

Medicina de precisión basada en el estudio de la contribución de la hipoxia a la agresividad del cáncer de próstata

ANTECEDENTES E INTERÉS CIENTÍFICO

El **cáncer de próstata** es actualmente el cáncer más común entre los varones europeos y representa la tercera causa de muerte (www.globocan.iarc.fr). Esta patología se inicia por la proliferación aberrante de las células epiteliales que causa la neoplasia intraepitelial de próstata (PIN, por sus siglas en inglés). El crecimiento descontrolado de dichas células altera la estructura de la membrana basal de la glándula prostática, lo que lleva a la aparición de lesiones invasivas (PCa). Estas lesiones invasivas, inicialmente localizadas, pueden adquirir, sin embargo, un fenotipo metastásico (M) que es la causa principal de la morbilidad asociada al cáncer de próstata¹. En efecto, la supervivencia al cabo de 5 años decae de aproximadamente un 99% a un 30% al comparar pacientes con tumores localizados o metastásicos, respectivamente, en el momento del diagnóstico de la enfermedad.

Hace un siglo, Otto Warburg realizó experimentos seminales en los que demostró que las células cancerosas exhiben un **metabolismo celular** aberrante que es responsable, en buena parte, de su capacidad para adaptarse y sobrevivir en un medio hostil favoreciendo su diseminación a tejidos distantes². En este sentido, tras un análisis exhaustivo de los co-reguladores transcripcionales que coordinan las diferentes redes metabólicas, nuestro grupo ha puesto de manifiesto que PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) ejerce una actividad supresora de metástasis en PCa³⁻⁵. Desde un punto de vista mecanístico, PGC1 α promueve la respiración mitocondrial a expensas de la producción de biomasa, y el receptor nuclear ERR α (*Steroid hormone receptor ERR1*) es crítico para la actividad supresora de metástasis de PGC1 α . Acorde con estos resultados, la expresión de un conjunto de genes diana de ERR α , que están bajo el control de la expresión de PGC1 α , está progresivamente regulado a la baja en PCa y enfermedad metastásica^{3,5}.

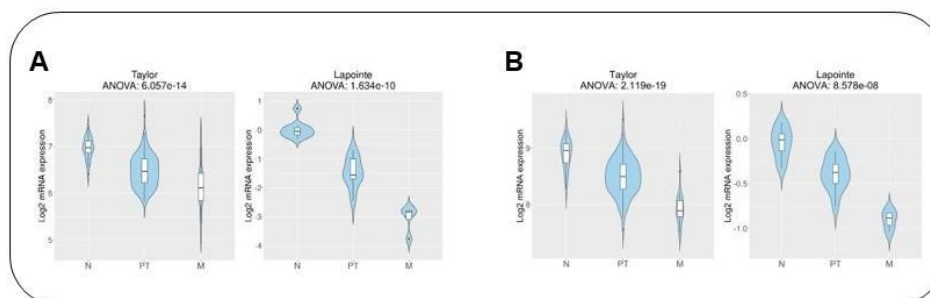


Figura 1: El co-regulador metabólico PGC1 α suprime la metástasis del cáncer de próstata. Análisis de la expresión de PGC1 α (A) o de la firma genética formada por un conjunto de 10 genes que da cuenta de la actividad PGC1 α /ERR α (B) en próstata normal (N), tumor primario (PT) y especímenes metastásicos (M) en dos bases de datos de pacientes (Taylor y Lapointe). Tamaño de la muestra: Taylor N=29, PT=131 y Met=19; Lapointe N=9, PT=13 y Met=4 (Imagen adaptada de 3 y 5).

El factor de transcripción HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) se identificó inicialmente como un regulador de la eritropoyesis en respuesta a **hipoxia**⁶. No obstante, muy rápidamente se identificaron secuencias HREs (*Hypoxia Response Element*) en las regiones reguladoras de otros genes y, entre ellos, un número considerable de enzimas glicolíticas y metabólicas⁷. Curiosamente, estos estudios revelaron la regulación de isoformas específicas con un patrón muy semejante al previamente descrito en células cancerosas como consecuencia del efecto Warburg, y establecieron una primera conexión entre hipoxia/HIF y las alteraciones metabólicas en cáncer. Hoy sabemos que la hipoxia tumoral y el metabolismo alterado son características clásicas del cáncer estrechamente relacionadas entre sí que avalan, por ejemplo, el uso de 18-FDG para el diagnóstico de cáncer por tomografía por emisión de positrones (PET-FDG)⁸. Además, los tumores de próstata con un mayor índice hipóxico son más agresivos y resistentes a terapias si bien se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes⁹.

HIF es un heterodímero formado por una subunidad HIF- α que se expresa constitutivamente y una subunidad HIF- β , cuya estabilidad determina la actividad del complejo¹⁰. Existen tres isoformas HIF- α (1 α , 2 α y 3 α), de las cuales HIF-1 α y HIF-2 α son las mejor estudiadas¹¹. La hidroxilación de HIF- α (Pro⁴⁰² y Pro⁵⁶⁴ en el caso de HIF-1 α humano) catalizada por las PHDs (*Prolyl Hydroxylases Domain containing proteins*), desencadena su ubiquitinación, mediada por VHL, y posterior degradación en el proteasoma¹²⁻¹⁶. En condiciones basales, la vida media de HIF- α es extremadamente corta ($t_{1/2}$ < 5 min). Por el

contrario, la privación de oxígeno estabiliza HIF- α al bloquear su hidroxilación y posterior degradación. El aporte de oxígeno es, sin duda alguna, un factor determinante en la regulación de las PHDs, pero no es el único. En efecto, diferentes rutas metabólicas alteradas en cáncer promueven la activación de HIF. Una posibilidad es la inhibición de las PHDs como consecuencia de la disminución en los niveles de Fe(II) o la disponibilidad de ciertos intermediarios del ciclo de Krebs como el 2-oxoglutarato (2-OG), fumarato, succinato o citrato¹⁷⁻²⁰. También, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mutaciones en ciertos oncogenes y genes supresores de tumores activan HIF^{21,22}. Más recientemente, fruto de un rastreo génico a gran escala, nuestro laboratorio ha puesto de manifiesto la implicación de dos nuevas enzimas, USP11 y USP29, en la regulación no canónica de HIF- α .

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La terapia con trastuzumab de pacientes con cáncer de mama HER2⁺ ejemplifica los beneficios de la implementación de la "medicina de precisión" en cáncer. Sin embargo, este tipo de aproximación es hoy en día inexistente en el contexto del cáncer de próstata agresivo. La aplicación de tal estrategia requiere la identificación previa de las alteraciones moleculares asociadas al PCa, para definir vulnerabilidades específicas frente a las que diseñar nuevas aproximaciones terapéuticas.

Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que el estatus metabólico de las células cancerosas gobierna su potencial metastásico. En este contexto y dada la estrecha conexión entre hipoxia/HIF y la reprogramación metabólica, postulamos que **la disponibilidad y utilización de oxígeno en cáncer de próstata** determina su agresividad y ofrece una oportunidad terapéutica. Para abordar esta hipótesis, propusimos 3 objetivos principales en la propuesta inicial:

Objetivo 1: Definir el papel de los sensores de oxígeno y las especies reactivas de oxígeno en la adquisición de propiedades invasivas en el PCa.

Objetivo 2: Analizar el potencial terapéutico de la manipulación del oxígeno en el contexto del PCa.

Objetivo 3: Desarrollar un biomarcador pronóstico con poder predictivo basado en la utilización y disponibilidad de oxígeno.

En el transcurso de este proyecto, y en base a los propios resultados, hemos añadido un **Objetivo 4:** Definir el papel de la hipoxia en la progresión del PCa a través de la regulación del metabolismo de las poliaminas (PAs).

RESULTADOS DEL PROYECTO

Objetivo 1: Definir el papel de los sensores de oxígeno y las especies reactivas de oxígeno en la adquisición de propiedades invasivas en el PCa.

Nuestros resultados han confirmado que la expresión de PGC1 α en cáncer de próstata metastásico va acompañado de una profunda disminución en los niveles de HIF- α (HIF-1 α y HIF-2 α ; Fig. 1A y resultados mostrados en justificaciones anteriores) y sus genes diana entre los que se encuentran CA9 (implicado en la regulación del pH), LDHA (enzima clave de la glicólisis y cuya represión podría resultar clave para asegurar el metabolismo oxidativo asociado con la expresión de PGC1 α) y BNIP3 que regula la supervivencia (Fig. 1B). Esta regulación implica la vía PGC1 α /ERR α (Fig. 1B), acorde con los resultados previos que posicionan ERR α como mediador esencial de la actividad supresora de metástasis de PGC1 α .

Estos resultados obtenidos en modelos celulares han sido confirmados *in vivo*. En concreto, hemos evaluado la expresión relativa de HIF-1 α en tumores aislados de dos modelos murinos de PCa disponibles en el laboratorio^{3,5}: PTEN (*PTEN*^{-/-}) y PTP (*PTEN*^{-/-} x *PGC1A*^{-/-}). En este contexto, hemos detectado una mayor acumulación de HIF-1 α en el modelo PTP (Fig. 1C). Este modelo se caracteriza por la pérdida simultánea de *PGC1A* y *PTEN* y la aparición de lesiones prostáticas invasivas que progresan a metástasis frente al modelo *PTEN* que conserva intacta la expresión de PGC1 α y se asocia con lesiones prostáticas menos agresivas. Por otra parte, tal y como anticipamos, hemos puesto de manifiesto que la pérdida de PGC1 α genera un tumor "super-hipóxico" en el que la acumulación de HIF-1 α desborda su localización clásicamente restringida a zonas hipóxicas y abarca zonas en las que disponibilidad de oxígeno no está comprometida (Fig. 1D).

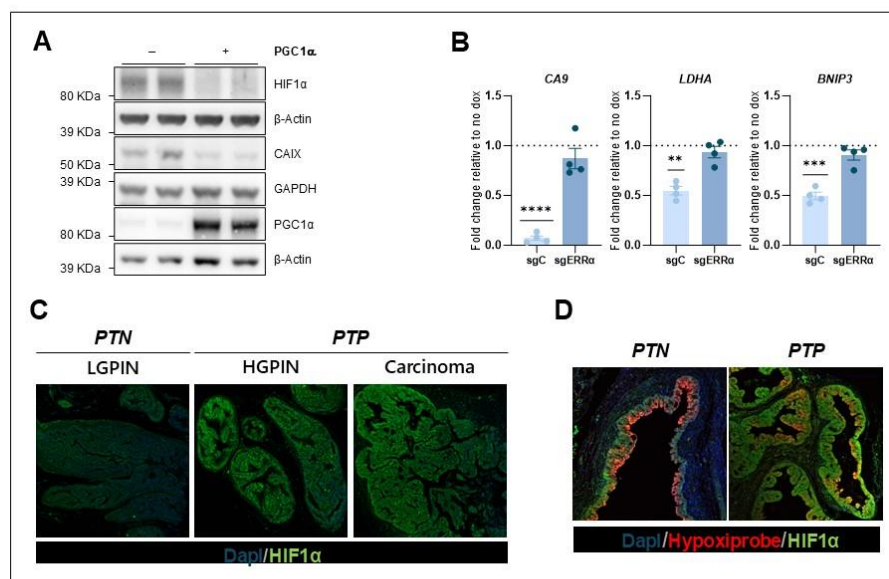


Figura 1. La expresión de PGC1 α neutraliza la señalización hipóxica. **A:** Para inducir la expresión de PGC1 α , las células PC3 TRIPZ-PGC1A se trataron en presencia o no de DOX (0.5 μ g/ml) durante 48h. Los extractos proteicos se resolvieron en geles SDS y la expresión de HIF- α , CAIX, PGC1 α y β -actina/GAPDH (utilizado como control de carga) se analizó por WB. La gráfica muestra los resultados correspondientes a 1 experimento representativo, de al menos 3 experimentos independientes, realizado en duplicados. **B:** Células PC3 TRIPZ-PGC1A sgControl, sgERR α (en las que se deletó ESRR α utilizando la técnica de CRISPR/Cas9) se trataron como en A y se preparó el mRNA. Los niveles de CA9, LDHA y BNIP3 se analizaron por RT-qPCR. La gráfica representa los niveles de expresión relativos (media $\pm$ SEM) en presencia de DOX. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético=1) para el análisis estadístico ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$. **C:** Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia (tinción azul para los núcleos con DAPI y verde para HIF-1 α) de tumores de próstata de ratones de 3 meses de edad correspondientes a dos genotipos diferentes: PTN ($n=5$) y PTP ($n=9$). Estos genotipos desarrollan LGPIN (neoplasia intraepitelial prostática de bajo grado) y carcinoma o HGPIN (neoplasia intraepitelial prostática de alto grado), respectivamente. **D:** Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia (tinción azul para los núcleos con DAPI, roja para las regiones hipóxicas y verde para HIF-1 α) de tumores xenografts en función de la presencia o no de PGC1 α . Para ello, generamos tumores “xenografts” con nuestro modelo celular (PC3 TRIPZ-PGC1A) y previo al sacrificio de los ratones, realizamos la inyección de un marcador tisular de hipoxia (HypoxyprobeTM) con el objetivo de analizar el grado de solapamiento entre la presencia de zonas hipóxicas y la expresión de HIF-1 α en función de la presencia o no de PGC1 α .

Desde un punto de vista mecanístico, el efecto inhibitor de PGC1 α sobre HIF-1 α es independiente de las especies reactivas de oxígeno (ROS) e implica la vía canónica de regulación de HIF- α dado que es inversa y gradualmente proporcional a los niveles de hipoxia y se pierde al inhibir el proteasoma y la actividad de las PHDs, los sensores de oxígeno (resultados presentados en justificaciones anteriores). Además, nuestros resultados muestran un efecto inesperado y directo de PGC1 α sobre los niveles de expresión de los sensores de oxígeno. En detrimento de PHD1 y PHD3 y acorde con el papel clave de PHD2 en la regulación de HIF-1 α ²³, PGC1 α aumenta los niveles de esta enzima (Fig. 2A). Dicho aumento se asocia directamente con un aumento en la actividad hidroxilasa en base a la relativa baja afinidad de PHD2 por el oxígeno²¹. En concreto, PGC1 α se une a la región promotora del gen *EGLN1* (que codifica la proteína PHD2) a través de ERR α (Fig. 2B). Por último, nuestros datos muestran el papel central de PHD2 en la regulación de HIF-1 α mediada por PGC1 α . En este sentido, hemos demostrado que el silenciamiento de *EGLN1*, pero no de *EGLN2* ni *EGLN3* que codifican PHD1 y PHD3, respectivamente, neutraliza el efecto inhibitor de la expresión de PGC1 α sobre la activación de HIF-1 α y su cascada de señalización celular (Fig. 2C). En consonancia con la relevancia clínica de estos resultados, la expresión de *EGLN1*/PHD2 correlaciona positivamente con la expresión de la firma genética que da cuenta de la actividad PGC1 α /ERR α en diferentes bases de datos que analizan la expresión de genes en pacientes con cáncer de próstata (resultados mostrados en justificaciones anteriores).

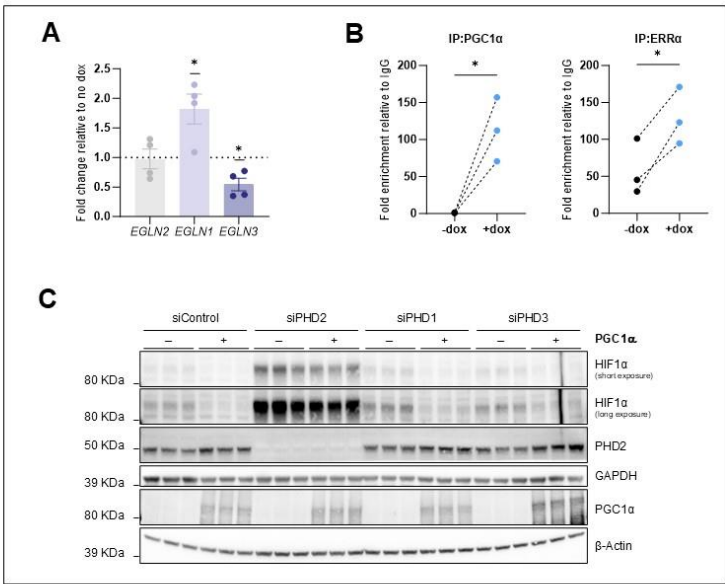


Figura 2. PGC1α regula la expresión de EGLN1/PHD2, mediador del efecto inhibitor de PGC1α sobre la señalización hipóxica en cáncer de próstata. **A:** Células PC3 TRIPZ-PGC1A se trataron en presencia o no de DOX (0.5 µg/ml) durante 48h y se extrajo el mRNA. Los niveles de los sensores de oxígeno (EGLN2/PHD1, EGLN1/PHD2 y EGLN3/PHD3) se analizaron por RT-qPCR. La gráfica representa los niveles de expresión relativos (media ± SEM) en presencia de DOX. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético=1) para el análisis estadístico * $p < 0.05$. **B:** Células PC3 TRIPZ-PGC1A se trataron como en A y se aisló la cromatina que se inmunoprecipitó (ChIP) con anticuerpos frente a PGC1α (panel izquierdo) o ERRα (panel derecho). La presencia de la región promotora de EGLN1/PHD2 en el DNA asociado a tales inmunoprecipitados se analizó por qPCR. Las gráficas representan la media ± SEM normalizada frente a IgG (utilizada como control negativo). Se utilizó One sample T-test (valor hipotético=1) y Paired T-test para el análisis estadístico * $p < 0.05$. **C:** Tras el silenciamiento individual de cada una de las isoformas de las PHDs, las células PC3 TRIPZ-PGC1α se trataron en presencia o no de DOX (0.5 µg/ml) durante 24h y se extrajo la proteína. Los extractos proteicos se resolvieron en geles SDS y la expresión de HIF-1α, PHD2, PGC1α y β-actina/GAPDH (utilizado como control de carga) se analizó por WB. La gráfica muestra los resultados correspondientes a 1 experimento, representativo de al menos 3 experimentos independientes, realizado en triplicados.

En su conjunto, nuestros resultados sugieren un comportamiento antagónico de PGC1α e hipoxia *vis-a-vis* de la expresión de HIF-α y su cascada de señalización. PGC1α se opone mientras que la hipoxia promueve HIF-α.

Objetivo 2: Analizar el potencial terapéutico de la manipulación del oxígeno en el contexto del PCa.

En primer lugar, hemos analizado la importancia del eje PGC1α/PHD2/HIF1α en la adquisición de propiedades invasivas de PCa *in cellulo*. Para ello, hemos creado una línea celular estable en la que EGLN1/PHD2 ha sido silenciado usando shRNAs (short hairpin RNAs). Estas células, además, sobreexpresan PGC1α de forma inducible gracias a la adición de doxiciclina. Los resultados muestran que el silenciamiento de EGLN1/PHD2 no afecta al crecimiento de células tumorales (Fig. 3A), pero promueve la supervivencia de estas células (Fig. 3B). Además, hemos puesto de manifiesto que el silenciamiento de EGLN1/PHD2 rescata el efecto inhibitor de PGC1α sobre la generación de tumores en un contexto *in vivo* en el que evaluamos el tiempo libre de enfermedad de cada ratón (Fig. 3C).

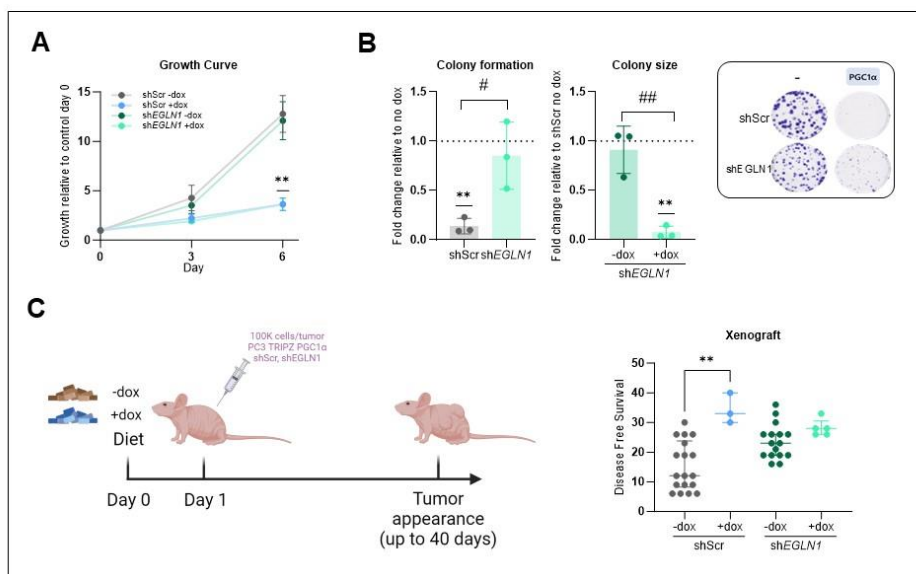


Figura 3. El eje PHD2/HIF1 α rescata el efecto inhibitor de PGC1 α sobre la adquisición de propiedades invasivas de PCa. **A:** Células PC3 TRIPZ-PGC1 α shControl y shEGLN1 se trataron en presencia o no de DOX (0.5 μ g/ml) durante 0, 3 y 6 días y se analizó su proliferación. La expresión inducible de PGC1 α reduce la capacidad de crecimiento de las células tumorales PC3, pero el silenciamiento constitutivo de EGLN1/PHD2 (85% de eficacia de silenciamiento) no altera su proliferación. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM normalizada frente al número de células el día 0. Se utilizó Paired T-test para el análisis estadístico ** $p < 0.01$. **B:** Células PC3 TRIPZ-PGC1 α shControl y shEGLN1 se trataron en presencia o no de DOX (0.5 μ g/ml) durante 14 días y se analizó la formación de colonias por tinción con cristal violeta. El silenciamiento de EGLN1/PHD2 rescata parcialmente el efecto inhibitor de PGC1 α sobre la capacidad de formación de foci de las células tumorales. La gráfica representa la media $\pm$ SEM normalizada frente a -DOX. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético=1) para el análisis estadístico ** $p < 0.01$. Unpaired T-test se utilizó para el análisis estadístico entre las muestras +DOX (* $p < 0.05$). **C:** Se inyectaron 100.000 células PC3 ($\pm$ shEGLN1 y $\pm$ DOX) en 4 inyecciones/ratón en 4 flancos diferentes (n=5 ratones/condición, 20 tumores en total/condición) y se analizó la aparición de tumores durante 40 días. El silenciamiento de EGLN1/PHD2 neutraliza el efecto de PGC1 α aumentando el tiempo de aparición de tumores xenograft, y, por tanto, el tiempo libre de enfermedad en ratones inmuno-incompetentes. La gráfica representa la mediana $\pm$ intercuartil de cada una de las condiciones experimentales. Se utilizó ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) test para el análisis estadístico ** $p < 0.01$.

En su conjunto, nuestros resultados confirman la relevancia del eje PGC1 α /PHD2/HIF1 α en la adquisición de propiedades invasivas de PCa acorde con el comportamiento antagónico de PGC1 α e HIF- α vis-a-vis de la progresión tumoral.

Objetivo 3: Desarrollar un biomarcador pronóstico con poder predictivo basado en la utilización y disponibilidad de oxígeno.

Para el diseño de esta “firma hipóxica” combinamos los resultados de tres estudios independientes, realizados a gran escala en modelos de próstata, en los que se analizaban genes diferencialmente expresados en condiciones de hipoxia²⁴⁻²⁶. Posteriormente, seleccionamos de este listado de genes aquellos cuya perturbación evidencia un valor pronóstico en cáncer de próstata. Para ello, utilizamos como parámetro de selección el tiempo libre de enfermedad hasta recurrencia bioquímica (DFS, por sus siglas en inglés) y explotamos bases de datos públicas de expresión génica de tumores de próstata usando CANCERTOOL (<http://web.bioinformatics.cicbiogune.es/CANCERTOOL/index.html>)²⁷. Así, recopilamos un total de 80 genes diferencialmente expresados en condiciones de hipoxia (32, 28 y 20, respectivamente, en cada uno de los estudios anteriormente citados) con valor pronóstico en cáncer de próstata. Por último, analizamos las posibles combinaciones de estos genes cuya perturbación conjunta presenta el mayor valor pronóstico utilizando de nuevo el valor de DFS en las bases de datos Glinsky, TCGA y Taylor, según la herramienta CANCERTOOL. De este modo, obtuvimos nuestra “firma hipóxica” compuesta por un total de 6 genes (Figura 4A y B). Esta firma muestra, además, un valor pronóstico en cáncer de mama y pulmón, pero no en cáncer de colon, un resultado no necesariamente esperado (Figura 4C).

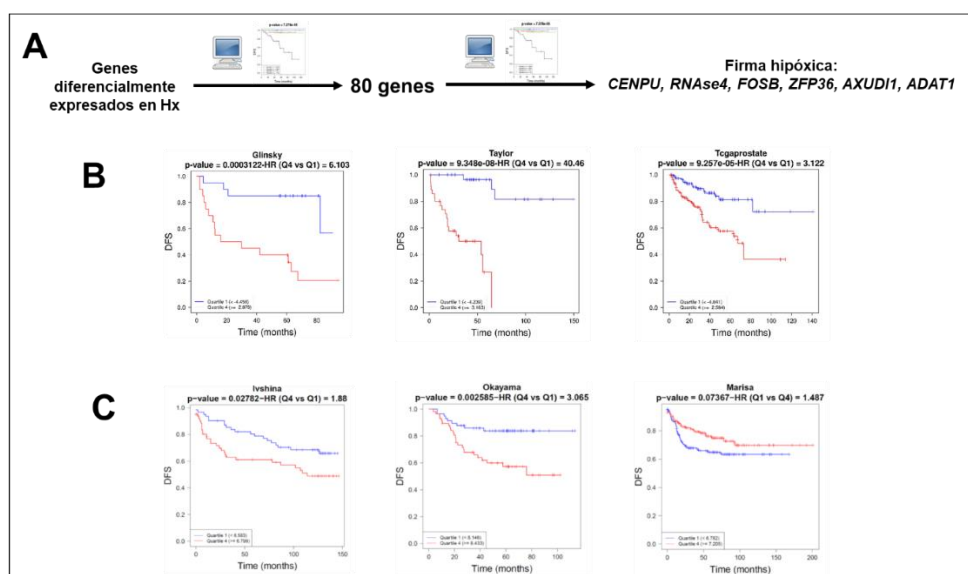


Figura 4. Desarrollo de la firma genética OXYGnature. **A:** esquema representativo de la estrategia implementada para el desarrollo de la firma hipóxica. **B:** Asociación de la firma hipóxica (azul/baja expresión: pacientes cuya expresión corresponde al 1er cuartil; rojo/alta expresión: pacientes cuya expresión corresponde al 4 cuartil) con los datos de tiempo libre de enfermedad hasta recurrencia bioquímica (DFS) en tres bases de datos independientes que incluyen muestras de pacientes con cáncer de próstata: Glinsky, Taylor y TCGA. **C:** Análisis semejante al de B solo que en este caso se han utilizado bases de datos de pacientes con cáncer de mama (panel izquierdo), pulmón (panel central) y colon (panel derecho).

Objetivo 4: Definir el papel de la hipoxia en la progresión del PCa a través de la regulación del metabolismo de las poliaminas (PAs).

El efecto represor de PGC1 α sobre el metabolismo de las poliaminas (PAs) se ha descrito recientemente como uno de los mecanismos centrales por los que PGC1 α ejerce su papel como gen supresor de tumores y suprime la metástasis del cáncer de próstata²⁸. Las poliaminas son unos metabolitos catiónicos (putrescina, espermidina y espermina) de gran importancia en numerosas funciones biológicas entre las que se incluye la progresión de diferentes tipos tumorales²⁹. En concreto, nuestro laboratorio demostró hace unos años que un aumento en el metabolismo de estos metabolitos favorece la progresión del cáncer de próstata³⁰. Sin embargo, resultados más recientes muestran un efecto dual de las PAs dado que la disminución en el metabolismo de las PAs promueve un fenotipo de células cancerosas super-resistentes. Esta paradoja es una de las líneas de investigación prioritarias en nuestro laboratorio dado que su comprensión podría ayudar a entender, entre otras, las razones por las que han fallado los ensayos clínicos con inhibidores de la síntesis de PAs y por ende, abrir la oportunidad a nuevas aproximaciones terapéuticas. En este sentido, nos planteamos una nueva hipótesis de trabajo: la hipoxia regula el metabolismo de las PAs.

Los niveles de PAs están estrechamente regulados a nivel de su síntesis y catabolismo. La ornitina descarboxilasa (ODC1) y la S-adenosilmetionina descarboxilasa (AMD1) son las dos enzimas limitantes de la biosíntesis de PAs (Fig. 5A). Nuestros resultados muestran que la hipoxia inhibe la expresión de las enzimas más relevantes implicadas en la ruta de biosíntesis de PAs (Fig. 5B). Estos resultados son coherentes con el papel de la hipoxia impulsando una reprogramación génica que garantiza la adaptación celular a un déficit de oxígeno, y extrapolables no solo a diferentes modelos celulares de próstata, incluidas líneas no transformadas sino también a modelos *in vivo* (Fig. 5B, C y resultados no mostrados).

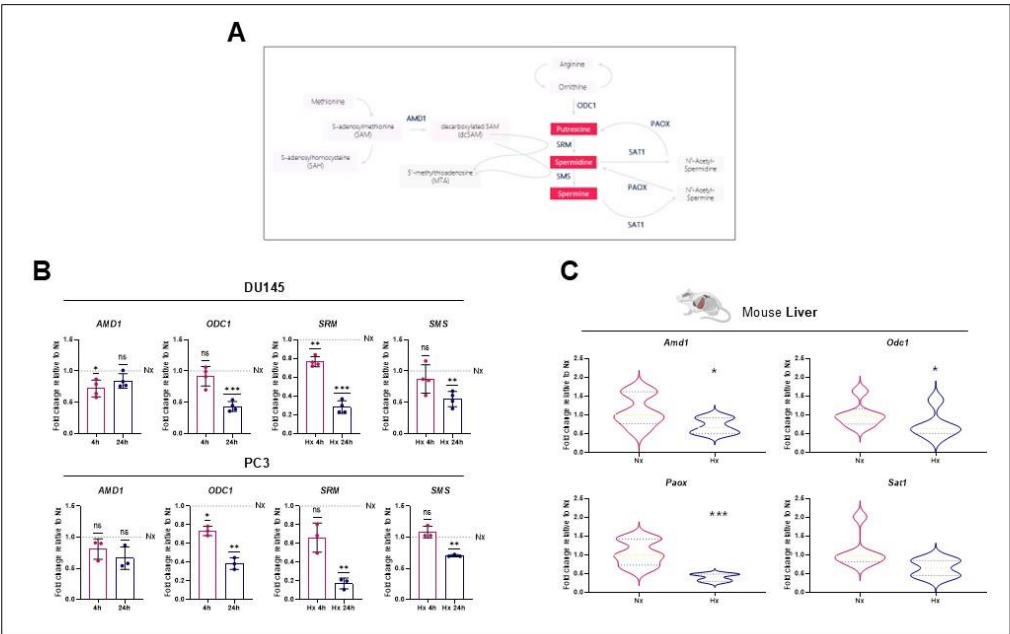


Figura 5. La hipoxia reprime la biosíntesis de PAs. **A:** Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de PAs. **B:** Células DU145 y PC3 se incubaron en normoxia (Nx; 20% O₂) o hipoxia (Hx; 1% O₂) durante 4 h o 24 h. Se preparó ARNm y los niveles de las enzimas metabólicas indicadas se analizaron mediante RT-qPCR. El gráfico representa los niveles de expresión relativos (media ± SEM) en hipoxia. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético = 1) para el análisis estadístico * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. **C:** Ratones C57BL/6 se incubaron en normoxia (Nx; 20% O₂) o hipoxia (Hx; 10 % O₂) durante 24 h. Tras su sacrificio, se extrajeron los hígados, se preparó ARNm y los niveles de las enzimas metabólicas indicadas se analizaron mediante RT-qPCR. El gráfico representa los “violín plots” de los niveles de expresión de cada una de las enzimas. Se utilizó T-test no paramétrico (Mann Whitney) para el análisis estadístico * p < 0,05, *** p < 0,001.

Para confirmar estos resultados, analizamos los niveles intracelulares de PAs mediante el uso de PolyamineRED (PAred), un derivado de éster de glicina propagílico conjugado con TAMRA (tetrametilrodamina) que penetra en las células y marca las PAs intracelulares (Fig. 6A). Incluso antes de lo que podríamos anticipar como consecuencia del efecto represor de la ruta de biosíntesis, el contenido intracelular de PAs disminuye con la hipoxia. Estos datos se validaron igualmente midiendo los niveles de PAs endógenas por UPLC-MS en colaboración con la Plataforma de Metabolómica de CIC bioGUNE (Fig. 6B).

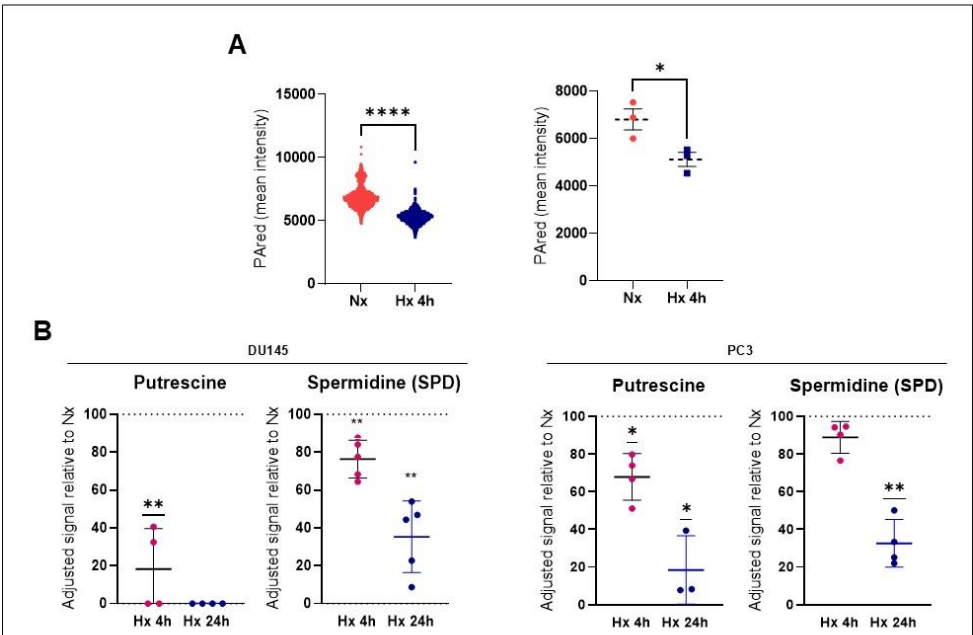


Figura 6: La hipoxia reduce el contenido de PA intracelular. **A:** Células DU145 se incubaron en normoxia (Nx; 20% O₂) o hipoxia (Hx; 1% O₂) durante 4 h en presencia de Pared (30 uM) durante los últimos 10 minutos. El panel de la izquierda muestra la intensidad de fluorescencia media individual de todas las células analizadas en un experimento representativo. El gráfico de la derecha representa la intensidad media $\pm$ SEM. Se utilizó T-test para el análisis estadístico * $p < 0,05$. **B:** Células DU145 (panel izquierdo) y PC3 (panel derecho) se incubaron en normoxia (Nx; 20% O₂) o hipoxia (Hx; 1% O₂) durante 4 h o 24 h. Los extractos celulares se prepararon y analizaron mediante UPLC-MS. El gráfico representa el contenido relativo de Putrescina y Espermidina (media $\pm$ SEM) en hipoxia. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético = 100) para el análisis estadístico ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Intrigados por una reducción tan temprana, investigamos el contenido de PAs intra- y extracelular. Los datos presentados en la Figura 7A demuestran claramente que las células de cáncer de próstata expulsan la SPD tras una hipoxia aguda. Estos resultados sugieren que la disponibilidad de oxígeno controla la dinámica de la secreción de PAs. Para confirmar estos resultados, propusimos una doble aproximación experimental: en primer lugar, analizamos los niveles extracelulares de PAs en células expuestas a diferentes niveles de oxígeno (20%, 10%, 5%, y 1%) (Fig. 7B); por otra parte, analizamos si este “tráfico” de PAs se frena al restablecer el aporte de oxígeno tras una hipoxia (Fig. 7C). Los resultados obtenidos muestran claramente que la acumulación de SPD en los medios condicionados es directamente proporcional a la severidad de la hipoxia y cesa al incubarse en normoxia las células inicialmente expuestas a hipoxia. Por ende, podemos concluir que la secreción de PAs es sensible a la disponibilidad de oxígeno.

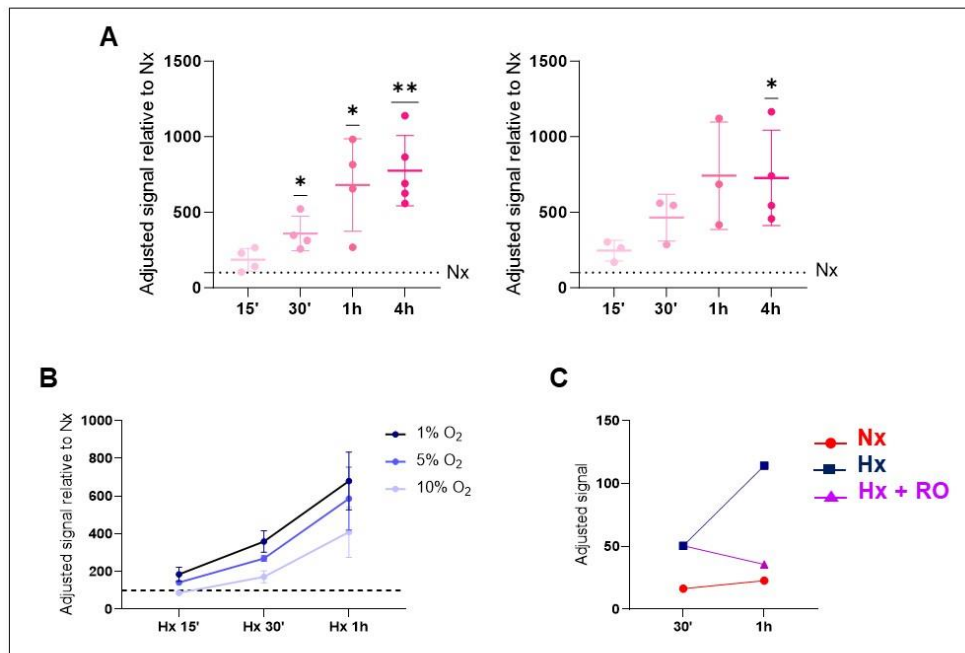


Figura 7: La hipoxia aguda libera PAs al medio extracelular. **A:** Células DU145 (panel izquierdo) y PC3 (panel derecho) se incubaron en normoxia (Nx; 20% O₂) o hipoxia (Hx; 1% O₂) a lo largo de una cinética de hipoxia de 15 min a 4 h. Se prepararon y analizaron extractos intracelulares (resultados no mostrados) y medios condicionados mediante UPLC-MS. El gráfico representa el contenido relativo de SPD (media $\pm$ SEM) en hipoxia. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético = 100) para el análisis estadístico * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **B:** Células DU145 se incubaron en normoxia (Nx; 20% O₂) y/o concentraciones graduales de hipoxia (Hx; 10%, 5% y 1% O₂) durante los períodos indicados. Los medios extracelulares se prepararon y los niveles de SPD se analizaron mediante UPLC-MS. **C:** Células DU145 se incubaron en normoxia (Nx; 20% O₂) y/o hipoxia (Hx; 1% O₂) durante los períodos indicados. Los medios extracelulares se prepararon y se analizaron mediante UPLC-MS. El gráfico representa el contenido relativo de SPD en los diferentes puntos temporales de un experimento representativo.

Todos estos datos respaldan la participación subyacente de un mecanismo de “oxygen sensing” y la implicación de un hipotético “sensor” de oxígeno (PAOS, PolyAmine Oxygen Sensor). Hasta el momento, se han descrito tres tipos principales de sensores de oxígeno: la familia de las 2-OGDD entre las que se encuentran las PHDs, el modelo MMS (Mitochondria-to-Membrane Signaling) inicialmente descrito en el contexto del cuerpo carotídeo y el sistema ADO^{14,15,31,32}. Hemos evaluado el papel potencial de cada uno de ellos en la secreción de PAs utilizando inhibidores específicos: DMOG (inhibidor de la familia de las 2-OGDDs), rotenona (inhibidor del complejo mitocondrial MCI), y dipiridilo (inhibidor de ADO). El uso de estos inhibidores sugiere la implicación del sistema ADO en la regulación de la secreción de PAs (Figura 8).

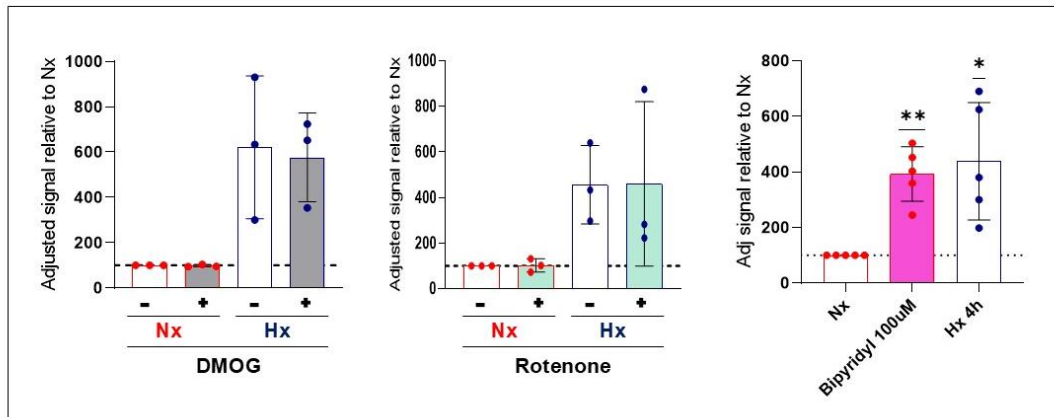


Figura 8: La inhibición de ADO mimetiza el efecto de hipoxia en la secreción de PAs al medio extracelular. Células DU145 se incubaron en presencia o ausencia de los inhibidores indicados (DMOG, panel izquierdo; Rotenona, panel central; Dipiridilo, panel derecho) en condiciones de normoxia (Nx; 20% O₂) o hipoxia (Hx; 1% O₂) durante 4 h. Los medios extracelulares se prepararon y analizaron mediante UPLC-MS. El gráfico representa el contenido relativo de SPD (media $\pm$ SEM) en cada una de las condiciones experimentales. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético = 100) para el análisis estadístico * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Acorde con su naturaleza química y dado que las PAs son metabolitos altamente protonados, trabajos pioneros de los años 90 sugieren su organización intracelular en pequeñas vesículas intracelulares³³. En este contexto y de cara a su posterior señalización autocrina/paracrina, resulta relevante establecer si las PAs secretadas están contenidas en vesículas o si, por el contrario, las vesículas intracelulares fusionan con la membrana celular y las PAs “circulan” libres en el medio extracelular. Para abordar este interrogante, hemos tamizado los medios extracelulares de las células incubadas en normoxia e hipoxia (> o < de 10 kDa) y analizado su contenido en PAs. Los resultados mostrados en la Figura 9B indican que las PAs secretadas en hipoxia circulan mayoritariamente libres en el medio extracelular (en la fracción correspondiente a < 10kDa). Por último, hemos puesto de manifiesto que la secreción de PAs en respuesta a hipoxia es un mecanismo que depende del uptake de Ca²⁺ del medio extracelular (Fig. 9C). En efecto, el tratamiento con ionomicina mimetiza el efecto de la hipoxia que, a su vez, se bloquea cuando el medio extracelular carece de Ca²⁺.

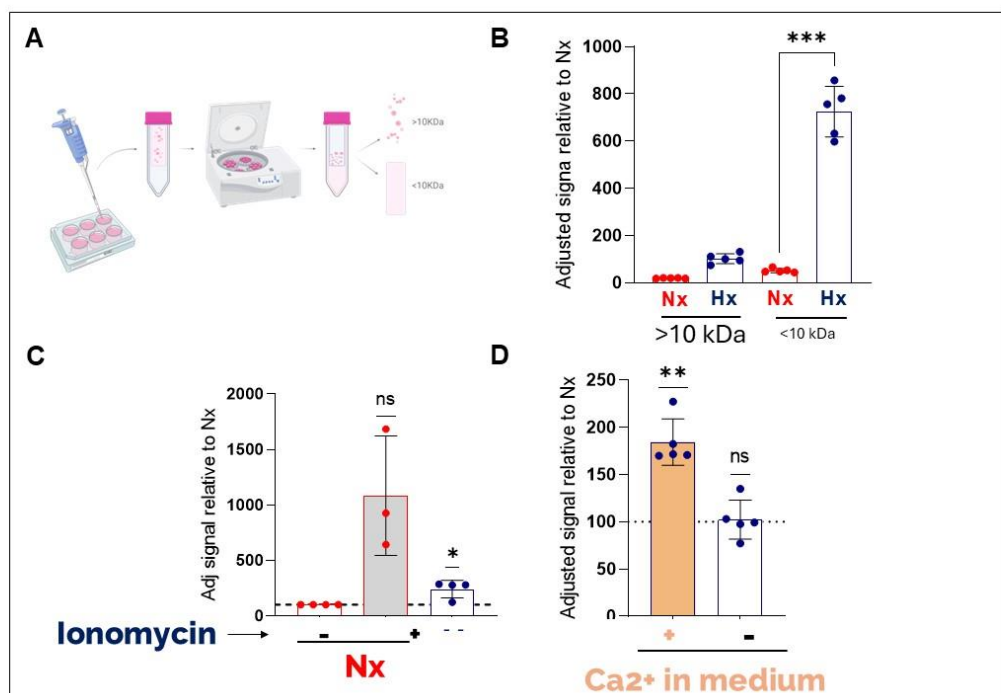


Figura 9: Las PAs son secretadas al medio extracelular por un mecanismo dependiente de Ca²⁺ y circulan libres. A: Esquema del tamizado del medio extracelular realizado en base a la centrifugación por tamaño de sus componentes. B: Células DU145 se incubaron en normoxia (Nx; 20% O₂) o hipoxia (Hx; 1% O₂) durante 4 h. Los medios extracelulares se prepararon, tamizaron y analizaron mediante UPLC-MS. El gráfico representa el contenido relativo de SPD (media $\pm$ SEM) en cada una de las condiciones experimentales. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético = 100) para el análisis estadístico * $p < 0,05$,

**** $p < 0,01$.** **C:** Células DU145 se incubaron en normoxia (Nx; 20% O_2), hipoxia (Hx; 1% O_2) o en presencia de ionomicina ($1\mu M$) durante 4 h. Los medios extracelulares se prepararon y analizaron mediante UPLC-MS. El gráfico representa el contenido relativo de SPD (media $\pm$ SEM) en cada una de las condiciones experimentales. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético = 100) para el análisis estadístico * $p < 0,05$. **D:** Células DU145 se incubaron en normoxia (Nx; 20% O_2) o hipoxia (Hx; 1% O_2) durante 4 h en presencia o ausencia de Ca^{2+} en el medio. Los medios extracelulares se prepararon y analizaron mediante UPLC-MS. El gráfico representa el contenido relativo de SPD (media $\pm$ SEM) en cada una de las condiciones experimentales. Se utilizó One sample T-test (valor hipotético = 100) para el análisis estadístico ** $p < 0,01$.

En su conjunto, nuestros resultados sugieren un efecto dual de la hipoxia (hipoxia aguda e hipoxia crónica) sobre el metabolismo de PAs (Figura 10). Ambos efectos convergen disminuyendo el contenido intracelular de PAs si bien proceden por mecanismos aparentemente independientes. A corto plazo y en cuestión de breves minutos, la hipoxia provoca la secreción de PAs al medio extracelular, mientras que, a más largo plazo, la hipoxia inhibe transcripcionalmente la expresión de las enzimas de la ruta de biosíntesis de estos metabolitos. Además, el efecto de hipoxia aguda sobre el metabolismo de PAs involucra un nuevo mecanismo de “oxygen sensing” (PAOS) a través de un sensor ADO, el cual regula la expresión/actividad de una proteína efectora que favorece la secreción lisosomal de las PAs (y muy probablemente de otros componentes lisosomales) a través de un mecanismo dependiente de Ca^{2+} .

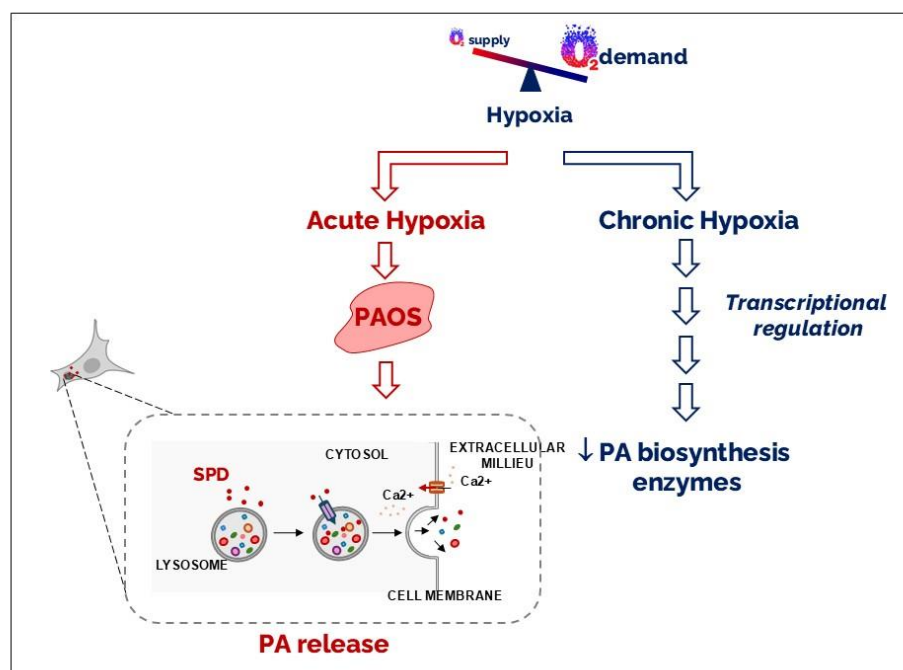


Figura 10. Efecto dual de la hipoxia sobre el metabolismo de PAs: modelo de trabajo propuesto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nardella C, Carracedo A, Salmena L, Pandolfi PP (2011) Faithfull modeling of PTEN loss driven diseases in the mouse. *Curr Top Microbiol Immunol* 347, 135-168
2. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033
3. Torrano V, Valcarcel-Jimenez L, Cortazar AR, Liu X, Urošević J, Castillo-Martin M, Fernández-Ruiz S, Morciano G, Caro-Maldonado A, Guiu M, Zúñiga-García P, Graupera M, Bellmunt A, Pandya P, Lorente M, Martín-Martín N, Sutherland JD, Sanchez-Mosquera P, Bozal-Basterra L, Zabala-Letona A, Arruabarrena-Aristorena A, Berenguer A, Embade N, Ugalde-Olano A, Lacasa-Viscasillas I, Loizaga-Iriarte A, Unda-Urzaiz M, Schultz N, Aransay AM, Sanz-Moreno V, Barrio R, Velasco G, Pinton P, Cordon-Cardo C, Locasale JW, Gomis RR, Carracedo A. (2016) *The metabolic co-regulator PGC1 α suppresses prostate cancer metastasis. Nat Cell Biol.* 18: 645-656
4. Valcarcel-Jimenez L, Gaude E, Torrano V, Frezza C, Carracedo A. (2017) Mitochondrial Metabolism: Yin and Yang for Tumor Progression. *Trends Endocrinol Metab.* 28 (10):748-757.
5. Valcarcel-Jimenez L, Macchia A, Crosas-Molist E, Schaub-Clerigué A, Camacho L, Martín-Martín N, Cicogna P, Viera-Bardón C, Fernández-Ruiz S, Rodríguez-Hernández I, Hermanova I, Astobiza I, Cortazar AR, Mendizabal J, Gómez-Muñoz A, Sanz-Moreno V, Torrano V, Carracedo A (2019) PGC1 α Suppresses Prostate Cancer Cell Invasion through ERR α Transcriptional Control. *Cancer Res.* 79 (24):6153-6165.
6. Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 12: 5447-5454
7. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (1993) Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 2423-2427
8. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 59(22):5830-5
9. Salberg UB, Skingen VE, Fjeldbo CS, Hompland T, Ragnum HB, Vlatkovic L, Hole KH, Seierstad T, Lyng H. (2022) A prognostic hypoxia gene signature with low heterogeneity within the dominant tumour lesion in prostate cancer patients. *Br J Cancer.* 127(2):321-328.
10. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 5510-5514
11. Benizri E, Ginouves A, Berra E (2008) The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell Mol Life Sci* 65: 1133-1149
12. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 292(5516):468-72
13. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 292(5516):464-8
14. Bruick RK, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337-1340
15. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-54
16. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 399(6733):271-5
17. Duran RV, MacKenzie ED, Boulahbel H, Frezza C, Heiserich L, Tardito S, Bussolati O, Rocha S, Hall MN, Gottlieb E (2013) HIF-independent role of prolyl hydroxylases in the cellular response to amino acids. *Oncogene* 32: 4549-4556.
18. Hewitson KS, Lienard BM, McDonough MA, Clifton IJ, Butler D, Soares AS, Oldham NJ, McNeill LA, Schofield CJ (2007) Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *The Journal of biological chemistry* 282: 3293-3301
19. Koivunen P, Hirsila M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, Myllyharju J (2007) Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *The Journal of biological chemistry* 282: 4524-4532
20. O'Flaherty L, Adam J, Heather LC, Zhdanov AV, Chung YL, Miranda MX, Croft J, Olpin S, Clarke K, Pugh CW, Griffiths J, Papkovsky D, Ashrafian H, Ratcliffe PJ, Pollard PJ (2010) Dysregulation of hypoxia pathways in fumarate hydratase-deficient cells is independent of defective mitochondrial metabolism. *Human molecular genetics* 19: 3844-3851
21. Berra E, Ginouves A, Pouyssegur J (2006) The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO reports* 7: 41-45
22. Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouyssegur J, Yaniv M, Mechta-Grigoriou F (2004) JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* 118: 781-794
23. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* 22: 4082-4090
24. Ragnum HB, Vlatkovic L, Lie AK, Axcróna K, Julin CH, Friestad KM, Hole KH, Seierstad T, Lyng H. (2015) The tumour hypoxia marker pimonidazole reflects a transcriptional programme associated with aggressive prostate cancer. *Br J Cancer.* 112(2):382-90

25. Yang L, Roberts D, Takhar M, Erho N, Bibby BAS, Thiruthaneeswaran N, Bhandari V, Cheng WC, Haider S, McCorry AMB, McArt D, Jain S, Alshalalfa M, Ross A, Schaffer E, Den RB, Jeffrey Karnes R, Klein E, Hoskin PJ, Freedland SJ, Lamb AD, Neal DE, Buffa FM, Bristow RG, Boutros PC, Davicioni E, Choudhury A, West CML. (2018) Development and Validation of a 28-gene Hypoxia-related Prognostic Signature for Localized Prostate Cancer. *EBioMedicine*. 182-189.
26. Bhandari V, Hoey C, Liu LY, Lalonde E, Ray J, Livingstone J, Lesurf R, Shiah YJ, Vujcic T, Huang X, Espiritu SMG, Heisler LE, Yousif F, Huang V, Yamaguchi TN, Yao CQ, Sabelnykova VY, Fraser M, Chua MLK, van der Kwast T, Liu SK, Boutros PC, Bristow RG. (2019) Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types. *Nat Genet*. 51(2):308-318
27. Cortazar AR, Torrano V, Martín-Martín N, Caro-Maldonado A, Camacho L, Hermanova I, Guruceaga E, Lorenzo-Martín LF, Caloto R, Gomis RR, Apaolaza I, Quesada V, Trka J, Gomez-Muñoz A, Vincent S, Bustelo XR, Planes FJ, Aransay AM, Carracedo A. (2018) CANCERTOOL: A Visualization and Representation Interface to Exploit Cancer Datasets. *Cancer Res*. 78(21):6320-6328
28. Kaminski L, Torrino S, Dufies M, Djabari Z, Haider R, Roustan FR, Jaune E, Laurent K, Nottet N, Michiels JF, Gesson M, Rocchi S, Mazure NM, Durand M, Tanti JF, Ambrosetti D, Clavel S, Ben-Sahra I, Bost F. (2019) PGC1 α Inhibits Polyamine Synthesis to Suppress Prostate Cancer Aggressiveness. *Cancer Res*. 79(13):3268-3280.
29. Holbert CE, Cullen MT, Casero RA Jr, Stewart TM. (2022) Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 22(8):467-480.
30. Zabala-Letona A, Arruabarrena-Aristorena A, Martín-Martín N, Fernandez-Ruiz S, Sutherland JD, Clasquin M, Tomas-Cortazar J, Jimenez J, Torres I, Quang P, Ximenez-Embun P, Bago R, Ugalde-Olano A, Loizaga-Iriarte A, Lacasa-Viscasillas I, Unda M, Torrano V, Cabrera D, van Liempd SM, Cendon Y, Castro E, Murray S, Revandkar A, Alimonti A, Zhang Y, Barnett A, Lein G, Pirman D, Cortazar AR, Arreal L, Prudkin L, Astobiza I, Valcarcel-Jimenez L, Zuñiga-García P, Fernandez-Dominguez I, Piva M, Caro-Maldonado A, Sánchez-Mosquera P, Castillo-Martín M, Serra V, Beraza N, Gentilella A, Thomas G, Azkargorta M, Elortza F, Farràs R, Olmos D, Efeyan A, Anguita J, Muñoz J, Falcón-Pérez JM, Barrio R, Macarulla T, Mato JM, Martinez-Chantar ML, Cordon-Cardo C, Aransay AM, Marks K, Baselga J, Tabernero J, Nuciforo P, Manning BD, Marjon K, Carracedo A. (2017) mTORC1-dependent AMD1 regulation sustains polyamine metabolism in prostate cancer. *Nature*. 547(7661):109-113
31. Arias-Mayenco I, González-Rodríguez P, Torres-Torrelo H, Gao L, Fernández-Agüera MC, Bonilla-Henao V, Ortega-Sáenz P, López-Barneo J. (2018) Acute O₂ Sensing: Role of Coenzyme QH₂/Q Ratio and Mitochondrial ROS Compartmentalization. *Cell Metab*. 28(1):145-158
32. Masson N, Keeley TP, Giuntoli B, White MD, Puerta ML, Perata P, Hopkinson RJ, Flashman E, Licausi F, Ratcliffe PJ. (2019) Conserved N-terminal cysteine dioxygenases transduce responses to hypoxia in animals and plants. *Science*. 365(6448):65-69
33. van Veen S, Martin S, Van den Haute C, Benoy V, Lyons J, Vanhoutte R, Kahler JP, Decuypere JP, Gelders G, Lambie E, Zielich J, Swinnen JV, Annaert W, Agostinis P, Ghesquière B, Verhelst S, Baekelandt V, Eggermont J, Vangheluwe P. (2020) ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export. *Nature*. 578(7795):419-424