

Papel de la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 como regulador de la expresión génica en la progresión del cáncer de próstata.

Iria Muiños Conde^a, Begoña Colás Escudero^b, Santiago Ropero Salinas^c

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. iria.muiños@edu.uah.es b. begona.colas@uah.es c. santiago.ropero@uah.es

Palabras clave: cáncer de próstata resistente a la castración; SHP-1; RNAseq; expresión génica diferencial; ontología genética; fosforilación oxidativa

Resumen

El cáncer de próstata (CP) es una de las neoplasias malignas con mayor incidencia a nivel mundial en la población masculina. El desarrollo normal y patológico de la próstata está controlado por los andrógenos y el receptor de andrógenos, motivo por el cual los tratamientos actuales están dirigidos a inhibir su vía de señalización. Aunque en un primer momento los pacientes responden favorablemente, con el tiempo desarrollan resistencia y alcanzan un estadio más agresivo conocido como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). Por lo tanto, es necesario conocer los mecanismos moleculares implicados en la adquisición de esta resistencia para poder mejorar las terapias ya existentes y desarrollar otras nuevas. Dado el interés que ha suscitado la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 en el desarrollo del CP, el objetivo de este trabajo consistió en estudiar el efecto que ejerce esta fosfatasa en la regulación génica en dos líneas celulares de CP que representan estadios distintos de la enfermedad. Para ello se analizaron los resultados obtenidos en un RNAseq en el que se compararon los perfiles de expresión de estas líneas en presencia y ausencia de SHP-1. Este análisis mostró que la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa aumenta en la línea celular que representa el estadio CRPC y que el silenciamiento de SHP-1 produce su disminución, lo que apuntaría al posible papel oncogénico de esta fosfatasa en el CP.

Cita: Muiños Conde, Iria; Colás Escudero, Begoña; Ropero Salinas, Santiago (2025) Papel de la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 como regulador de la expresión génica en la progresión del cáncer de próstata. *dianas* 14 (2): e202509fp04. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202509fp04](https://dianas.web.uah.es/journal/e202509fp04)
<https://dianas.web.uah.es/journal/e202509fp04>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>. DOI <https://doi.org/10.37536/DIANAS>

Copyright: © Muiños-Conde I, Colás-Escudero B, Ropero-Salinas S. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

El cáncer de próstata (CP) constituye un grave problema en la sociedad actual debido a que es la segunda neoplasia maligna más comúnmente diagnosticada y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres en todo el mundo [1]. Se han identificado varios factores de riesgo que predisponen a padecer esta patología, entre los que destacan la edad avanzada, la etnia y los factores genéticos. También se ha especulado que el tabaquismo, el exceso de peso corporal y algunos factores nutricionales constituyen factores de riesgo [2].

Los andrógenos, como la testosterona o la dihidrotestosterona (DHT), desempeñan un papel esencial en el desarrollo, el mantenimiento y la función normal de la próstata [3]. Sin embargo, también juegan un importante papel en el desarrollo y la progresión del CP [1]. Estas hormonas ejercen su función a través de su unión al receptor de andrógenos (AR) [4]. En ausencia de andrógenos, el AR se ubica en el citoplasma en una conformación inactiva asociado con proteínas de choque térmico. Cuando la testosterona o la DHT se unen a él, sufre un cambio conformacional, se disocia de las proteínas de choque térmico, homodimeriza y se transloca al núcleo, donde se une a secuencias de DNA específicas denominadas elementos de respuesta a andrógenos (ARE), los cuales se localizan en las regiones promotoras de genes asociados con la proliferación, la diferenciación, la apoptosis celular y el metabolismo, promoviendo su transcripción [5].

El abordaje terapéutico del CP es complicado y varía en función del estadio en el que se encuentre el paciente en el momento del diagnóstico. En estadios tempranos de la enfermedad, los tratamientos empleados suelen ser la vigilancia activa, la prostatectomía radical y la radioterapia. En cambio, en estadios más avanzados o metastásicos, el tratamiento por excelencia es la terapia de privación androgénica [6]. Ésta tiene como objetivo reducir los niveles de andrógenos circulantes mediante castración química con agonistas o antagonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), con el fin de disminuir la actividad del AR. Este tratamiento a menudo se combina con el empleo de antiandrógenos, los cuales bloquean competitivamente la unión de los andrógenos al AR, impidiendo que se transloque al

núcleo y ejerza su función [4]. A pesar de la respuesta inicial favorable a la terapia de privación androgénica, con el paso del tiempo una parte de los pacientes desarrolla resistencia. Como consecuencia, el cáncer de próstata progresa a una etapa más avanzada y agresiva denominada cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), la cual es incurable y letal [7].

Se han descrito distintos mecanismos moleculares por los que se desarrolla resistencia a la terapia de privación androgénica. Entre ellos, destaca la activación del AR por vías independientes de ligando reguladas por factores de crecimiento y citoquinas, las cuales conducen a la activación de proteínas tirosina quinasa que, entre otros sustratos, van a fosforilar al AR y/o sus corre reguladores [8]. Por lo tanto, es muy importante comprender la función y la regulación, no solo de las proteínas tirosina quinasa que catalizan la fosforilación, sino también de las proteínas tirosina fosfatasa responsables de la desfosforilación. Una de estas proteínas tirosina fosfatasa es SHP-1, la cual contiene dos dominios SH2 que le permiten interaccionar con proteínas que presentan residuos de tirosina fosforilados [9]. Estudios llevados a cabo en ratones *motheaten* (*me*), que no expresan SHP-1, y ratones *motheaten viable* (*me^v*), que expresan una forma deficiente de SHP-1 con tan solo un 20% de actividad, han puesto de manifiesto que en las células hematopoyéticas esta fosfatasa actúa como un regulador negativo de múltiples vías de señalización implicadas en la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis celular [10], entre las que destacan JAK-STAT, MAPK, PI3K-Akt y NF- κ B [11]. Asimismo, los bajos niveles de expresión de SHP-1 en distintos tipos de leucemias y linfomas sugieren que esta fosfatasa actúa como un importante supresor tumoral [12]. Sin embargo, el papel de SHP-1 en las células epiteliales y su implicación en la tumorigénesis epitelial aún no está claro, pudiendo actuar como un regulador positivo o un regulador negativo, probablemente en función de la molécula diana y el tipo celular [13]. La presencia de esta fosfatasa en el CP fue descrita inicialmente por el grupo de investigación en el que he realizado este trabajo [14]. Asimismo, se ha demostrado que esta fosfatasa es capaz de regular componentes del ciclo celular mediante la regulación de la vía de señalización PI3K-Akt, ya que, al desfosforilar la subunidad p110 de PI3K, aumenta la actividad de Akt, lo que conduce a la fosforilación y posterior degradación de la proteína inhibidora del ciclo celular p27. De esta manera, promueve la progresión del ciclo celular y, como consecuencia, actúa como un mediador positivo del desarrollo tumoral [15]. Además, se ha observado que los ratones *motheaten viable* no presentan una próstata completamente desarrollada, lo que indica que esta tirosina fosfatasa también desempeña un importante papel en el desarrollo normal de la próstata [10].

Teniendo en cuenta todos estos datos, el objetivo de este trabajo es llevar a cabo un análisis de los resultados obtenidos con un RNAseq realizado en células de cáncer de próstata sensibles y resistentes a la castración, a las cuales hemos anulado la expresión de SHP-1, con el fin de estudiar si esta fosfatasa regula la expresión génica de forma diferencial en células cancerígenas prostáticas sensibles y resistentes a la castración y, por lo tanto, contribuye a la progresión de esta patología.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Para la realización de este estudio se han empleado dos líneas celulares de cáncer de próstata. La primera, LNCaP, obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC), procede de un paciente de 50 años afectado por un cáncer de próstata metastásico en un ganglio linfático, expresa el receptor de andrógenos y representa los estadios tempranos de la enfermedad que todavía responden al tratamiento. La segunda, LNCaP-ABL (ABL), cedida por el Dr. Culig (Universidad de Innsbruck, Austria), procede del cultivo sucesivo de células LNCaP en un medio desprovisto de andrógenos y, aunque sigue expresando el receptor de andrógenos, ya no responde al tratamiento y representa el estadio CRPC de la enfermedad. Las células se cultivaron en un medio de cultivo RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) de Sigma-Aldrich, suplementado con 0,25 mg/ml de penicilina, 0,25 mg/ml de estreptomycin, 2,5 mg/ml de fungizona y 10% de suero fetal bovino (FBS). En el caso de las células ABL, el FBS fue previamente tratado con carbón activo para retirar los andrógenos endógenos y permitir así su crecimiento en un medio desprovisto de éstos. Las células se mantuvieron en condiciones de esterilidad a 37°C y atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Una vez alcanzada la confluencia, las células se levantaron con tripsina-EDTA y se sembraron en distintas placas y a distintas densidades dependiendo del experimento a realizar.

CRISPR/Cas9

La obtención de clones estables con el gen de SHP-1 (PTPN6) silenciado se llevó a cabo mediante la técnica CRISPR/Cas9. Para ello se empleó el vector *px300* (Addgene), el cual presentaba el gen para Cas9 y un RNA guía (gRNA) quimérico con un sitio de restricción para poder incorporar la secuencia complementaria a aquella que se quiere silenciar. En primer lugar, se llevó a cabo la digestión del vector y, posteriormente, su ligación con el inserto del gRNA, el cual fue previamente diseñado y adquirido en Sigma-Aldrich. A continuación, se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes de *E. coli* DH5 α con el plásmido. Dichas bacterias se sembraron en placas de agar con ampicilina para poder seleccionar aquellas que hubiesen incorporado el plásmido. Seguidamente se aisló el plásmido empleando el kit de miniprep de

NZYTech y se transfectaron las células LNCaP y ABL mediante el reactivo Lipofectamina (Invitrogen). Por último, se seleccionaron las células transfectadas adicionando puromicina (1 µg/ml) a su medio, ya que el plásmido contenía un gen de resistencia a dicho antibiótico.

Extracción y cuantificación proteica

Las células se sembraron en placas P100 a una densidad de 1.000.000 células/placa. Una vez alcanzada la confluencia requerida, se aspiró el medio y las células se lavaron con PBS. A continuación, se añadió tampón de lisis (50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; inhibidores de proteasas (COMPLETE) y Tritón X-100 al 10%) y las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C en rotación. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante con las proteínas. Finalmente, la concentración de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (*Protein Assay* de BioRad).

Inmunodetección de proteínas (Western-Blot)

Las alícuotas de 50 µg de proteína con tampón de Laemmli 5X (0,250 M Tris-HCl; 20% SDS; 40% glicerol; 20% β-mercaptoetanol; 0,008% azul de bromofenol) se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración del 6%, con un potencial eléctrico de 90-120 V en tampón de electroforesis (25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 192 mM Glicina y 0,1% SDS). Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF mediante la aplicación de un potencial eléctrico de 100 V durante 60 minutos en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 192 mM Glicina y 20% metanol) a 4°C. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó en tampón TTBS (0,1 mM Tris; 1,5 mM NaCl y 0,05% Tween-20) con leche desnatada al 5% durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en TTBS durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C y con el anticuerpo secundario diluido en TTBS con leche desnatada al 5% durante una hora a temperatura ambiente, realizando tres lavados de 10 minutos con TTBS después de cada incubación. Finalmente, la membrana se incubó durante 1 minuto en un reactivo de detección quimioluminiscente (Immobilon ECL Ultra Western HRP Substrate), revelando la membrana en un Bio-Rad Chemidoc Imager.

Gen	Oligo sentido (5' → 3')	Oligo antisentido (5' → 3')
PPIA	GACCCAACACAAATGGTTC	AGTCAGCAATGGTGATCTTC
NDUFAF4	AGCACTAGTGATTCGCGGTA	ACAGAGGGCTTCATCTTGCT
UQCRB	ACTGGGGTTAATGCGAGATGA	CAGGTCCAGTGCCCTCTTAA
COX6C	AGTTTCGTGTGGCTGATCAA	CCAGCCTTCCTCATCTCCTC

Tabla 1.- Genes analizados y la secuencia de sus oligos sentido y antisentido.

Cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR

La extracción de RNA se realizó empleando el kit comercial *NZY Total RNA Isolation* de NZYTech siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial, midiendo posteriormente su concentración en un Nanodrop (Thermo-Fisher Scientific). Finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C para su utilización a corto plazo, o bien a -80°C para su uso a largo plazo. La síntesis de cDNA, a partir de 4 µg de RNA total, se realizó empleando el kit comercial *NZY First-Strand cDNA Synthesis* de NZYTech siguiendo las recomendaciones del proveedor. El cDNA obtenido fue almacenado a -20°C. Finalmente, se llevó a cabo la cuantificación de la expresión génica mediante una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) utilizando el kit comercial *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x)* de NZYTech y los oligos correspondientes para cada gen a analizar, cuya secuencia se especifica en la Tabla 1. Para realizar esta técnica se empleó un termociclador QuantStudio QS5 y las condiciones de reacción fueron las siguientes: 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación, cada uno de ellos a 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos. Las reacciones se realizaron por triplicado en cada uno de los experimentos. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando el gen de expresión constitutiva PPIA. El análisis de datos se realizó con el programa QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.2.

Resultados y discusión

Como hemos indicado anteriormente, en este trabajo nos propusimos realizar un análisis de los resultados obtenidos en el RNAseq que se llevó a cabo previamente en el grupo de investigación al que me he

incorporado y en el que se comparó la expresión génica de células cancerígenas prostáticas en las que se había mantenido y en las que se había silenciado el gen de la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 (PTPN6).

Las líneas celulares utilizadas fueron LNCaP, que corresponde con la etapa sensible a la privación androgénica, y ABL, que constituye un modelo *in vitro* de CRPC. De esta manera sería posible analizar el efecto del silenciamiento de SHP-1 en la expresión génica en distintas etapas del cáncer de próstata. Las líneas celulares generadas mediante la anulación de SHP-1 son: LNCaP PX y ABL PX, que mantienen la expresión de SHP-1 y actúan como controles; y LNCaP IN y ABL IN, en las que la expresión de esta fosfatasa se ha anulado. La eficacia del silenciamiento de SHP-1 en dichas líneas se comprobó mediante western-blot con el objetivo de confirmar la idoneidad de los modelos para la realización de este estudio. Tanto en LNCaP como en ABL se observó un descenso en los niveles de SHP-1 (Figura 1).

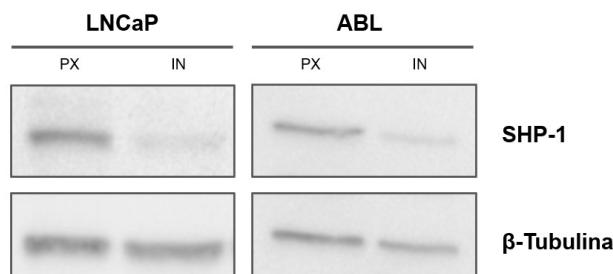


Figura 1.- Eficacia de la anulación de SHP-1. Los niveles de SHP-1 se analizaron mediante western-blot, utilizando β -tubulina como control de carga.

Para seleccionar los genes que presentaban una diferencia de expresión significativa, establecimos como criterio de selección un p-valor inferior a 0,05. Con el fin de determinar los cambios que se producen a nivel de la expresión génica durante la adquisición de resistencia a la terapia de privación androgénica, se compararon los datos de expresión entre la línea celular ABL y la línea celular LNCaP. Mediante este análisis se identificaron 10.084 genes, de los cuales 5.100 disminuyeron su expresión, y 4.984 la aumentaron. A continuación, con el objetivo de evaluar los cambios que se producen como consecuencia del silenciamiento de SHP-1 en las dos líneas celulares, se compararon los resultados obtenidos entre LNCaP IN y LNCaP PX, así como entre ABL IN y ABL PX. En las LNCaP, el silenciamiento de SHP-1 modificó la expresión de 2.696 genes, de los cuales 1.150 disminuyeron y 1.546 aumentaron. En el caso de las ABL, se modificaron 3.867 genes, disminuyendo 1.816 y aumentando 2.051 (Figura 2).

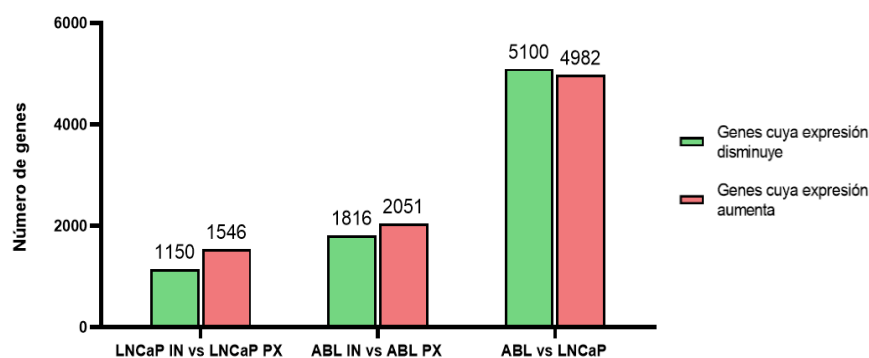


Figura 2.- Número de genes diferencialmente expresados ($|\log_2\text{FoldChange}| > 0$ y p-valor < 0,05) en las líneas celulares LNCaP y ABL tras el silenciamiento de SHP-1, así como en ABL en comparación con LNCaP.

La representación de los datos obtenidos mediante gráficos *volcano* permite representar la magnitud del cambio en la expresión génica frente a la significatividad estadística de este cambio. Como muestra la Figura 3A, los mayores cambios de expresión y los más estadísticamente significativos se observaron en las células ABL respecto a las LNCaP (los valores del $\log_2\text{FoldChange}$ oscilan entre -15 y +13 y los valores del $-\log_{10}(\text{p-valor})$ entre 0 y 275). Por otro lado, si bien el número de genes cuya expresión se ve modificada tras el silenciamiento de SHP-1 es mayor en ABL que en LNCaP, la magnitud de estos cambios fue menor en ABL, donde los valores del $\log_2\text{FoldChange}$ oscilan entre -7 y +7 (Figura 3C) frente a -9 y +8 en LNCaP (Figura 3B). En cambio, la significatividad estadística de estos cambios parece ser superior en ABL, donde los valores del $-\log_{10}(\text{p-valor})$ oscilan entre 0 y 215 (Figura 3C) frente a 0 y 59 en LNCaP (Figura 3B). Sin embargo, este análisis puede estar sesgado porque hay dos genes cuya expresión cambia de forma muy significativa en ABL tras la anulación de SHP-1. De esta manera, su presencia amplía el rango de valores del $-\log_{10}(\text{p-valor})$, dando la impresión de una mayor significatividad estadística general. Si se excluyen estos dos genes, los valores del $-\log_{10}(\text{p-valor})$ en ABL son comparables a los observados en LNCaP, lo que indica que, en conjunto, la significatividad estadística de los cambios de expresión es similar en ambas líneas celulares.

Estos resultados muestran que la progresión a un fenotipo resistente a la castración conlleva una amplia reprogramación transcripcional. Asimismo, indican que SHP-1 regula la expresión génica tanto en las células LNCaP como en las células ABL. Previamente se ha demostrado que SHP-1 presenta una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo carboxilo terminal [16]. Además, se ha observado que en las células epiteliales puede estar localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo [13]. Esta localización nuclear es compatible con el papel regulador de la expresión génica de SHP-1.

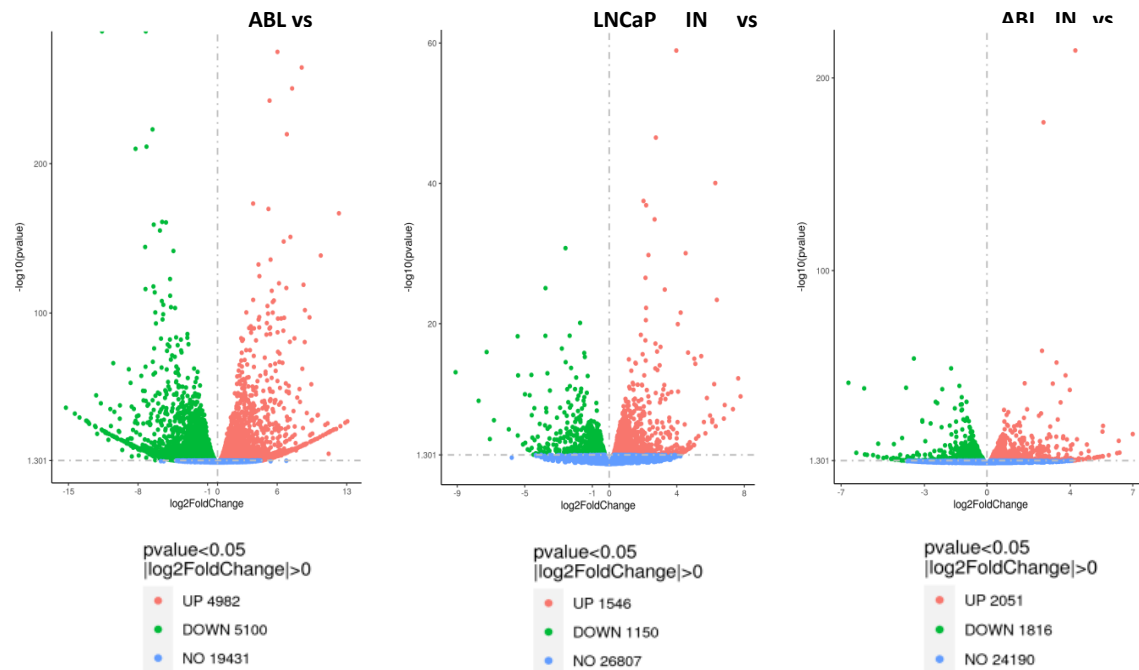


Figura 3.- Gráficos *volcano* que ilustran los cambios en la expresión génica. El eje X representa el cambio en los niveles de expresión ($\log_2\text{FoldChange}$), mientras que el eje Y representa la significatividad estadística de dicho cambio ($-\log_{10}(\text{p-value})$). Los genes cuya expresión disminuye de manera significativa se muestran en verde, los genes cuya expresión incrementa de manera significativa en rojo y los genes cuya expresión no cambia de manera significativa en azul. (A) ABL vs LNCaP, (B) LNCaP IN vs LNCaP PX y (C) ABL IN vs ABL PX.

Posteriormente, con el objetivo de obtener una mejor comprensión de las funciones biológicas en las que participan los genes diferencialmente expresados, se realizó un análisis de Ontología Genética (GO). Para ello, se estableció como criterio de selección un p-valor ajustado inferior a 0,05. Al comparar las ABL con las LNCaP, se observó que los genes cuya expresión disminuye están fundamentalmente relacionados con la traducción de proteínas. En particular, están asociados a procesos como la iniciación de la traducción, la degradación del mRNA y la localización y la translocación de proteínas al retículo endoplasmático durante la traducción. Asimismo, se encuentran asociados a los componentes estructurales de los ribosomas citosólicos, incluyendo la subunidad mayor y la subunidad menor, así como a los polirribosomas (Figura 4A). Por el contrario, los genes cuya expresión aumenta están relacionados con el metabolismo energético mitocondrial, especialmente con la respiración celular, la fosforilación oxidativa, la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP. Asimismo, están asociados a complejos proteicos localizados en la membrana mitocondrial interna, funciones como la transferencia de electrones y el transporte de protones, y actividades enzimáticas de tipo oxidoreductasa y NADH deshidrogenasa (Figura 4D).

Asimismo, se determinó el efecto del silenciamiento de SHP-1 sobre las funciones biológicas en LNCaP y ABL. En cuanto a la línea celular LNCaP, se apreció una disminución de genes principalmente asociados a procesos relacionados con la traducción de proteínas, como la iniciación de la traducción, la degradación del mRNA y la localización y la translocación de proteínas al retículo endoplasmático durante la traducción, así como los ribosomas, los polirribosomas y los gránulos ribonucleoproteicos citoplasmáticos (Figura 4B). En contraste, aumentó la expresión de genes fundamentalmente involucrados en la organización y el ensamblaje de la cromatina y los nucleosomas, el ensamblaje de complejos proteína-DNA y el empaquetamiento del DNA (Figura 4E). En cuanto a la línea celular ABL, se observó un descenso de los genes relacionados con el metabolismo energético mitocondrial, fundamentalmente la respiración celular, la fosforilación oxidativa, la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP, complejos enzimáticos localizados en la membrana mitocondrial interna, funciones de transferencia de electrones y transporte de protones, y actividades enzimáticas de tipo oxidoreductasa, NADH deshidrogenasa y citocromo c oxidasa (Figura 4C). Sin embargo, aumentó la expresión de genes implicados en la replicación del DNA y la

progresión del ciclo celular, especialmente en la transición G1/S y la segregación cromosómica, así como la de los genes asociados a los cromosomas condensados, el huso mitótico y las horquillas de replicación, a la actividad helicasa, a la unión a la cromatina o al reconocimiento del DNA dañado (Figura 4F).

De todos los cambios observados, llama la atención que en las células ABL se observa un aumento de la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético mitocondrial y que al silenciar SHP-1 se produce una disminución. De hecho, el incremento de la fosforilación oxidativa en la línea celular ABL con respecto a la línea celular LNCaP es consistente con estudios previos en los que se ha observado un aumento de la fosforilación oxidativa durante la progresión del cáncer de próstata [17]. Las células epiteliales prostáticas normales presentan un perfil metabólico único, altamente especializado en la producción y secreción de citrato al líquido prostático. En la mayoría de las células, el piruvato generado en la glucólisis es transportado a la mitocondria, donde se descarboxila a acetil-CoA. Posteriormente, el acetil-CoA se condensa con oxalacetato para formar citrato, el cual ingresa en el ciclo de Krebs y se convierte en isocitrato en una reacción catalizada por la aconitasa mitocondrial (m-aconitasa). Sin embargo, las células epiteliales prostáticas normales acumulan altos niveles de zinc (debido a una elevada expresión de los transportadores ZIP1 y ZIP3), lo que lleva a la inhibición de la m-aconitasa y, por lo tanto, la acumulación y la secreción de citrato al líquido prostático. Como resultado, estas células presentan un ciclo de Krebs truncado y una fosforilación oxidativa ineficiente. No obstante, durante la progresión del cáncer de próstata, las células epiteliales prostáticas sufren una reprogramación metabólica peculiar. Concretamente, los niveles de zinc se reducen significativamente (debido a una expresión disminuida de los transportadores ZIP1 y ZIP3), lo que conduce a la reactivación de la m-aconitasa, la oxidación del citrato a isocitrato, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Así, la reprogramación metabólica que ocurre en el cáncer de próstata da como resultado una fosforilación oxidativa mejorada en comparación con el tejido prostático normal [17].

Asimismo, se ha observado que en aquellas células que han desarrollado resistencia a las terapias estándar (antiandrogénicas, como la enzalutamida, o quimioterapéuticas, como el docetaxel) se produce un incremento en la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa. Esto sugiere que la fosforilación oxidativa no solo es importante para el desarrollo del cáncer de próstata, sino también para la adquisición de resistencia a fármacos [18].

Por lo tanto, el hecho de que el silenciamiento de SHP-1 en la línea celular ABL conduzca a una disminución de la fosforilación oxidativa sugiere que esta proteína tirosina fosfatasa podría desempeñar un papel clave en la reprogramación metabólica que tiene lugar durante la progresión del cáncer de próstata, así como en el desarrollo de resistencia a las terapias estándar. Por este motivo, en este estudio nos centraremos en la fosforilación oxidativa y en el papel que SHP-1 podría desempeñar en la regulación de esta vía metabólica.

En primer lugar, se determinó el número de genes que codifican para las subunidades estructurales y los factores de ensamblaje de los cinco complejos multiproteicos de la fosforilación oxidativa que veían incrementada su expresión en la línea celular ABL con respecto a la línea celular LNCaP y, al mismo tiempo, veían reducida su expresión en ABL al silenciar la expresión de SHP-1. Para ello, se estableció como criterio de selección un p-valor inferior a 0,05, con el fin de seleccionar únicamente aquellos genes cuya expresión se viera modificada de manera estadísticamente significativa. Se encontraron 50 genes cuya expresión aumentaba en las células ABL con respecto a las LNCaP, pero disminuía al anular SHP-1 (Figura 5A).

Posteriormente, con el objetivo de identificar aquellos genes que presentan los cambios de expresión más relevantes, se aplicaron parámetros de cribado más estrictos. En este caso, el p-valor ajustado debía ser inferior a 0,05, mientras que el $\log_2$ FoldChange debía ser inferior a -0,4 o superior a 0,4, lo que corresponde con una disminución del 25% y un incremento del 32% en la expresión génica, respectivamente. Una vez establecidos estos parámetros, se identificaron once genes: NDUFAF4, que codifica para un factor de ensamblaje del complejo I; NDUFA4 y NDUF5, que codifican para dos subunidades estructurales del complejo I; SDHD, que codifica para una subunidad estructural del complejo II; UQCRB, que codifica para una subunidad estructural del complejo III; COX6C, COX5B, COX7B y COX6A1, que codifican para cuatro subunidades estructurales del complejo IV; ATP5PB y ATP5PO, que codifican para dos subunidades estructurales del complejo V (Figura 5B-D). Estos resultados apoyan que SHP-1 desempeña un papel esencial en la regulación de la expresión de un gran número de genes asociados a la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, desempeña un importante papel en la progresión del cáncer de próstata.

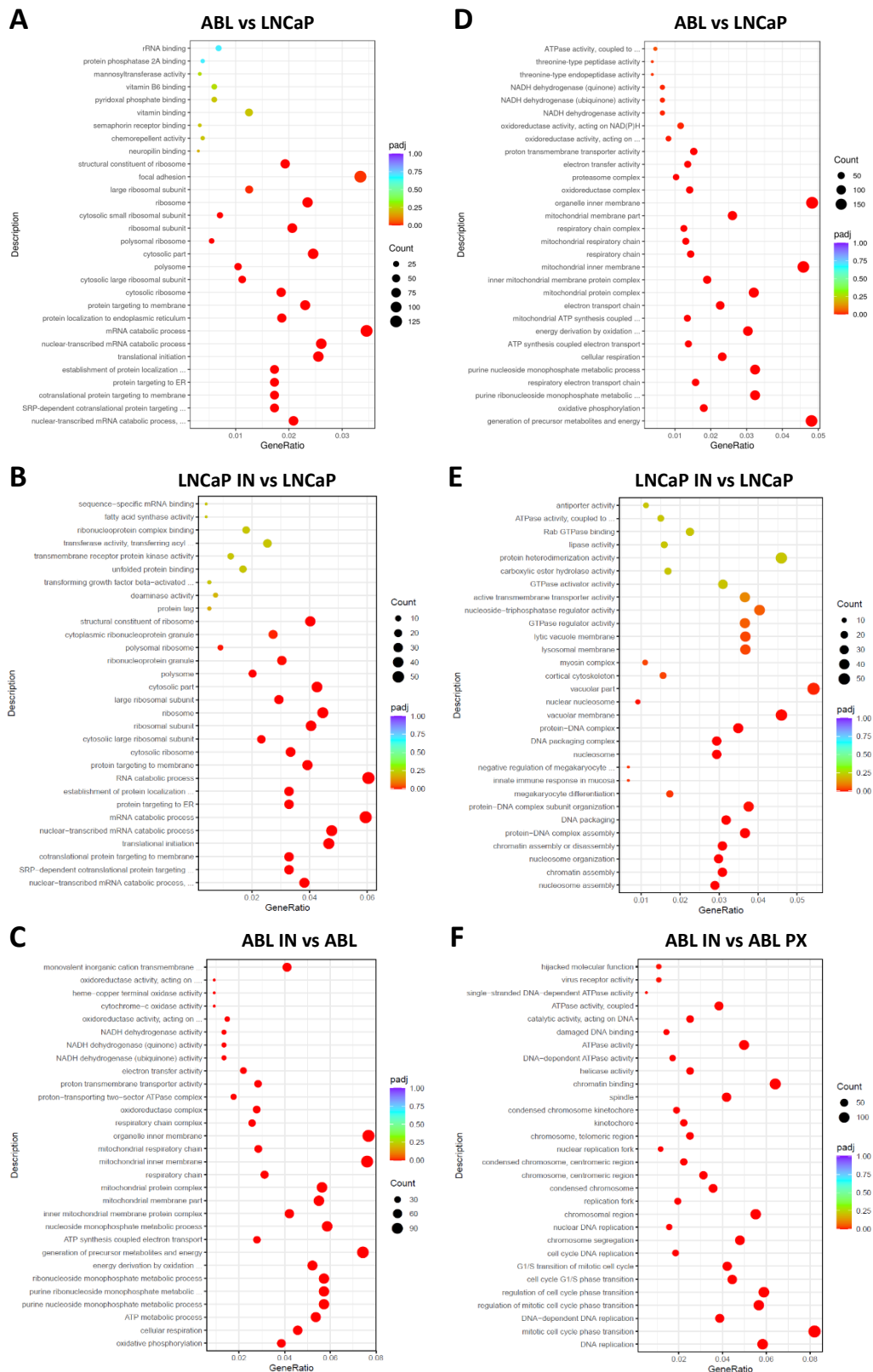


Figura 4.- Análisis de Ontología Genética (GO). El eje Y representa los términos GO enriquecidos, mientras que el eje X representa el *GeneRatio* (proporción de genes asociados al término GO cuya expresión cambia con respecto a la cantidad total de genes asociados al mismo). El tamaño de los puntos indica la cantidad de genes asociados al término GO que presentan cambios en su expresión, mientras que el color refleja la significatividad estadística (p-valor ajustado). Los términos GO asociadas a genes cuya expresión disminuye se muestran a la izquierda: (A) ABL vs LNCaP, (B) LNCaP IN vs LNCaP PX, (C) ABL IN vs ABL PX. Los términos GO asociados a genes cuya expresión aumenta se muestran a la derecha: (D) ABL vs LNCaP, (E) LNCaP IN vs LNCaP PX, (F) ABL IN vs ABL PX.

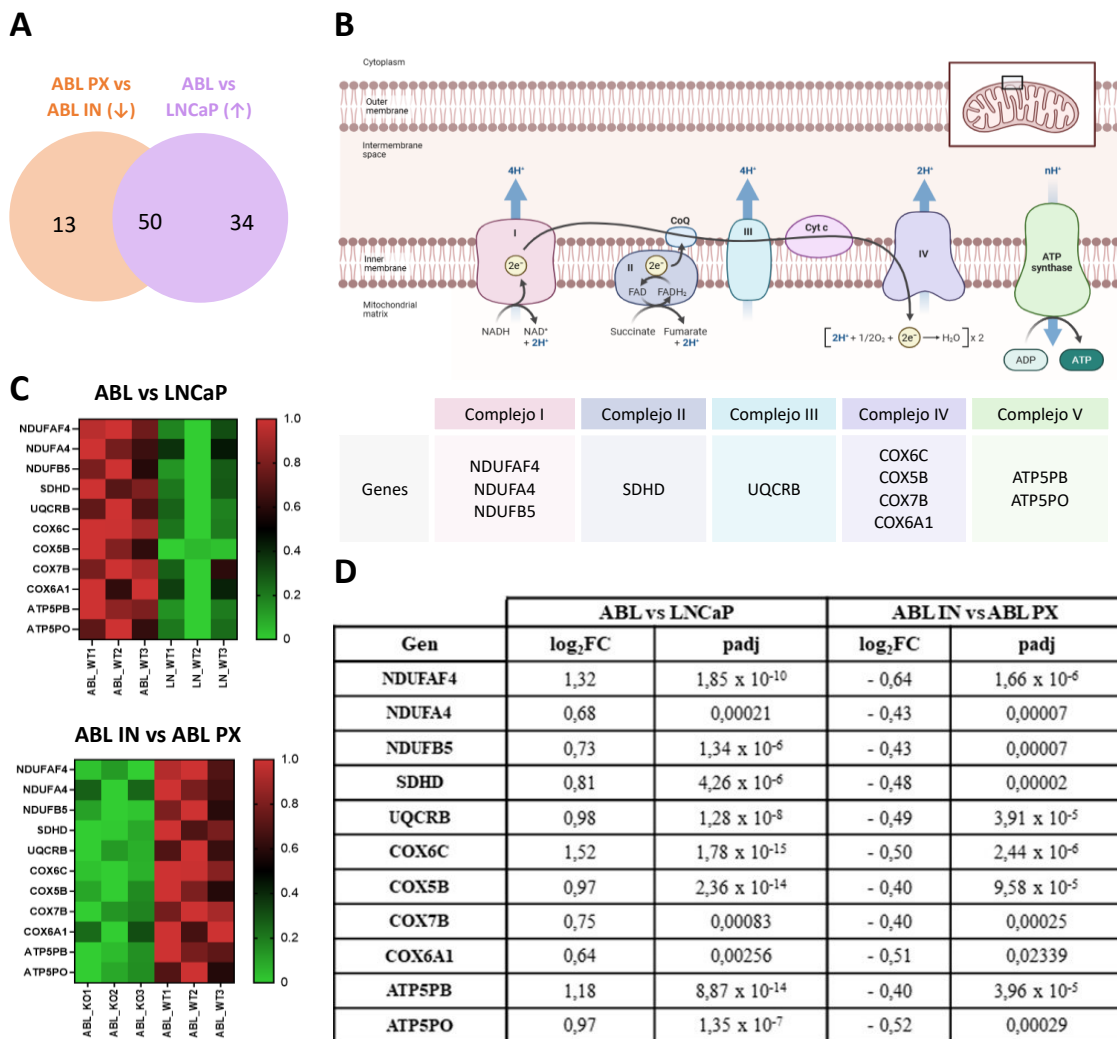


Figura 5.- (A) Diagrama de Venn que muestra el número de genes que codifican las subunidades estructurales y los factores de ensamblaje de los complejos multiproteicos de la fosforilación oxidativa, cuya expresión aumenta en la línea celular ABL con respecto a la línea celular LNCaP y disminuye en ABL tras el silenciamiento de SHP-1. (B) Tabla que muestra los genes que presentan un $|\log_2\text{FoldChange}| > 0,4$ y un p-valor ajustado $< 0,05$. (C) Mapas de calor que muestran los niveles relativos de expresión de estos genes. (D) Tabla que muestra el $\log_2\text{FoldChange}$ ($\log_2\text{FC}$) y el p-valor ajustado (padj) de estos genes.

Finalmente, para llevar a cabo la validación de los resultados obtenidos en el RNAseq, se seleccionaron tres de estos genes (NDUFA4, UQCRB y COX6C) para determinar su expresión mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Los niveles de mRNA de estos genes aumentaron en la línea celular ABL con respecto a la línea celular LNCaP y, al mismo tiempo, disminuyeron en ABL IN con respecto a ABL PX (Figura 6). Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante RT-qPCR son consistentes con los resultados obtenidos mediante RNAseq.

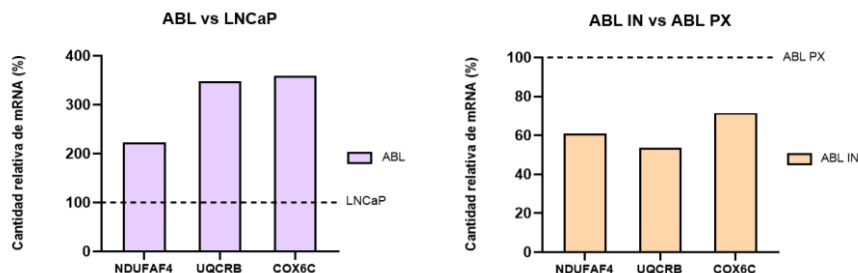


Figura 6.- Validación de los resultados obtenidos en el RNAseq mediante RT-qPCR. Los datos representan el porcentaje de cantidad relativa de mRNA de los genes seleccionados en (A) ABL con respecto a LNCaP y (B) ABL IN con respecto a ABL PX.

Los cambios en la expresión de los genes relacionados con la fosforilación oxidativa que hemos observado en este trabajo se correlacionan, además, con los cambios de expresión observados en el RNAseq de dos reguladores clave de la fosforilación oxidativa mitocondrial: PGC-1 α (coactivador del receptor gamma 1-

alfa activado por el proliferador de peroxisomas) y $ERR\alpha$ (receptor relacionado con los estrógenos alfa). De acuerdo con los resultados obtenidos en el RNAseq, la expresión de PGC-1 α y $ERR\alpha$ incrementa aproximadamente un 5000% y un 65%, respectivamente, en la línea celular ABL con respecto a la línea celular LNCaP. Estos resultados son consistentes con estudios previos en los que se ha observado que PGC-1 α y $ERR\alpha$ se sobreexpresan en el cáncer de próstata [19, 20]. En cambio, al silenciar SHP-1 se observa una disminución de aproximadamente un 55% en la expresión de PGC-1 α y de un 20% en la expresión de $ERR\alpha$ en ABL. Diversos estudios han demostrado que PGC-1 α forma un complejo transcripcional con $ERR\alpha$, el cual regula la transcripción de genes mitocondriales codificados a nivel nuclear [21]. Por lo tanto, la mayor expresión de los genes relacionados con la fosforilación oxidativa observada en ABL en comparación con LNCaP, así como su disminución en ABL tras el silenciamiento de SHP-1, podría deberse al incremento y a la disminución en la expresión del complejo PGC-1 α – $ERR\alpha$, respectivamente. Además, se ha observado que el silenciamiento de SHP-1 en células del epitelio pigmentario de la retina inhibe de manera significativa la expresión de PGC-1 α [22]. Asimismo, se ha observado que PGC-1 α induce la expresión de $ERR\alpha$ [23]. Estos resultados apoyan el posible papel de SHP-1 como regulador de la expresión de PGC-1 α y $ERR\alpha$ y, como consecuencia, de los genes asociados a la fosforilación oxidativa.

Asimismo, se ha observado que la expresión de PDHA1 (subunidad alfa de la piruvato deshidrogenasa E1), IDH3A (subunidad alfa de la isocitrato deshidrogenasa 3) y MDH2 (malato deshidrogenasa mitocondrial) incrementa en ABL con respecto a LNCaP. Estas enzimas desempeñan importantes funciones en el metabolismo mitocondrial. La piruvato deshidrogenasa cataliza la conversión del piruvato en acetil-CoA, el cual ingresa en el ciclo de Krebs. La isocitrato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa participan en dos etapas clave del ciclo de Krebs: la descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -cetoglutarato, produciendo CO_2 y NADH, y la conversión de malato en oxalacetato, generando NADH. El aumento en la expresión de estos genes sugiere una mayor actividad del ciclo de Krebs, lo que potencialmente se traduce en una mayor generación NADH y $FADH_2$, que impulsa la cadena de transporte electrónico y, por lo tanto, favorece la fosforilación oxidativa. Por el contrario, en ABL IN se produce una disminución en la expresión de estos genes, lo que sugiere que el silenciamiento de SHP-1 no solo conduce a una menor expresión de los complejos de la fosforilación oxidativa, sino también a una menor actividad del ciclo de Krebs, limitando la producción de NADH y $FADH_2$ necesarios para sostener la fosforilación oxidativa. De hecho, se ha observado que el silenciamiento de PDHA1 suprime la fosforilación oxidativa y el crecimiento tumoral en el cáncer de próstata [18]. Además, se ha observado que los niveles de IDH3A son elevados en otros tipos de cáncer, como el glioblastoma, donde su silenciamiento reduce la actividad del ciclo de Krebs e inhibe la fosforilación oxidativa, lo que da lugar a una disminución de la progresión del tumor [24]. Asimismo, se ha demostrado que el silenciamiento de MDH2 inhibe la respiración mitocondrial en células de cáncer de ovario, las cuales presentan una fuerte dependencia de la fosforilación oxidativa [25].

Por lo tanto, el descenso en la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa como consecuencia del silenciamiento de SHP-1 parece indicar que esta fosfatasa desempeña un papel clave en la reprogramación metabólica que tiene lugar durante la progresión del cáncer de próstata, mediante la cual las células cancerígenas prostáticas adquieren una fosforilación oxidativa mejorada. Esto apunta a un posible papel oncogénico de SHP-1 en el cáncer de próstata, el cual se ve apoyado por estudios previos en los que se observó que el silenciamiento de SHP-1 en las células de cáncer de próstata PC-3 conducía a la parada del ciclo celular y, en consecuencia, a la inhibición de la proliferación celular, indicando que SHP-1 actúa como un mediador positivo del desarrollo tumoral al promover la progresión del ciclo celular [15].

Conclusiones

En el presente estudio hemos determinado que el silenciamiento de la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 regula la expresión de un gran número de genes tanto en la línea celular LNCaP como en la línea celular ABL. Además, se ha observado que la expresión de genes asociados a la fosforilación oxidativa incrementa en ABL, pero se reduce significativamente al anular la expresión de SHP-1. Estos hallazgos sugieren que esta fosfatasa podría desempeñar un papel clave en la reprogramación metabólica que ocurre durante la progresión del cáncer de próstata y, en consecuencia, actuar como un potencial oncogén.

Referencias

1. Li, C., Cheng, D. and Li, P. 2025. Androgen receptor dynamics in prostate cancer: from disease progression to treatment resistance. *Frontiers in Oncology*, 15:1542811.
2. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I. and Jemal, A. 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3):229–263.
3. Pujana-Vaquerizo, M., Bozal-Basterra, L. and Carracedo, A. 2024. Metabolic adaptations in prostate cancer. *British journal of cancer*, 131(8):1250–1262.
4. Feng, Q. and He, B. 2019. Androgen Receptor Signaling in the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9:858.

5. Aurilio, G., Cimadamore, A., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Verri, E., Scarpelli, M., Massari, F., Cheng, L., Santoni, M. and Montironi, R. 2020. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells*, 9:2653.
6. Desai, K., McManus, J. M. and Sharifi, N. 2021. Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *Endocrine reviews*, 42(3):354–373.
7. Coutinho, I., Day, T. K., Tilley, W. D. and Selth, L. A. 2016. Androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer: a lesson in persistence. *Endocrine-related cancer*, 23(12):T179–T197.
8. Lamont, K. R. and Tindall, D. J. 2011. Minireview: Alternative activation pathways for the androgen receptor in prostate cancer. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 25(6):897–907.
9. Lim, S., Lee, K. W., Kim, J. Y. and Kim, K. D. 2023. Consideration of SHP-1 as a Molecular Target for Tumor Therapy. *International journal of molecular sciences*, 25(1):331.
10. García-Tello, A., Angulo, J. C., Rodríguez-Ubrea, J., Andrés, G., López, J. I., Sánchez-Chapado, M., López-Ruiz, P. and Colás, B. 2014. Prostate anatomy in motheaten viable (me(v)) mice with mutations in the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Actas urológicas españolas*, 38(7):438–444.
11. Chong, Z. Z. and Maiese, K. 2007. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histology and histopathology*, 22(11):1251–1267.
12. Oka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N., Nakanishi, T., Yamaai, Y., Hiraki, A., Sogawa, C. A., Kondo, E., Teramoto, N., Takahashi, K., Tsuchiyama, J. and Akagi, T. 2001. Reduction of hematopoietic cell-specific tyrosine phosphatase SHP-1 gene expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas/leukemias: combination analysis with cDNA expression array and tissue microarray. *The American journal of pathology*, 159(4):1495–1505.
13. Varone, A., Spano, D. and Corda, D. 2020. Shp1 in Solid Cancers and Their Therapy. *Frontiers in oncology*, 10:935.
14. Zapata, P. D., Roper, R. M., Valencia, A. M., Buscail, L., López, J. I., Martín-Orozco, R. M., Prieto, J. C., Angulo, J., Susini, C., López-Ruiz, P. and Colás, B. 2002. Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(2):915–926.
15. Rodríguez-Ubrea, F. J., Cariaga-Martinez, A. E., Cortés, M. A., Romero-De Pablos, M., Roper, S., López-Ruiz, P. and Colás, B. 2010. Knockdown of protein tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits G1/S progression in prostate cancer cells through the regulation of components of the cell-cycle machinery. *Oncogene*, 29(3):345–355.
16. Craggs, G. and Kellie, S. 2001. A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(26):23719–23725.
17. Fontana, F., Anselmi, M. and Limonta, P. 2023. Unraveling the Peculiar Features of Mitochondrial Metabolism and Dynamics in Prostate Cancer. *Cancers*, 15(4):1192.
18. Chen, C. L., Lin, C. Y. and Kung, H. J. 2021. Targeting Mitochondrial OXPHOS and Their Regulatory Signals in Prostate Cancers. *International journal of molecular sciences*, 22(24):13435.
19. Shiota, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Uchiumi, T., Fujimoto, N., Seki, N. and Naito, S. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 24(1):114–127.
20. Misawa, A. and Inoue, S. 2015. Estrogen-Related Receptors in Breast Cancer and Prostate Cancer. *Frontiers in endocrinology*, 6:83.
21. Schreiber, S. N., Emter, R., Hock, M. B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E. J. and Kralli, A. 2004. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17):6472–6477.
22. Zhuang, X., Ma, J., Xu, G. and Sun, Z. 2022. SHP-1 knockdown suppresses mitochondrial biogenesis and aggravates mitochondria-dependent apoptosis induced by all trans retinal through the STING/AMPK pathways. *Molecular medicine* (Cambridge, Mass.), 28(1):125.
23. Schreiber, S. N., Knutti, D., Brogli, K., Uhlmann, T. and Kralli, A. 2003. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *The Journal of biological chemistry*, 278(11):9013–9018.
24. May, J. L., Kouri, F. M., Hurley, L. A., Liu, J., Tommasini-Ghelfi, S., Ji, Y., Gao, P., Calvert, A. E., Lee, A., Chandel, N. S., Davuluri, R. V., Horbinski, C. M., Locasale, J. W. and Stegh, A. H. 2019. IDH3 α regulates one-carbon metabolism in glioblastoma. *Science advances*, 5(1):eaat0456.
25. Pei, X., Li, K. Y., Shen, Y., Li, J. T., Lei, M. Z., Fang, C. Y., Lu, H. J., Yang, H. J., Wen, W., Yin, M., Qu, J. and Lei, Q. Y. 2022. Palmitoylation of MDH2 by ZDHHC18 activates mitochondrial respiration and accelerates ovarian cancer growth. *Science China. Life sciences*, 65(10):2017–2030.