



**Fundación
Domingo
Martínez**

MEMORIA FINAL

TÍTULO DEL PROYECTO

Nuevas estrategias terapéuticas basadas en la transición hipoxia-hiperoxia para el cáncer de pulmón.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Julián Carretero Asunción

CENTRO: Universidad de Valencia

INTRODUCCIÓN

El **cáncer de pulmón** es la neoplasia más importante en cuanto a **mortalidad** en el mundo occidental. Actualmente se diagnostican cada año unos 20.000 nuevos casos en España. Es altamente resistente a la terapia convencional, con una supervivencia a los 5 años del 15% para el carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM) metastásico, el subtipo histológico más prevalente. En los últimos años este desolador escenario ha empezado a cambiar: la estratificación de los pacientes basada en marcadores moleculares (sobre todo genéticos) y el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra dianas específicas, como los inhibidores de EGFR y ALK, o los anticuerpos que reactivan la respuesta inmunitaria antitumoral, ha supuesto una mejora muy significativa del pronóstico de la enfermedad en grupos concretos de pacientes de CPNM. Así pues, la **medicina personalizada aplicada al CPNM**, entendida como administrar el fármaco (o una combinación de ellos) específico al paciente con unas determinadas características moleculares, empieza a ser una realidad.

Numerosos estudios han demostrado que la **hipoxia** es una característica habitual en los tumores sólidos, incluyendo al CPNM, que contribuye a la progresión tumoral y que se asocia a un comportamiento más agresivo y a un peor pronóstico. La hipoxia se relaciona con el **fallo de la radioterapia y la resistencia a la terapia farmacológica**, ya sea con quimioterápicos convencionales (cisplatino/taxol), o con los nuevos fármacos dirigidos contra dianas moleculares. Este proyecto propone una **nueva prueba de concepto** en el campo de la oxigenoterapia basada en:

1) el CPNM es uno de los cánceres que presentan mayor heterogeneidad **interindividual e intratumoral** tanto en el nivel genético como el fenotípico, lo que nos obliga a diseñar un abordaje individualizado, siguiendo el paradigma actual de la medicina personalizada, y que tal y como hemos introducido anteriormente, asume que no existen (o existirán en el futuro) tratamientos “panacea” eficaces para todos y cada uno de los pacientes. Ni siquiera la inmunoterapia moderna, que ha tenido un gran desarrollo en los últimos años gracias a los anticuerpos dirigidos contra la interacción PD1/PDL1 (nivolumab, pembrolizumab) funciona en todos los pacientes de CPNM. De hecho, se estima que solo un 20-30% de los pacientes responden a estos nuevos tratamientos.

2) estudios recientes demuestran que la **hiperoxia** tiene un efecto antitumoral en algunos cánceres experimentales (que no son CPNM ni humanos, sino tumores de otros tipos como el melanoma de ratón) al potenciar la actividad del sistema inmunitario y evitar el escape inmunitario tumoral. Estas evidencias abren la posibilidad de que determinados pacientes de CPNM pudieran beneficiarse del efecto antitumoral de la oxigenoterapia, que en algunos de ellos se podría combinar con la inmunoterapia, y que por tanto es esencial identificar los marcadores moleculares capaces de predecir estas posibilidades.

En base a estos antecedentes y premisas, nuestro proyecto planteó que la **oxigenoterapia** podría, por un lado, disminuir la capacidad proliferativa de los tumores y por tanto su agresividad, y por otro, **augmentar la eficacia de los quimioterápicos antitumorales**, todo ello en función de las **características moleculares** individuales de cada CPNM. Esta prueba de concepto se ha llevado a cabo en cultivos primarios *in vitro* aislados de pacientes de CPNM sometidos a la **hiperoxia**. Además, mediante un abordaje multi-ómico hemos identificado potenciales **marcadores moleculares** característicos de los tumores que se podrían beneficiar de la oxigenoterapia. Por último, hemos comenzado el desarrollo de modelos de CPNM ratones para llevar a cabo la prueba de concepto *in vivo*. A continuación resumiremos los avances más relevantes del proyecto.

Objetivos propuestos

1. Establecer cultivos primarios de **tumoresferas** a partir de muestras de tejido fresco de pacientes de **CPNM en estadio I** y someterlas a condiciones de hipoxia y normoxia.
2. Caracterizar el **estatus mutacional** de un panel de genes frecuentemente alterados en cáncer (*KRAS*, *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, entre otros) y los perfiles transcriptómicos en los cultivos de tumoresferas mediante secuenciación masiva del ADN y RNA-Seq.
3. Estudiar el **efecto citotóxico *in vitro*** de concentraciones crecientes de **O₂ (hiperoxia)** y su posible combinación con agentes quimioterápicos, como los inhibidores de EGFR.
4. Correlacionar los **patrones moleculares** obtenidos en los objetivos 1 y 2 (firmas transcripcionales y mutacionales) con la capacidad formadora de tumoresferas en hipoxia o normoxia, y la **sensibilidad o resistencia a la hiperoxia** del objetivo 3.
5. Identificación de los **mecanismos moleculares** relacionados con la sensibilidad de los CPNM a la **oxigenoterapia**.
6. Identificar los **biomarcadores moleculares** capaces de **predecir la respuesta a la oxigenoterapia** (o la respuesta a una combinación con inhibidores de EGFR) en el CPNM.
7. Diseñar y optimizar un protocolo de **oxigenoterapia en modelos animales de CPNM para realizar la prueba de concepto *in vivo***.

Metodología

Pacientes y líneas celulares incluidas en el estudio.

En este proyecto se han establecido y analizado cultivos tridimensionales (3D) de tumoresferas a partir de las muestras de tejido fresco procedentes de pacientes de CPNM estadio I obtenidas en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario de la Ribera por el Dr. J.M. Galbis (Alzira, Valencia). Las muestras de tejido fueron sometidas a disgregación mediante digestión enzimática a 37°C (*Liberase*, Roche) con agitación durante 2 horas. Tras los lavados y la lisis de los eritrocitos, las células fueron incubadas en medio sintético DMEM/F12 (invitrogen) en placas *low attachment plates*, (Costar).

Por otro lado, utilizamos líneas celulares de CPNM EGFR mutantes procedentes de la ATCC (HCC827, HCC4006, H1975, PC9, PC14, H3255, H1650) y que son un modelo habitual para el estudio de las terapias dirigidas contra EGFR (el paradigma de medicina personalizada para el CPNM), como el erlotinib, el gefitinib o el osimertinib, que son actualmente la primera línea de tratamiento para los pacientes de CPNM con mutaciones en EGFR (un 10-15% de los casos diagnosticados).

Screening mutacional mediante secuenciación masiva.

Para caracterizar el genotipo de las líneas derivadas de paciente, utilizamos la secuenciación masiva de un panel de oncogenes y genes supresores tumorales frecuentemente alterados en cáncer humano (*ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, y VHL*) (Oncomine Focus Assay, ThermoFisher Scientific). La preparación de las librerías y la secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Genómica del CNIO (Madrid), bajo la supervisión de la Dra. F. Al-Shahrour (Unidad de Bioinformática, CNIO).

Aislamiento y cultivo de tumoresferas en hipoxia, normoxia e hiperoxia.

Los cultivos de tumoresferas derivadas de pacientes y las líneas celulares EGFR mutantes se cultivaron en **normoxia** (21% de O₂) o **hipoxia** (1% de O₂) durante 3 meses, momento en el que se consideraron estabilizados. Después, estos cultivos se sometieron a hiperoxia. Todos estos procedimientos se llevaron a cabo en un **sistema de hipoxia xVivo** (Biospherix) a concentraciones de O₂ del **1% (hipoxia severa)**, **21% (normoxia)**, 50% y 70% (**hiperoxia**). Tal y como muestra la figura 1, la estación xVivo dispone de 4 cámaras de incubación integradas e independientes que permiten el estudio de estas condiciones de manera simultánea, eliminando así posibles sesgos experimentales.



Figura 1. Estación de hipoxia xVivo instalada en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia (SCSIE-UV).

Estudios de proliferación y muerte celular.

Los experimentos *in vitro* para determinar el efecto sobre la proliferación tumoral de las transiciones **normoxia-hipoxia** (21%-1% O₂), **normoxia-hiperoxia** (21%-50% o 70% O₂) e **hipoxia-hiperoxia** (1%-50% o 70% O₂), así como el posible efecto potenciador de la hiperoxia en combinación con los inhibidores de EGFR (osimertinib) en líneas celulares EGFR mutantes, se llevaron a cabo mediante el ensayo *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) en placas de 96 pocillos y lectura en un luminómetro de placas.

Los estudios de muerte celular por necrosis o apoptosis mediante citometría de flujo se han realizado con el marcaje Anexina V/yoduro de propidio (BD Biosciences) en un analizador celular Fortessa (Biosciences), al igual que los ensayos de ciclo celular mediante marcaje del ADN con yoduro de propidio. Los ensayos de formación de colonias en 2D se realizaron mediante la siembra a baja densidad en placas de 6 pocillos (BD Biosciences) de las líneas celulares indicadas, cultivo durante 10-15 días y posterior fijación con PFA al 4% y tinción con una solución de cristal violeta.

Los datos fueron analizados y representados con el software *GraphPad Prism 7.0*. Cada experimento se realizó tres veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Análisis transcriptómicos.

Los perfiles globales de expresión génica de los cultivos 3D en normoxia, hipoxia e hiperoxia han sido analizados mediante RNA-Seq. Una vez extraído el ARN total (RNeasy, Qiagen), se procedió a: 1) la generación de librerías mediante kits Illumina con barcodes de identificación para cada muestra. 2) Enriquecimiento de la muestra mediante el TruSeq™ RNA Enrichment Kit de Illumina. 3) Generación de clusters y secuenciación a 100x en el sistema HiScanSQ de Illumina en la Unidad de Genómica (CNIO). 4) El análisis bioinformático de los resultados (alineamiento, normalización por RPKM, expresión diferencial mediante el *pipeline nextpresso*, análisis de *clustering*) en la Unidad de Bioinformática (CNIO).

Análisis de marcadores de estrés oxidativo mediante espectrometría de masas.

Los niveles del tripéptido antioxidante glutatión reducido (GSH) y su forma oxidada (el dipéptido GSSG) se han llevado a cabo en la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La Fe de Valencia, en un equipo de espectrometría de masas con triple cuadrupolo (TQ) en modo *multiple reaction monitoring* (MRM) que ofrece gran sensibilidad (ppb) y es ideal para llevar a cabo un análisis de tipo *targeted*. El fraccionamiento previo a la entrada al espectrómetro se realizó mediante un sistema cromatográfico UPLC (*ultra performance liquid chromatography*) (UPLC-MSMS QqQ, Agilent). Las tumoresferas fueron incubadas con *N-ethylmaleimide* para prevenir la autooxidación del GSH.

Validación *in vivo* en *xenografts* implantados en ratones inmunodeprimidos.

Hemos utilizado ratones atímicos desnudos (BALB/c, Charles River) para desarrollar PDXs (*patient-derived xenografts*) derivados de los tumores de CPNM en estadios resecables obtenidos en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital de la Ribera (Alzira) por el Dr. J. Galbis y estabilizados en el Servicio de Producción Animal (SCSIE-UV). Los animales se mantienen a temperatura estable (21-23 °C), con una humedad relativa del 40-60%, con ciclos luz/oscuridad de 12 horas en aisladores dentro de un área SPF, y su manipulación se lleva a cabo en cabinas de flujo laminar, siguiendo la normativa internacional vigente [European Community Council Directive (86/609, OJ L 358. 1, December 12, 1987), National Health Institute (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publ. No. 85-23, 1985, USA)].

Para desarrollar el modelo ortotópico en pulmón, hemos utilizamos diferentes abordajes. En una primera aproximación utilizamos células derivadas de pacientes previamente estabilizadas en cultivo 2D y transfectadas (Lipofectamine, Invitrogen) con un vector de expresión con los marcadores luciferasa y la proteína roja fluorescente tdTomato pcDNA3.1-Luc2-tdT (Addgene), que fueron inoculadas en la vena de la cola de ratones atímicos inmunodeprimidos (Balb/c nu/nu, Envigo). Transcurridas unas 4 semanas, estas células tumorales desarrollan múltiples focos metastásicos en los pulmones, detectables mediante la administración intraperitoneal del sustrato de la luciferasa y captación de la luz emitida por un equipo de análisis de imagen In-Vivo FX PRO (Bruker) y observación macro y microscópica tras el sacrificio del animal.

En una segunda aproximación, hemos desarrollado un modelo ortotópico que reproduce de manera más realista el desarrollo de un tumor primario en el parénquima pulmonar. Esto se consigue con la inoculación de una suspensión celular cargada en una jeringa con aguja 30G directamente en el parénquima pulmonar, previamente expuesto mediante cirugía torácica en ratones previamente anestesiados con isoflurano y conectados a un ventilador mecánico. Para la monitorización del crecimiento tumoral, hemos utilizado un sistema TAC/PET (Bruker Albira, UCIM-UV), previa inyección i.p. de un radiotrazador (18F-fluoro-2-dioxi-glucosa).

RESULTADOS

1. Desarrollo y caracterización genética de las tumoresferas derivadas de pacientes de CPNM.

A partir de muestras de tejido fresco procedentes de pacientes con CPNM, aislamos y estabilizamos en cultivo *in vitro*, en normoxia e hipoxia, un total de 3 cultivos 3D, denominadas en adelante PAC42, PAC45, y PAC50. El resto de cultivos primarios que hemos establecido a lo largo de este tiempo resultó contener fibroblastos y no células tumorales, y por lo tanto han sido eliminados del estudio. El proceso de adaptación a las condiciones *in vitro* ha durado unas 8-12 semanas en función del cultivo. En cuanto a la caracterización genética, los datos del panel de secuenciación de genes frecuentemente mutados en el CPNM (**Figura 2**) mostró que PAC42 y PAC50 presentan mutaciones activadoras en el oncogen *KRAS* (sustituciones G12D y G12C), mientras que el PAC45 es mutante para *NRAS* (Q61L). Desgraciadamente, no encontramos ningún caso portador de mutaciones accionables (EGFR, EML4-ALK, ROS1, o BRAF) que pudiera tratarse con terapias dirigidas.

2. La hiperoxia disminuye la capacidad proliferativa al bloquear el ciclo celular.

La **figura 3** muestra el efecto agudo sobre el crecimiento tumoral de las transiciones normoxia-hipoxia, normoxia-hiperoxia e hipoxia-hiperoxia. Debemos de tener en cuenta que las tumoresferas fueron adaptadas a la hipoxia durante 3 meses para asegurar un fenotipo estable. La capacidad proliferativa de las tumoresferas sometidas a las distintas transiciones fue medida transcurridas 72 horas postsiembra.

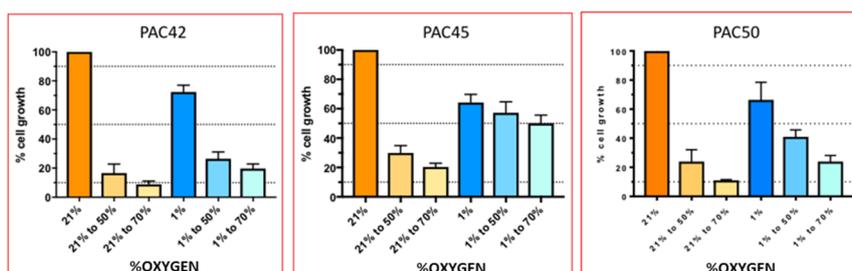


Figura 3. Efecto antiproliferativo de la hiperoxia en los diferentes cultivos de tumoresferas derivadas de pacientes.

En los 3 casos analizados, la **hiperoxia** mostró un **potente (y dosis-dependiente) efecto antiproliferativo**, si bien la adaptación previa a la hipoxia en el PAC45 limitó significativamente este efecto. A continuación, realizamos varios ensayos de formación de colonias con el fin de estudiar el efecto antitumoral de la hiperoxia **a largo plazo (15 días)**, *in vitro*. En la **figura 4** podemos observar que se reproduce el efecto antitumoral de la hiperoxia, ya sea en células que crecieron en normoxia como en hipoxia.

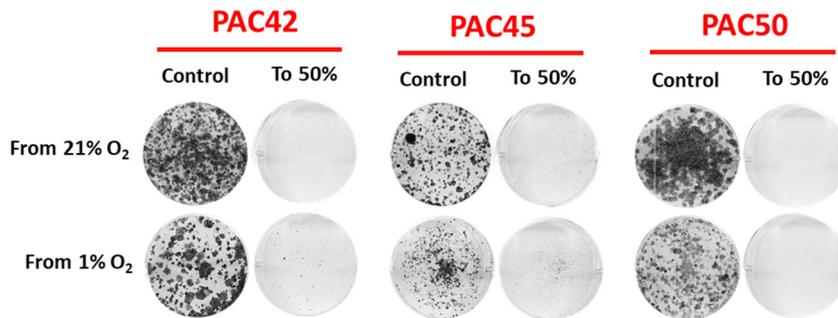


Figura 4. Ensayos de formación de colonias a partir de cultivos de baja densidad de los cultivos de pacientes indicados. Las suspensiones celulares provenientes de tumoresferas digeridas con tripsina fueron sembradas a baja densidad (2000 células por pocillo) y cultivadas en las condiciones indicadas. Transcurridas dos semanas, los cultivos fueron fijados y teñidos con cristal violeta, y los pocillos digitalizados.

Con el fin de profundizar en los mecanismos de muerte celular que median el efecto antitumoral de la hiperoxia en nuestros modelos derivados de paciente, analizamos mediante citometría de flujo el porcentaje de células que mueren por apoptosis y necrosis, dos de los principales tipos de muerte celular, tras una exposición aguda a diferentes grados de hiperoxia. En los resultados de la **Figura 5** podemos observar como solo la hiperoxia severa (70% de O₂) consigue reducir la viabilidad celular, aunque de manera muy discreta.

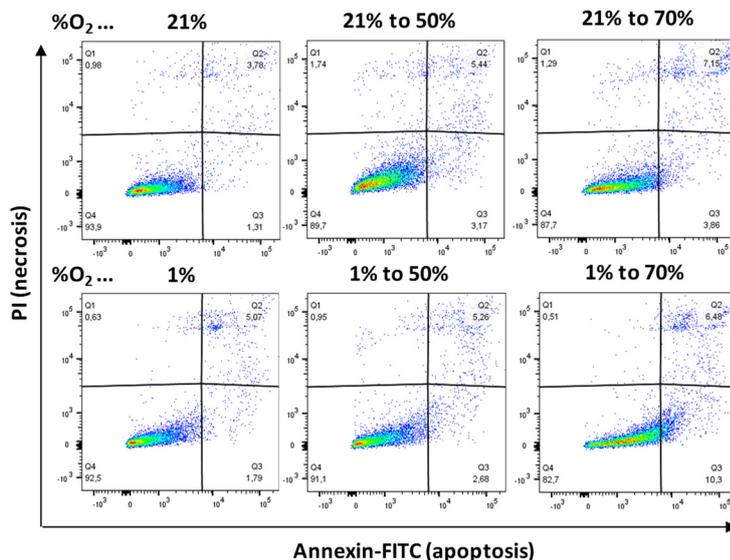


Figura 5. Análisis de la muerte celular inducida por la hiperoxia. Las células aisladas de tumoresferas de PAC42 en normoxia o hipoxia fueron expuestas a concentraciones crecientes de O₂ durante 72 horas, y analizadas mediante el método de anexina V (un marcador de apoptosis que emite fluorescencia verde) y yoduro de propidio (PI, un marcador de necrosis que emite fluorescencia roja) y citometría de flujo. Los porcentajes indicados en el cuadrante inferior izquierdo corresponden a las células viables, los del cuadrante inferior derecho a las células apoptóticas, los del cuadrante superior izquierdo a las células necróticas, y los del cuadrante superior derecho a las células apoptóticas tardías, que también se tiñen con el PI.

Dado que estos resultados sugieren que la exposición aguda a la hiperoxia no induce la muerte celular de manera significativa, nos preguntamos si podríamos estar ante un efecto citostático en lugar de citotóxico. Por ello estudiamos la distribución de las células sometidas a hiperoxia a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. En la **figura 6** podemos observar un claro **arresto celular** en las fases S y G2/M y una drástica disminución del porcentaje de células en G0/G1 inducido por la hiperoxia moderada (50% de O₂) y severa (70%) tanto en células provenientes de normoxia como de hipoxia. Otro efecto significativo inducido por la hiperoxia fue la disminución en la expresión de marcadores *cancer stem cell* como CD44 (resultados no mostrados).

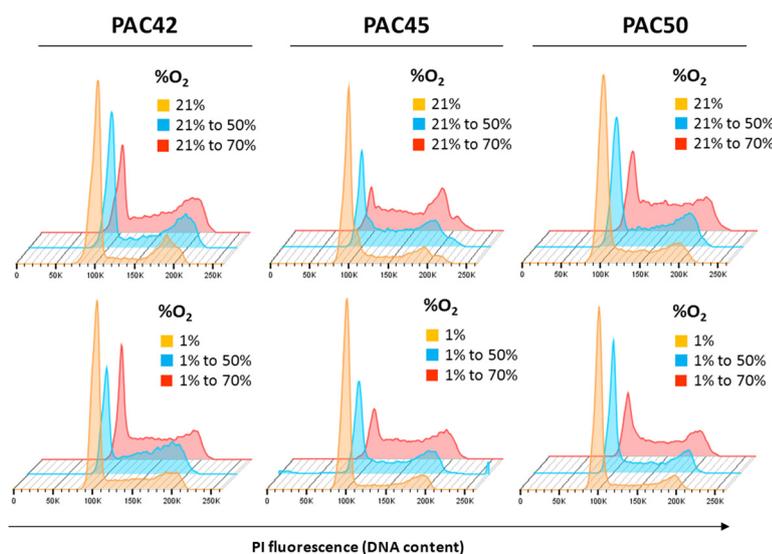


Figura 6. Análisis de los cambios inducidos por la hiperoxia en el ciclo celular. El contenido en ADN, determinado por la señal de fluorescencia roja que emite el yoduro de propidio, permite calcular el porcentaje de eventos en cada una de las fases del ciclo celular (fase G0/G1, pico de la izquierda diploide -2n-; fase de síntesis de ADN -S-, meseta central; fases G2/mitosis -M-, pico de la derecha tetraploide -4n-). En cultivo celular que se encuentra en fase de crecimiento exponencial, la mayoría de las células en un momento determinado se encuentran en la fase G1 (primer pico). Si se produce un bloqueo en la fase de síntesis del ADN (S) o en la mitosis (M), las células se acumulan en la zona del histograma correspondiente.

3. Estudio de los patrones transcripcionales globales asociados a la respuesta a la hiperoxia.

En la siguiente fase nos propusimos diseccionar los mecanismos moleculares que intervienen en la respuesta a la hiperoxia mediante secuenciación y cuantificación del ARN mensajero por NGS (RNA-Seq), con el objeto de identificar aquellos biomarcadores que pudieran predecir esta respuesta y seleccionar de esta manera aquellos pacientes que pudieran beneficiarse de la oxigenoterapia. Aunque en un principio analizamos 9 líneas diferentes, finalmente representamos los resultados de los 3 modelos que demostraron ser células tumorales y descartamos los que estaban compuestos por fibroblastos. El *heatmap* de la **Figura 7** representa los resultados del análisis de *clustering* con los niveles de expresión de los genes que más cambian a lo largo de todo el *dataset*. Podemos observar que el análisis no supervisado identifica 3 patrones transcripcionales principales: el correspondiente a las células sometidas a normoxia, a hipoxia y a hiperoxia aguda. Dentro de cada *cluster* encontramos diferentes subpoblaciones; de hecho, podemos observar como en normoxia cada modelo tiene un patrón individual. La firma transcripcional asociada a la adaptación a la hipoxia (muestras señaladas en rojo) es bastante homogénea, mientras que la asociada a hiperoxia (en azul) es más heterogénea.

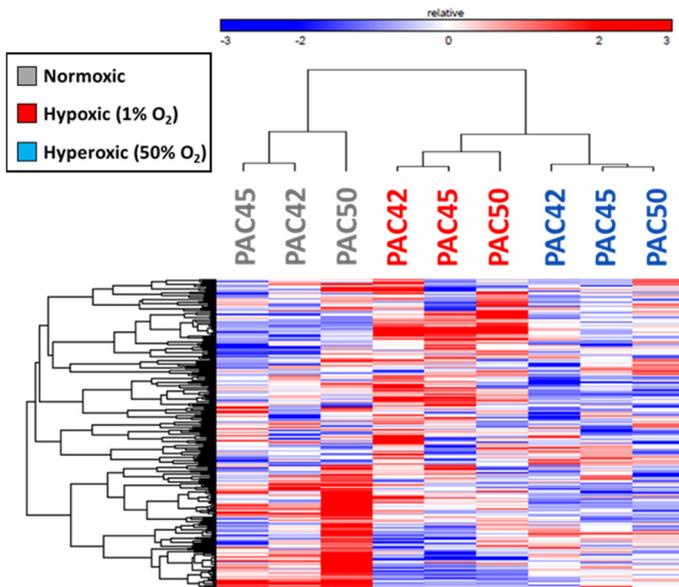


Figura 7. Análisis de *clustering* con los datos transcriptómicos obtenidos de tumoresferas cultivadas en normoxia y sometidas a hipoxia e hiperoxia. El ARN total aislado de las condiciones indicadas fue analizado mediante RNA-seq. Una vez normalizados los datos, filtramos aquellos genes que mostraban una variación de más de 3 veces la desviación estándar con respecto a la media del *dataset* fueron seleccionados, y realizamos un análisis de *clustering* multivariante utilizando la distancia euclídea como medida de la similitud entre muestras para cada gen. La escala de colores del *heatmap* señala los valores altos de expresión relativa en rojo, y los valores bajos en azul.

4. El efecto antiproliferativo de la hiperoxia podría estar mediado por el estrés oxidativo.

La **figura 8** muestra los niveles de glutatión oxidado (GSSG), un marcador canónico de estrés oxidativo. El glutatión reducido (o GSH) es un tripéptido que contiene cisteína (cuyo grupo tiol o sulfhidrilo le confiere un potente efecto antioxidante) esencial en el mantenimiento del equilibrio redox celular. Una vez el GSH neutraliza compuestos oxidantes (como los radicales libres derivados del oxígeno, o ROS) se transforma en GSSG, formado por dos moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro. En la figura podemos observar cómo la hiperoxia disminuye el *ratio* GSH/GSSG de manera dosis-dependiente. Además, la adaptación a la hipoxia protege, al menos en parte, previene la oxidación del GSH a GSSG. Por tanto, estos resultados sugieren que las células adaptadas a la hipoxia sufren un menor estrés oxidativo, ya fuera por una mayor capacidad antioxidante o una menor producción de ROS al estar adaptadas a una presión de oxígeno menor. Actualmente estamos analizando estas condiciones experimentales con la plataforma de metabolómica (que incluye todos los metabolitos de la ruta de síntesis y degradación del GSH, así como de la transulfuración y otras vías asociadas), que es uno de los objetivos del proyecto dirigido por la Dra. Calabuig (FDM- ASEICA 2018).

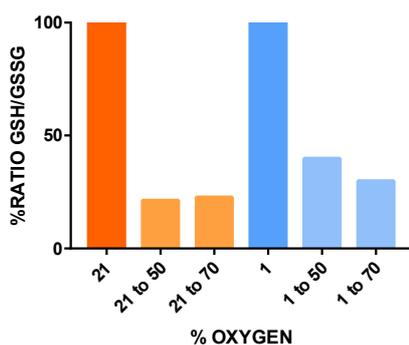


Figura 8. Ratio entre el glutatión reducido (GSH) y el oxidado (GSSG) en el cultivo de tumoresferas sometidas a hiperoxia (50 y 70% de O₂).

4. En los CPNM EGFR mutantes, el tratamiento con hiperoxia podría aumentar la potencia citotóxica de los inhibidores de EGFR.

Las terapias dirigidas contra la actividad tirosina quinasa de EGFR en los pacientes de CPNM en los que este oncogen presenta mutaciones activadoras (deleción del exón 19, sustitución L858R) se están utilizando en la clínica como primera línea de tratamiento. No obstante, pese a las buenas respuestas iniciales, y un aumento muy significativo del tiempo libre de enfermedad, casi todos los pacientes acaban recayendo. Por ello nos propusimos estudiar el efecto de la hiperoxia en este subgrupo molecular, con la intención de ensayar si ésta podría aumentar la eficacia de los inhibidores de EGFR, paradigma actual de la medicina personalizada para el CPNM.

En primer lugar, sometimos a hiperoxia a un grupo de líneas celulares portadoras de mutaciones en EGFR y que se utilizan habitualmente como modelo experimental para testar inhibidores de tirosina quinasa. En la **figura 9** podemos observar como la hiperoxia, aplicada durante 15 días de cultivo, tuvo un efecto antitumoral muy potente en todas las líneas ensayadas, incluyendo la línea derivada de paciente PAC303, desarrollada en el laboratorio del Dr. Camps (Hospital General Universitario de Valencia).

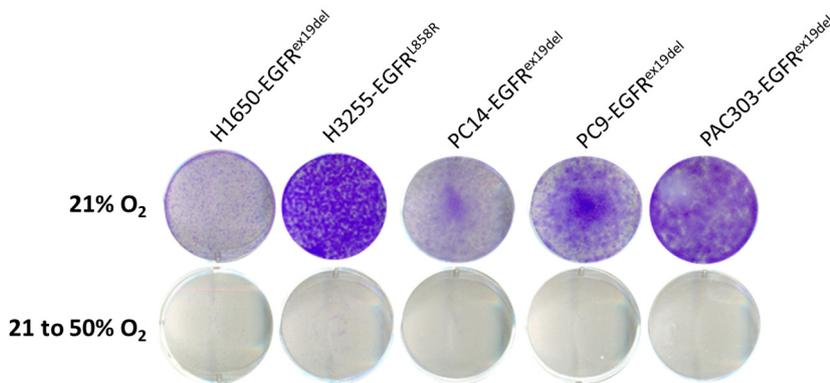


Figura 9. Ensayos de formación de colonias a partir de cultivos de baja densidad de los cultivos de líneas celulares de CPNM EGFR mutantes. Las células fueron sembradas a baja densidad (2000 células por pocillo) y cultivadas en las condiciones indicadas de oxígeno, en condiciones de adherencia. Transcurridas dos semanas, los cultivos fueron fijados y teñidos con cristal violeta, y los pocillos digitalizados.

En un segundo experimento, aplicamos la misma estrategia, pero esta vez en el cultivo de la línea celular PAC303 previamente adaptada a la hipoxia (1% de oxígeno), e incubada durante 15 días en presencia del inhibidor de EGFR osimertinib, de manera individual o en combinación con la hiperoxia. En la **figura 10** podemos observar como las colonias supervivientes al osimertinib desaparecieron cuando se aplicó la combinación con la hiperoxia.

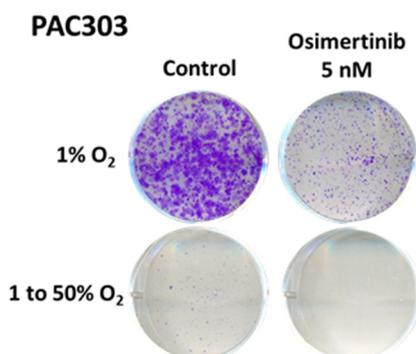


Figura 10. Ensayos de formación de colonias a partir de cultivos de baja densidad de la línea derivada de paciente PAC303 EGFR mutante. Las células fueron sembradas a baja densidad (2000 células por pocillo) y cultivadas en las condiciones indicadas de oxígeno, en condiciones de adherencia. Transcurridas dos semanas, los cultivos fueron fijados y teñidos con cristal violeta, y los pocillos digitalizados.

A continuación, realizamos una serie de experimentos utilizando líneas celulares EGFR mutantes HCC827, HCC4006 y H1975. La **figura 11** muestra como el cultivo en hiperoxia durante 72 horas, en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor de EGFR AZD9291, desplaza las curvas de citotoxicidad hacia la izquierda, esto es, disminuyendo significativamente la IC50 del inhibidor. Este potente efecto sinérgico es mucho más acusado en la línea HCC827, que de hecho es sensible a la hiperoxia en ausencia del inhibidor. Estos resultados junto a los mostrados en la figura 10, sugieren que la oxigenoterapia podría potenciar el efecto de los inhibidores de EGFR, e incluso prevenir o revertir la aparición de resistencias, uno de los grandes problemas en el tratamiento de estos pacientes oncológicos.

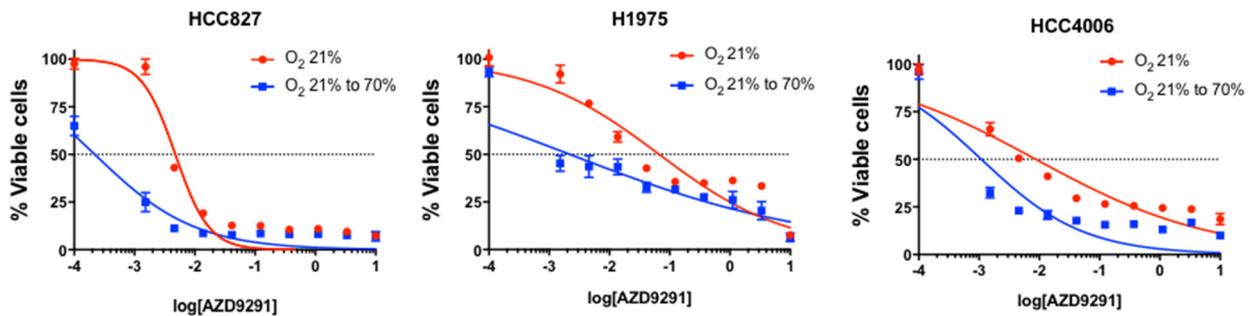


Figura 11. Curvas de citotoxicidad inducida por el inhibidor de EGFR AZD9291 en presencia o ausencia de hiperoxia en líneas celulares de CPNM EGFR mutantes. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos convencionales (cultivo adherente) en RPMI suplementado con suero bovino fetal (10%) y antibióticos, e incubadas con concentraciones crecientes de AZD9291 (desde 1 nM hasta 10 μ M) en normoxia (21% O₂) o hiperoxia (70% O₂).

Por otro lado, y con el fin de estudiar el papel de la hipoxia en la adquisición de la resistencia a estos inhibidores de EGFR, adaptamos a las líneas celulares HCC827, H1975 y HCC4006 a la hipoxia crónica (1 y 3% de oxígeno), y determinamos la sensibilidad al osimertinib transcurridas 5 y 28 semanas. La **figura 12** nos muestra como cada línea presenta un patrón temporal de adquisición de resistencia inducida por la hipoxia particular, si bien la hipoxia severa (1% de oxígeno) acaba provocando la resistencia en todos los modelos ensayados.

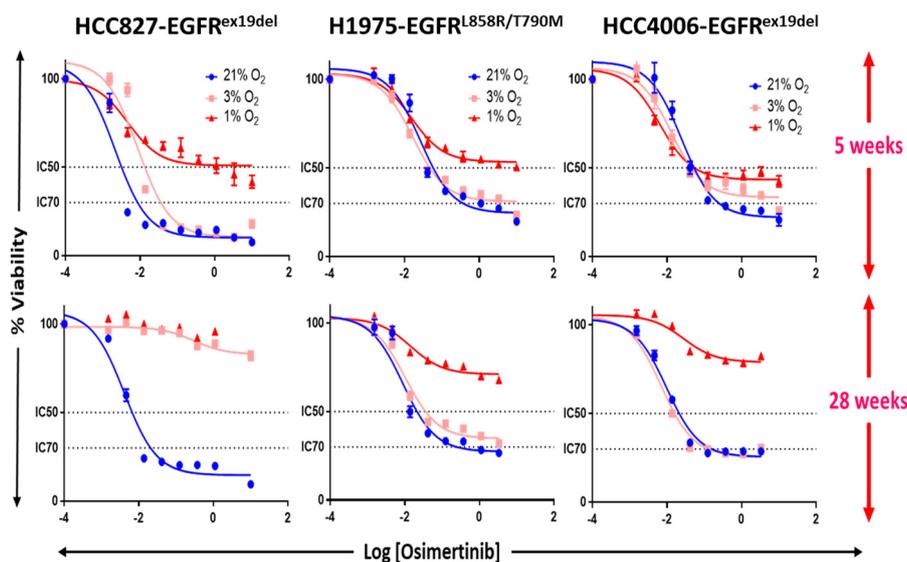


Figura 12. Curvas de citotoxicidad inducida por el inhibidor de EGFR AZD9291 en líneas celulares de CPNM EGFR mutantes adaptadas a la hipoxia crónica (28 semanas) moderada (3%) y severa (1% de oxígeno). Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos convencionales (cultivo adherente) en RPMI suplementado con suero bovino fetal (10%) y antibióticos, e incubadas con concentraciones crecientes de AZD9291 (desde 1 nM hasta 10 μ M) en normoxia (21% O₂) o hiperoxia (70% O₂).

La adquisición de resistencia inducida por la exposición prolongada a la hipoxia podría ser debida a la activación del fenotipo epitelio-mesénquimal (EMT), un programa transcripcional relacionado con la plasticidad celular y la capacidad metastásica que ha sido identificado como un posible mecanismo de resistencia a los inhibidores de EGFR en el contexto del CPNM por varios grupos de investigación, incluyendo el nuestro (*Soucheray et al.; Intratumoral heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC results in divergent resistance mechanisms in response to EGFR tyrosine kinase inhibition, Cancer Research 2015*) Por ello determinamos la concentración de TGF β 1, una citoquina inductora del fenotipo EMT, en los medios de cultivos de los modelos EGFR mutantes sometidos a hipoxia aguda (72 horas) o crónica (28 semanas). Los resultados de la **figura 13** nos muestran como la secreción de este factor pro-EMT aumenta con la exposición a la hipoxia, si bien de manera diferente en cada línea celular, y que por tanto podría estar dirigiendo la adquisición de resistencia a los inhibidores de EGFR en los tumores adaptados a la hipoxia. Caracterizar este mecanismo dependiente del microambiente tumoral, y encontrar la manera de evitarlo, es una de las líneas de investigación que se derivan de este proyecto.

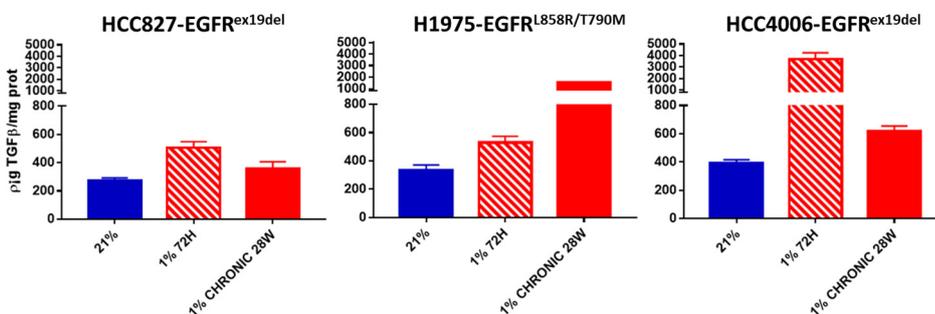


Figura 13. Determinación de los niveles extracelulares de TGF β 1 mediante ELISA en los modelos celulares de CPNM EGFR mutantes sometidos a hipoxia aguda (72 horas) y crónica (28 semanas).

5. Efecto de la hiperoxia en modelos de CPNM *in vivo*: puesta a punto del modelo ortotópico en pulmón.

Por último, nos hemos propuesto llevar a cabo una prueba de concepto para validar *in vivo* la viabilidad de una estrategia terapéutica para el CPNM basada en la oxigenoterapia, utilizando una estación de hipoxia/hiperoxia diseñada en nuestro departamento y disponible en el Animalario de la UV (**Figura 14**). Este equipo ya ha sido utilizado por la Unidad de Neonatología del IIS La Fe dirigida por el Dr. Máximo Vento para reproducir la transición fetal-neonatal y ensayar la suplementación con oxígeno para prevenir el daño cerebral inducido por la hipoxia en roedores.



Figura 14. Imagen de la estación de gases diseñada para los experimentos de hipoxia e hiperoxia *in vivo* (SCSIE-UV). El equipo permite el control y monitorización de la temperatura, las presiones de gases y humedad.

En una primera aproximación, seguimos un abordaje similar al de Hatfield *et al.* (*Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation, Science Translational Medicine*, 2015), que utilizó un modelo de melanoma que metastatiza en los pulmones tras la inyección intravenosa de células de melanoma B16 en ratones inmunocompetentes C57BL6. En nuestro caso, hemos decidido utilizar ratones atímicos, carentes de inmunidad mediada por linfocitos B y T y con una actividad *NK* disminuida, con el objeto de ensayar el efecto antitumoral **directo** de la hiperoxia *in vivo*, y no el mediado por el sistema inmunitario.

Tras la inoculación intravenosa de células del PAC42 previamente marcadas con luciferasa se forman múltiples focos metastásicos en los pulmones de ratones atímicos, que se pueden monitorizar con un equipo de análisis de imagen. Pese a algunos resultados preliminares esperanzadores, la exposición a la hiperoxia normobárica (60% O₂) de tumores ya desarrollados (2 semanas post-inoculación), 8 horas al día durante una semana, no demostró ser capaz de disminuir el nº de nódulos tumorales (resultados no mostrados). Cambios en la pauta terapéutica no demostraron eficacia, dado que siempre encontramos múltiples metástasis (al menos 50 por pulmón) de tamaños muy variables tanto en el grupo control como el tratado.

Dado que la inoculación intravenosa de células tumorales demostró ser demasiado agresiva, y además alejada de la realidad (los CPNM suelen debutar como tumores primarios individuales), cambiamos la estrategia y desarrollamos un modelo ortotópico pulmonar, inyectando directamente una suspensión de células tumorales en el parénquima pulmonar de los mismos ratones inmunodeprimidos para desarrollar un único tumor. En la **figura 15** se resumen las características del modelo ortotópico tras la optimización de la cirugía torácica y ensayar varias modalidades de inyección en el parénquima pulmonar. Hemos decidido inocular las células derivadas de paciente PAC303 portadoras de mutaciones en EGFR, para poder validar el posible beneficio de la combinación de hiperoxia con los inhibidores de EGFR, y el uso de la tecnología TAC/PET, más sensible que el registro de la luminiscencia, para la monitorización del crecimiento tumoral (Bruker Albira).

Cabe resaltar que este modelo reproduce de manera relativamente fiel la histología de partida del paciente (adenocarcinoma pulmonar), que forma una masa tumoral única que somos capaces de monitorizar desde tamaños muy pequeños, y que además también forma metástasis linfáticas en el largo plazo. Con todo, pensamos que este es el modelo adecuado para validar no solo las hipótesis de este proyecto, sino también nos servirá como plataforma preclínica para ensayar otros tratamientos. Lamentablemente el desarrollo ha costado más tiempo del planeado, y algunos problemas técnicos nos han retrasado. Ahora que tenemos optimizado el modelo y conocemos su dinámica, en los próximos meses llevaremos a cabo los experimentos de exposición a la hiperoxia, en monoterapia y en combinación con los inhibidores de EGFR.

Por último, queremos hacer constar que todos los modelos *in vitro* e *in vivo*, y gran parte de los resultados mostrados en esta memoria, constituyen la tesis doctoral de Salvador Aparisi Alepuz, estudiante de tercer curso de doctorado en la Universidad de Valencia, titulada de manera preliminar **“Modulación de la hipoxia en el microambiente tumoral del cáncer pulmonar: efecto de la reoxigenación e implicaciones terapéuticas”**. Este proyecto de tesis doctoral no podría haberse llevado a cabo sin la financiación de la FDM. De hecho, es esencial para la culminación de esta tesis (y su publicación en forma de artículo científico) realizar la prueba de concepto *in vivo* planteada como objetivo en este proyecto y que desgraciadamente no hemos podido ejecutar a tiempo.

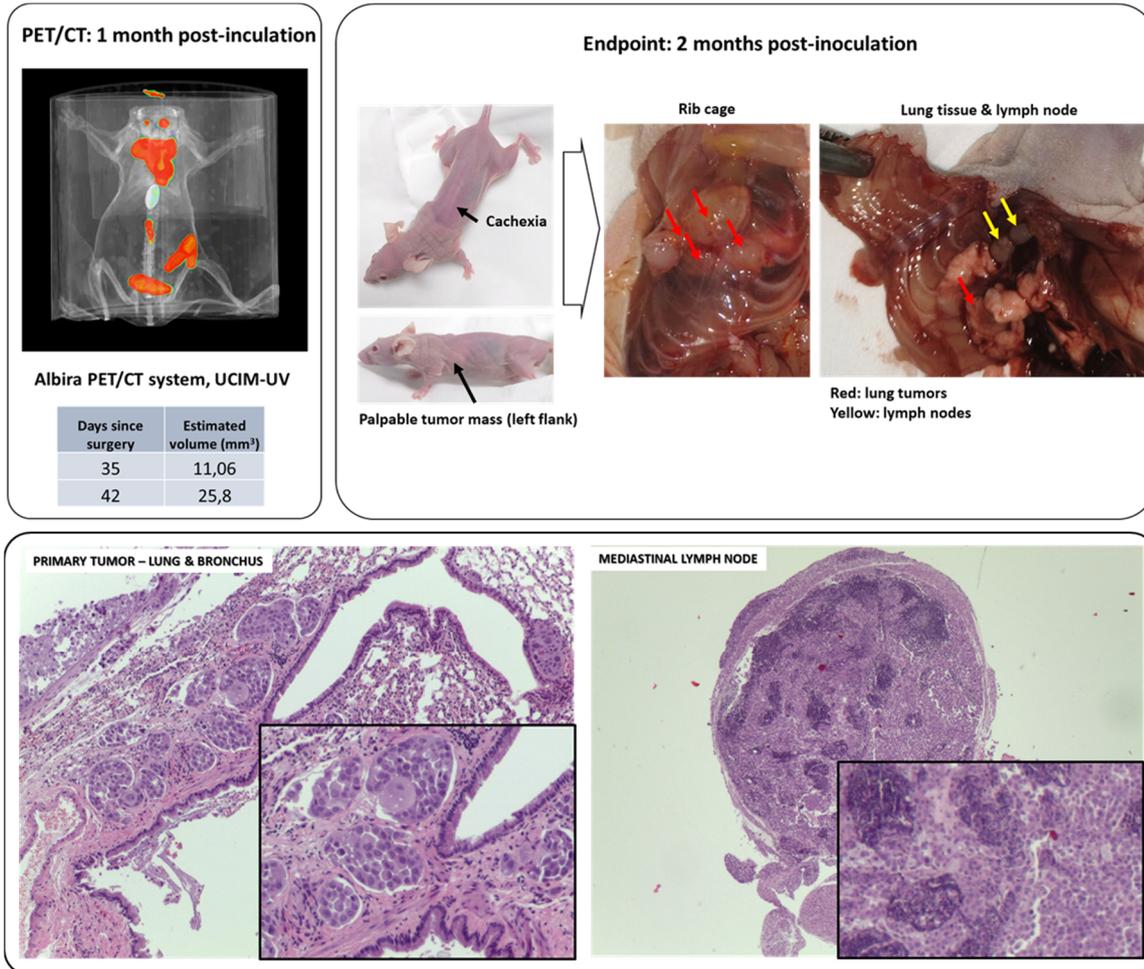


Figura 15. Desarrollo de un modelo ortotópico de PDX en ratón atímico inmunodeprimido. Imagen representativa de TAC/PET de un tumor ortotópico (resaltado en blanco) desarrollado tras la inoculación directa en el parénquima pulmonar (arriba, izquierda; sistema PET/CT Bruker Albira). Dos meses tras la inoculación, los animales muestran signos evidentes de caquexia; en el ejemplo, tras la necropsia se observa un tumor que atraviesa la pared torácica y que además ha metastatizado a los ganglios mediastínicos. Las microfotografías del tejido teñido con hematoxilina/eosina demuestran la presencia de células tumorales en el parénquima pulmonar y en los ganglios linfáticos locoregionales.

Conclusiones

1. La hiperoxia *in vitro* tiene un efecto antitumoral directo sobre todos los cultivos de CPNM analizados. La adaptación previa a la hipoxia, un factor de malignidad en el microambiente tumoral, podría modular este efecto antitumoral.
2. En los CPNM con mutaciones en EGFR, la hiperoxia podría potencia el efecto antitumoral de los inhibidores de EGFR actualmente utilizados como primera línea de tratamiento para este subtipo molecular. De hecho, el tratamiento con oxígeno terapéutico podría revertir la resistencia adquirida a estos inhibidores dirigida por la hipoxia.
3. A nivel molecular, el efecto antitumoral de la hiperoxia podría estar relacionado con la inducción del estrés oxidativo y la capacidad de expresar el programa transcripcional responsable de la defensa antioxidante y la adaptación a la hipoxia.
4. Para testar el efecto de la hiperoxia *in vivo*, hemos desarrollado un modelo de cáncer pulmonar ortotópico en ratones inmunodeficientes, que además nos permitirá validar el efecto de la combinación con los inhibidores de EGFR.
5. Estudios recientes han encontrado que la oxigenoterapia potencia la respuesta inmune en algunos cánceres experimentales (como el melanoma). Nuestros resultados indican que estos dos efectos antitumorales de la oxigenoterapia (el directo sobre las células tumorales y el indirecto, dependiente del sistema inmunitario), podrían combinarse en determinados casos de CPNM. En un futuro validaremos esta hipótesis en ratones inmunocompetentes.
6. Este proyecto ha dado lugar a una colaboración con el laboratorio de la Dra. Silvia Calabuig (Grupo de Oncología Molecular, Dr. Carlos Camps, Hospital General Universitario de Valencia), que permitirá extender nuestras observaciones a más modelos derivados de pacientes, añadiendo el estudio sistemático del metabolismo mediante una plataforma de metabolómica de última generación.