202:469–74.
159. Vinklarova L, Schmidt M, Benek O, Musilek FGK. Friend or enemy? Review of 17 β -HSD10 and its role in human health or disease. *J Neurochem*. 2020;155:231–49.
160. Reformulating a novel therapeutic for lung cancer. [Internet]. [cited 2023 Feb 9]. Available from: <https://www.nature.com/articles/d43747-020-00222-0>
161. Shaw V, Srivastava S, Srivastava SK, Therapy TC. Repurposing Antipsychotics of the Diphenylbutylpiperidine Class for Cancer Therapy. *Semin Cancer Biol*. 2021;68:75–83.
162. Zhou W, Chen M, Yu H, Zhong Z. The antipsychotic drug pimozide inhibits cell growth in prostate cancer through suppression of STAT3 activation. *Int J Oncol*. 2016;48:322–8.
163. Sulsenti R, Frossi B, Bongiovanni L, Cancila V, Ostano P, Fischetti I, et al. Repurposing of the Antiepileptic Drug Levetiracetam to Restrain Neuroendocrine Prostate Cancer and Inhibit Mast Cell Support to Adenocarcinoma. *Front Immunol*. 2021;12:622001.
164. Wang L, Fang D, Xu J, Luo R. Various pathways of zoledronic acid against osteoclasts and bone cancer metastasis: a brief review. *BMC Cancer*. 2020;20:1059.
165. Hu Q, Sun W, Wang C, Gu Z. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;98:19–34.
166. Hafeez B Bin, Ganju A, Sikander M, Kashyap VK, Bin Z, Chauhan N, et al. Ormeloxifene suppresses prostate tumor growth and metastatic phenotypes via inhibition of oncogenic β -catenin signaling and EMT progression. *Mol Cancer Ther*. 2017;16:2267–80.
167. Bainbridge A, Walker S, Smith J, Patterson K, Dutt A, Ng M, et al. IKBKE activity enhances AR levels in advanced prostate cancer via modulation of the Hippo pathway. *Nucleic Acids Res*. 2020;48:5366–82.
168. Albayrak G, Konac E, Dikmen AU, Bilen CY. Memantine induces apoptosis and inhibits cell cycle progression in LNCaP prostate cancer cells. *Hum Exp Toxicol*. 2018;37:953–8.
169. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - RoValcyte. 2020.

170. Pescovitz MD. Valganciclovir. *Transplant Rev.* 2006;20:82–7.
171. Stragliotto G, Pantalone MR, Rahbar A, Söderberg-Nauclér C. Valganciclovir as add-on to standard therapy in secondary glioblastoma. *Microorganisms.* 2020;8:1471.
172. Sutcliffe S, Till C, Gaydos CA, Jenkins FJ, Goodman PJ, Hoque AM, et al. Study of cytomegalovirus serostatus and prostate cancer risk in the prostate cancer prevention trial. *Cancer Causes Control.* 2012;23:1511–8.
173. Söderberg-Nauclér C, Rahbar A, Stragliotto G. Survival in Patients with Glioblastoma Receiving Valganciclovir. *N Engl J Med.* 2013;369:985–6.
174. Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol.* 2003;170:998–1002.
175. Infarmed (Infomed). Resumo das características do medicamento - Baraclude. 2011.
176. Entecavir. [Internet]. [cited 2023 May 20]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Entecavir>
177. Kim DY, Kim JH, Tak WY, Yeon JE, Lee JH, Yoon JH, et al. Baracle® vs Baraclude® for 48 weeks in patients with treatment-naïve chronic hepatitis B: A comparison of efficacy and safety. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:3145–52.
178. Lim YS. Management of antiviral resistance in chronic hepatitis B. *Gut Liver.* 2017;11:189–95.
179. Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology.* 2009;49:S174–S184.
180. Tang H, Griffin J, Innaimo S, Lehman-Mckeeman L, Llamoso C. The discovery and development of a potent antiviral drug, entecavir, for the treatment of chronic hepatitis b. *J Clin Transl Hepatol.* 2013;1:51–8.
181. Shang J, Zhou J, Liu H, Ise RM, Tu Y, Ran J, et al. Efficacy of different nucleoside analog rescue therapies for entecavir-resistant chronic hepatitis B patients. *BMC Infect Dis.* 2021;21:912.
182. Takayama H, Komura T, Kagaya T, Sugimoto S, Orita N, Asahina Y, et al. Clinical Features and Resistance to Entecavir Monotherapy of Patients with Hepatitis B. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2021;2021:3259833.
183. Ekpanyapong S, Reddy KR. Hepatitis B Virus Reactivation: What Is the Issue, and How Should It Be Managed? *Clin Liver Dis.* 2020;24:317–33.
184. Shih CA, Chen WC. Prevention of hepatitis B reactivation in patients requiring chemotherapy and immunosuppressive therapy. *World J Clin Cases.* 2021;9:5769–81.
185. Zhang X, Zhou Y, Chen C, Fang W, Cai X, Zhang X, et al. Hepatitis B virus reactivation in cancer patients with positive Hepatitis B surface antigen undergoing PD-1 inhibition. *J Immunother Cancer.* 2019;7:322.
186. Jose A, Shenoy GG, Rodrigues GS, Kumar NAN, Munisamy M, Thomas L, et al. Histone demethylase KDM5B as a therapeutic target for cancer therapy. *Cancers (Basel).* 2020;12:2121.
187. Ohguchi Y, Ohguchi H. Diverse Functions of KDM5 in Cancer: Transcriptional Repressor or Activator? *Cancers (Basel).* 2022;14:3270.
188. Li G, Kanagasabai T, Lu W, Zou MR, Zhang S, Celada SI, et al. KDM5B is essential for the hyper-activation of PI3K/AKT signaling in prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2020;80:4633–43.

189. Yoo J, Kim GW, Jeon YH, Kim JY, Lee SW, Kwon SH. Drawing a line between histone demethylase KDM5A and KDM5B: their roles in development and tumorigenesis. *Exp Mol Med*. 2022;54:2107–17.
190. Di Nisio E, Licursi V, Mannironi C, Buglioni V, Paiardini A, Robusti G, et al. A truncated and catalytically inactive isoform of KDM5B histone demethylase accumulates in breast cancer cells and regulates H3K4 tri-methylation and gene expression. *Cancer Gene Ther*. 2023;30:822–32.
191. Montano MM, Yeh IJ, Chen Y, Hernandez C, Kiselar JG, De La Fuente M, et al. Inhibition of the histone demethylase, KDM5B, directly induces re-expression of tumor suppressor protein HEXIM1 in cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2019;21:138.
192. Kaur N, Saini A, Walia A, Saxena R, Mathur P, Jha V. The Role of Tumor Suppressor Gene Epigenetic Regulation in the Prognosis of Chemotherapy Resistance and Aggressiveness of Breast and Lung Cancer. *Adv Clin Med Res*. 2023;4:1–17.
193. Fu YD, Huang MJ, Guo JW, You YZ, Liu HM, Huang LH, et al. Targeting histone demethylase KDM5B for cancer treatment. *Eur J Med Chem*. 2020;208:112760.
194. Robertson AG, Meghani K, Cooley LF, McLaughlin KA, Fall LA, Yu Y, et al. Expression-based subtypes define pathologic response to neoadjuvant immune-checkpoint inhibitors in muscle-invasive bladder cancer. *Nat Commun*. 2023;14:2126.
195. Zheng L, Wu Y, Shen L, Liang X, Yang Z, Li S, et al. Mechanisms of JARID1B Up-Regulation and Its Role in Helicobacter pylori-Induced Gastric Carcinogenesis. *Front Oncol*. 2021;11:757497.
196. Wang Z, Tang F, Qi G, Yuan S, Zhang G, Tang B, et al. KDM5B is overexpressed in gastric cancer and is required for gastric cancer cell proliferation and metastasis. *Am J Cancer Res*. 2015;5:87–100.
197. Li Y, Chen L, Feng L, Zhu M, Shen Q, Fang Y, et al. NEK2 promotes proliferation, migration and tumor growth of gastric cancer cells via regulating KDM5B/H3K4me3. *Am J Cancer Res*. 2019;9:2364–78.
198. Wang D, Han S, Peng R, Jiao C, Wang X, Yang X, et al. Depletion of histone demethylase KDM5B inhibits cell proliferation of hepatocellular carcinoma by regulation of cell cycle checkpoint proteins p15 and p27. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35:37.
199. Guo JC, Liu Z, Yang YJ, Guo M, Zhang JQ, Zheng JF. KDM5B promotes self-renewal of hepatocellular carcinoma cells through the microRNA-448-mediated YTHDF3/ITGA6 axis. *J Cell Mol Med*. 2021;25:5949–62.
200. Schonfeld M, Averilla J, Gunewardena S, Weinman SA, Tikhanovich I. Alcohol-associated fibrosis in females is mediated by female-specific activation of lysine demethylases KDM5B and KDM5C. *Hepatol Commun*. 2022;6:2042–57.
201. Yan G, Li S, Yue M, Li C, Kang Z. Lysine demethylase 5B suppresses CC chemokine ligand 14 to promote progression of colorectal cancer through the Wnt/ β -catenin pathway. *Life Sci*. 2021;264:118726.
202. Huang D, Xiao F, Hao H, Hua F, Luo Z, Huang Z, et al. JARID1B promotes colorectal cancer proliferation and Wnt/ β -catenin signaling via decreasing CDX2 level. *Cell Commun Signal*. 2020;18:169 RESEARCH.
203. Metzler VM, de Brot S, Haigh DB, Woodcock CL, Lothion-Roy J, Harris AE, et al. The KDM5B and KDM1A lysine demethylases cooperate in regulating androgen receptor expression and signalling in prostate cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2023;11:1116424.
204. Rodrigues D, de Souza T, Coyle L, Di Piazza M, Herpers B, Ferreira S, et al. New

- insights into the mechanisms underlying 5-fluorouracil-induced intestinal toxicity based on transcriptomic and metabolomic responses in human intestinal organoids. *Arch Toxicol* [Internet]. 2021;95:2691–718. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03092-2>
205. Ewert de Oliveira B, Junqueira Amorim OH, Lima LL, Rezende RA, Mestnik NC, Bagatin E, et al. 5-Fluorouracil, innovative drug delivery systems to enhance bioavailability for topical use. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2021;61:102155.
 206. European Medicines Agency. Fluorouracil and fluorouracil related substances (capecitabine, tegafur and flucytosine) containing medicinal products. 2020.
 207. Zhang Z, Zhou L, Xie N, Nice EC, Zhang T, Cui Y, et al. Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5:113.
 208. PC-3 [Internet]. [cited 2023 Jul 29]. Available from: https://www.atcc.org/products/crl-1435?fbclid=IwAR2W6VY98aUz6Wxnp3fjm5B5wSpVp-3vjYnCgcUv030MqV_nMSKV_MlmQAo
 209. MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation [Internet]. [cited 2023 Jul 30]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>
 210. Maselli FM, Giuliani F, Laface C, Perrone M, Melaccio A, De Santis P, et al. Immunotherapy in Prostate Cancer: State of Art and New Therapeutic Perspectives. *Curr Oncol*. 2023;30:5769–94.
 211. Lourenço T, Vale N. Pharmacological Efficacy of Repurposing Drugs in the Treatment of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023;24:4154.
 212. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate*. 2011;71:1668–79.
 213. Berrouet C, Dorilas N, Rejniak KA, Tuncer N. Comparison of Drug Inhibitory Effects (IC 50) in Monolayer and Spheroid Cultures. *Bull Math Biol*. 2020;82:68.
 214. Zhang H, Holden-Wiltse J, Wang J, Liang H. A Strategy to Model Nonmonotonic Dose-Response Curve and Estimate IC50. *PLoS One*. 2013;8:e69301.
 215. FDA Antiviral Drug Advisory Committee Recommends Unanimously to Approve Entecavir for Hepatitis B [Internet]. [cited 2023 Sep 15]. Available from: https://www.natap.org/2005/HBV/031505_02.htm
 216. Center for drug evaluation and research: Lonsurf (trifluridine and tipiracil) [Internet]. [cited 2023 Sep 15]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/207981Orig1s000PharmR.pdf
 217. Pros and cons of normalizing the data [Internet]. [cited 2023 Sep 16]. Available from: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/reg_pros_and_cons_of_normalizing.htm