

MEMORIA FINAL DE ACTIVIDADES (2019-2021)

Título: TRATAMIENTO COMBINADO CON HIPEROXIA E INHIBIDORES DE PARP PARA CONTRARRESTAR LA PROGRESIÓN TUMORAL MEDIADA POR HIPOXIA.

Investigador Responsable: Francisco Javier Oliver Pozo.

Coordinador: Ángel García-Díaz.

Personal Investigador: Ana Belén Herrera Campos (Investigadora Predoctoral), Daniel Delgado Belido (Investigador postdoctoral), Mónica Fernández Cortés (Investigadora Predoctoral), Laura López Jimenez (Personal Técnico).

Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); Investigador Principal CIBER de Cáncer, ISCIII.

Periodo: Mayo de 2019-Mayo de 2021 (2 años).

ÍNDICE:

Índice.....	página 2.
Introducción y cronograma.....	página 3.
Descripción del estado de realización y resultados de las tareas.....	página 4.
Tarea 1. Determinación de los niveles/actividad de HIF-1 α y liberación de ROS en condiciones de hipoxia, hiperoxia 30% en combinación con el inhibidor de PARP olaparib.....	página 4.
Tarea 2. Análisis del exoma por RNAseq.....	página 9.
Tarea 3. Niveles de mediadores inflamatorios en células tumorales MUM2B y células sanas del epitelio pulmonar HBEC 3KT.....	página 24.
Tarea 4. Oximetría mitocondrial o medición del consumo de oxígeno.....	página 29.
Tarea 5. Análisis del Metabolismo glucolítico en hiperoxia/inhibición de PARP.....	página 31.
Tareas 6 y 7. Modelo murino de metástasis y estudio histopatológico.	página 34.
Conclusiones y futuras líneas de trabajo.....	página 35.
Aplicabilidad y potencial de transferencia.....	página 35.
Agradecimientos.....	página 36.
Colaboraciones establecidas para el desarrollo del proyecto.....	página 36.
Publicaciones en las que se referencia el proyecto.....	página 37.

INTRODUCCIÓN Y CRONOGRAMA.

Actividades desarrolladas según cronograma, diseño experimental y resultados:

Como en el anterior informe, quisiéramos destacar que se han afrontado la totalidad de las actividades que se incluyeron en la solicitud del proyecto, en el tiempo inicialmente previsto, incluso bajo las especiales circunstancias derivadas de la pandemia a los que todos nos hemos visto sometidos durante el último año (2020-2021) y que han afectado especialmente a los centros de investigación, con cierres totales y parciales de la actividad.

En el caso del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, del CSIC, tuvimos un cierre total del centro al comienzo de la pandemia de más de un mes, seguido de un periodo de actividad limitada, con un plan de contingencia aún vigente en el momento de la redacción de este informe (Junio de 2021), que entre otras cosas restringe la presencia a 3 investigadores por laboratorio al mismo tiempo, por lo que realmente hemos realizado un gran esfuerzo para mantener el avance de las investigaciones y completarlas en el tiempo que nos habíamos comprometido, experimentando solo algunas demoras en la fase de análisis de resultados.

A continuación se muestra el cromograma con el plan de actividades bianual y los periodos de actividad limitada devidos a la pandemia que sufrimos en estos años.

Cronograma:

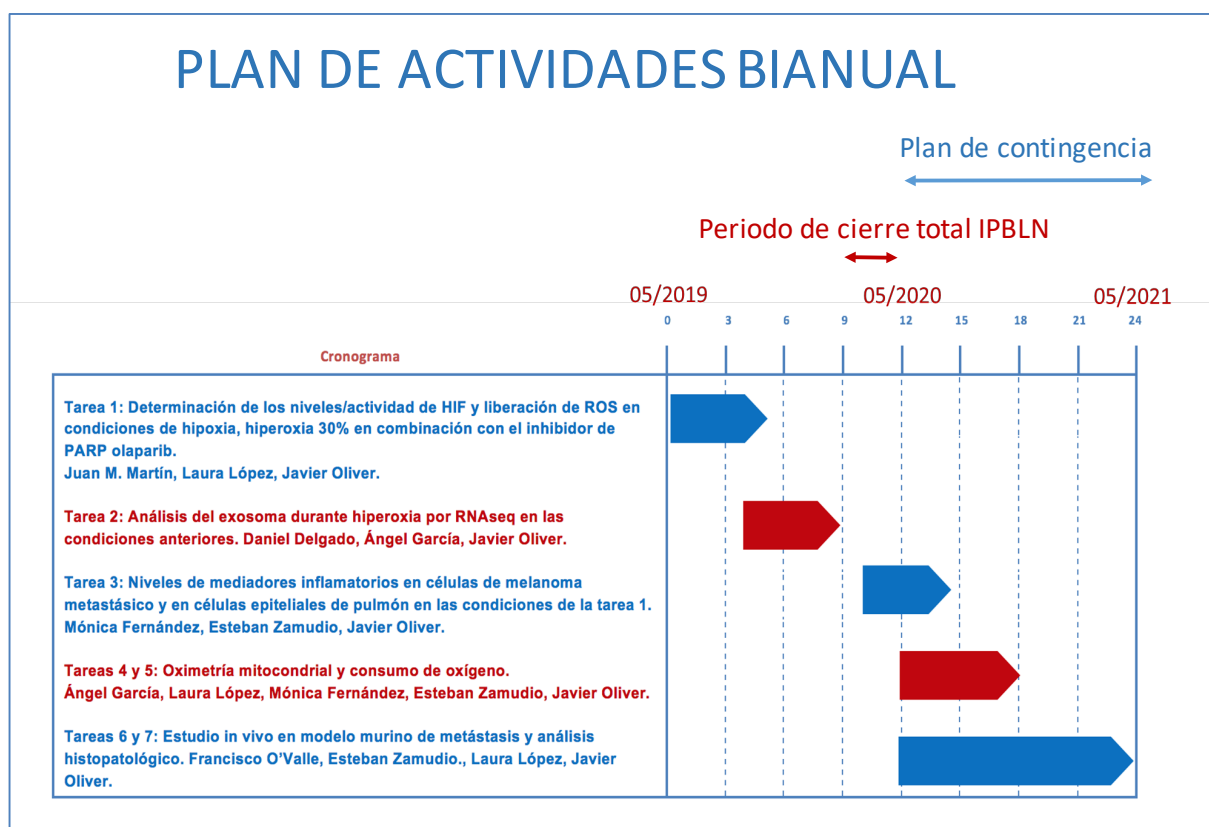


Figura 1. Cronograma de actividades previstas en el informe inicial. La flecha roja indica el periodo de cierre total de la actividad en el IPBLN, coincidiendo confinamiento a nivel nacional. La flecha azul indica el periodo de actividad limitada que marca el plan de contingencia del instituto.

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE REALIZACIÓN Y RESULTADOS DE CADA TAREA:

Como en la anterior memoria, procedemos a la descripción del estado de realización de cada tarea y los resultados obtenidos siguiendo el mismo orden establecido en el cronograma inicial.

Tarea 1. Determinación de los niveles/actividad de HIF-1 α y liberación de ROS en condiciones de hipoxia, hiperoxia 30% en combinación con el inhibidor de PARP olaparib.

Tarea 1.1 Determinación de los niveles/actividad de HIF-1 α mediante Western Blot (WB): Se determinaron los niveles de HIF-1 α mediante Western Blot (WB) en células tumorales de melanoma uveal MUM2B con tendencia a metastatizar a pulmón y en células sanas de epitelio pulmonar HBEC3KT, en condiciones de Normoxia, Hiperoxia (24

horas) e hipoxia inducida químicamente por el mimético de hipoxia CoCl_2 (4 horas. CoCl_2 100uM).

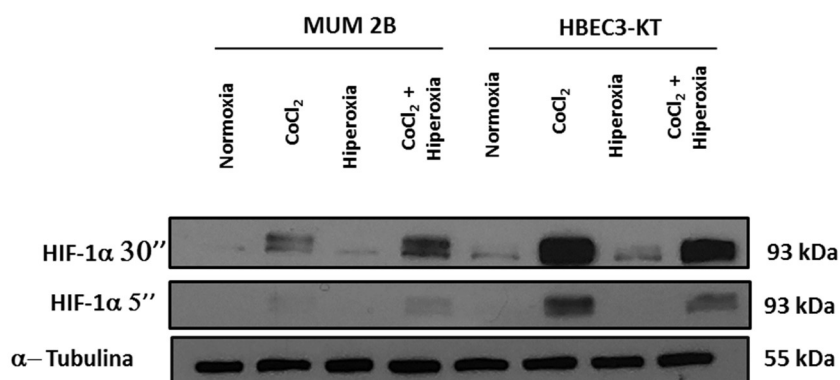


Figura 2. Western Blot para la detección de HIF1- α en células tumorales MUM2B y en células sanas HBEC3KT, en condiciones de Normoxia, Hipoxia (CoCl_2), Hiperoxia y combinación de Hipoxia e Hiperoxia.

En ambos tipos celulares pudimos observar un claro descenso de la acumulación de HIF-1 α en la condición de hiperoxia con respecto a la Hipoxia inducida químicamente, lo que debe suponer menor adaptación y malignidad del tumor en estas condiciones que si estuviera en un ambiente meramente hipóxico. No obstante, no observamos una reversión de la acumulación de HIF-1 α una vez inducida químicamente solo mediante el uso de hiperoxia, por lo que como propusimos en el informe anterior, era necesario analizar la situación en experimentos in vivo usando compuestos más específicos como el DMOG. Paralelamente, hemos estado trabajando en la optimización de los tiempos de incubación y las concentraciones de los reactivos que nos permitieran observar la máxima variación en los niveles de expresión de los genes y proteínas implicados. En este sentido, los resultados obtenidos en otros ensayos durante la realización de este proyecto, nos condujeron reiteradamente a pensar que para observar efectos mayores en los parámetros analizados era necesario aumentar los tiempos de hiperoxia. Por ello realizamos estos mismos análisis de acumulación de la proteína HIF-1 α (WB) a tiempos mayores de hiperoxia (72 horas) y con diferentes concentraciones de CoCl_2 (50uM) y Olaparib (1 y 5uM). Los resultados se muestran a continuación (Figura 3).

En estos estudios pudimos observar que en células tumorales MUM2B, los tiempos de hiperoxia de 72 horas eran capaces de disminuir la expresión de HIF-1 α a niveles propios de la normoxia. Además, la hiperoxia en estas condiciones era capaz de revertir la expresión de HIF-1 α incluso en presencia de CoCl_2 (50uM) a niveles inferiores a los obtenidos en las mismas condiciones en normoxia. Adicionalmente, la utilización de Olaparib disminuye aun mas la expresión de HIF-1 α de forma dosis dependiente, siendo mayor la caída de expresión a mayor concentración (5uM).

Contrariamente a lo observado en células tumorales, en células sanas del epitelio pulmonar HBEC 3KT los niveles de HIF-1 α tambien disminuyen en hiperoxia, aunque no observamos una reversión en hiperoxia de la inducción química de la hipoxia

lograda con el CoCl_2 (50uM) y el uso del Olaparib parece tener un menor efecto que en las células tumorales.

Este diferente comportamiento abre posibilidades terapéuticas, ya que permitiría el control de la adaptación a hipoxia diferencialmente en las células tumorales con respecto a las sanas.

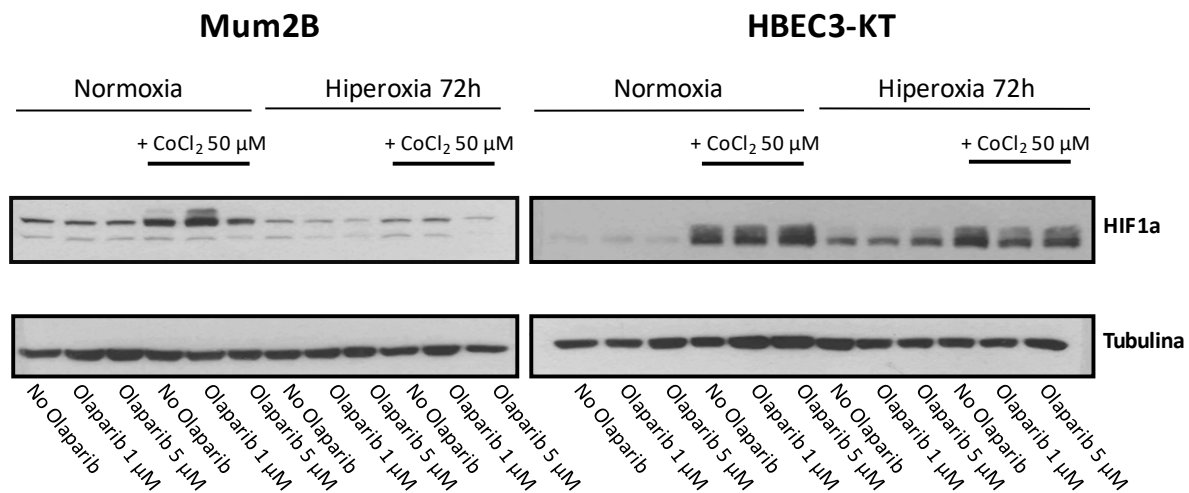


Figura 3. Western Blot para la detección de HIF1- α en células tumorales MUM2B y en células sanas HBEC3KT, en condiciones de Normoxia, Hipoxia químicamente inducida (50uM CoCl_2), Hiperoxia (72 horas) y combinación de tratamientos.

Tarea 1.2 Determinación de la actividad de HIF-1 α mediante el análisis por qPCR de los niveles transcripcionales de sus genes dependientes.

Para analizar la actividad de HIF-1 α a nivel transcripcional, analizamos los niveles de transcripción de BNIP3, uno de sus genes dependientes, mediante qPCR tanto en células tumorales MUM2B como en las sanas de epitelio pulmonar HBEC3KT bajo diferentes condiciones (Figura 4). Las condiciones a las que se sometieron las células fueron por un lado Normoxia, Normoxia con Olaparib a 5uM, Normoxia con inducción química de hipoxia mediante el uso de CoCl_2 a 100uM y la combinación de los 3 tratamientos anteriores mencionados. Por otro lado se sometieron a las mismas condiciones pero en hiperoxia (4 horas).

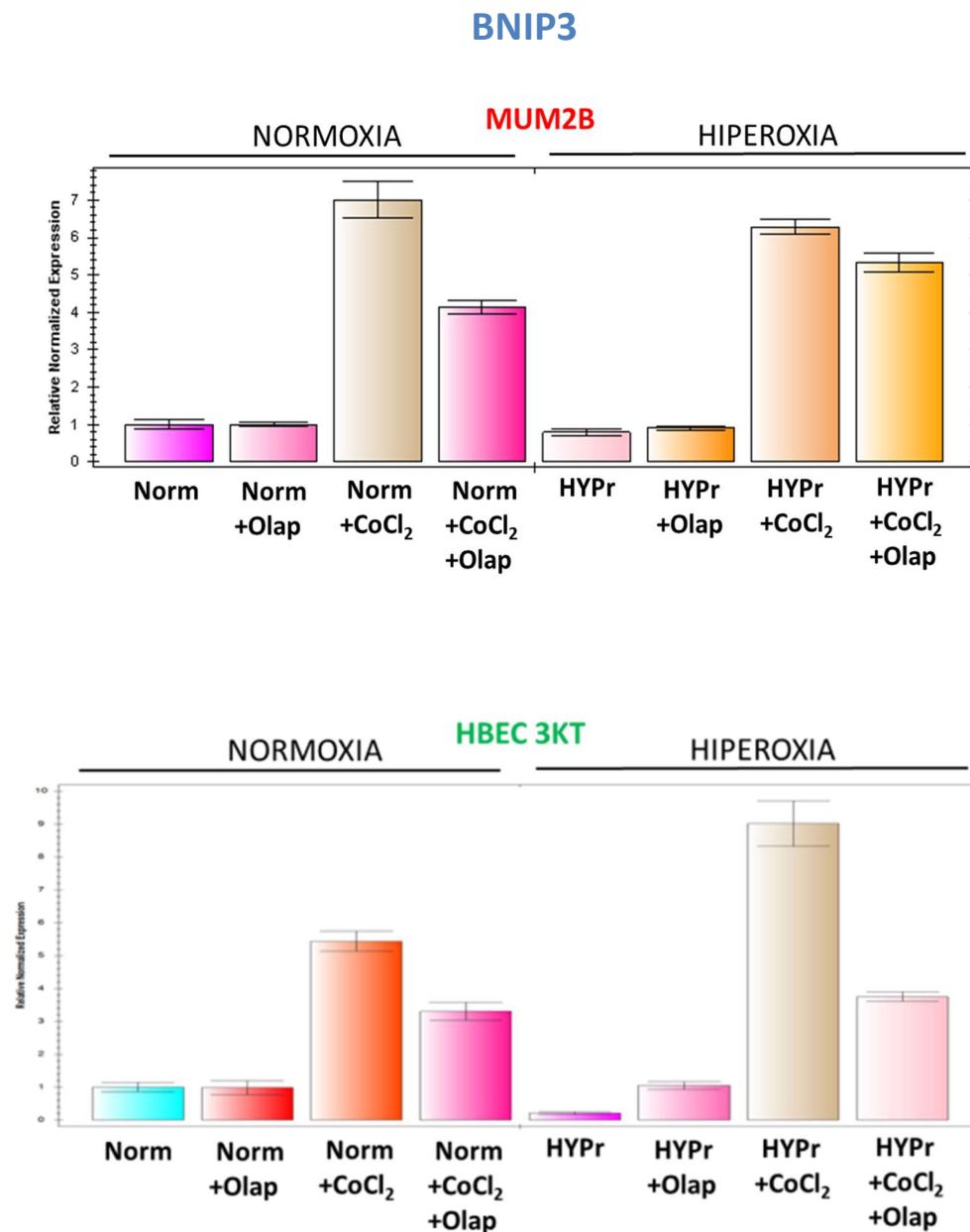


Figura 4. qPCR de células tumorales MUM2B y células sanas HBEC3KT, para la detección de los niveles de expresión del gen dependiente de HIF1- α BNIP3. Las 4 primeras columnas de cada panel muestran los niveles relativos de transcrito en condiciones por orden de izquierda a derecha de Normoxia, Normoxia + Olaparib, Normoxia con inducción química de Hipoxia mediante CoCl₂ y la combinación de los 3 tratamientos anteriores. Las 4 columnas de la derecha de cada panel muestran en orden de izquierda a derecha las condiciones de Hiperoxia, Hiperoxia + Olaparib, Hiperoxia con inducción química de Hipoxia mediante CoCl₂ y por último la combinación de los 3 tratamientos anteriores.

Lo que pudimos observar es que el tratamiento exclusivo con Hiperoxia disminuye la expresión de BNIP3 respecto a todas las demás condiciones como se esperaba. El Olaparib es capaz de disminuir la expresión de BNIP3 respecto a Hipoxia inducida químicamente sin embargo, en estas condiciones ni el Olaparib ni la hiperoxia son

capaces de compensar totalmente la inducción de BNIP3 producida por el el efecto del CoCl_2 .

Aunque estos resultados son suficientemente informativos a cerca de la capacidad de la hiperoxia para disminuir los niveles de $\text{HIF1}\alpha$ y sus genes dependientes, como en el apartado anterior y debido a que los resultados de varios de los experimentos propuestos parecían indicar que se necesitaba más tiempo de hiperoxia para ver efectos claros, decidimos seguir optimizando las condiciones de estos ensayos, y encontramos que podíamos compensar los efectos de la hipoxia inducida químicamente aumentando el tiempo de hiperoxia a 72h y usando concentraciones de 50uM de CoCl_2 .

Estos resultados sugieren que podemos regular la expresión de $\text{HIF1}\alpha$ clínicamente aumentando los tiempos de hiperoxia, incluso cuando hay un ambiente hipóxico en el tumor (Figura 5).

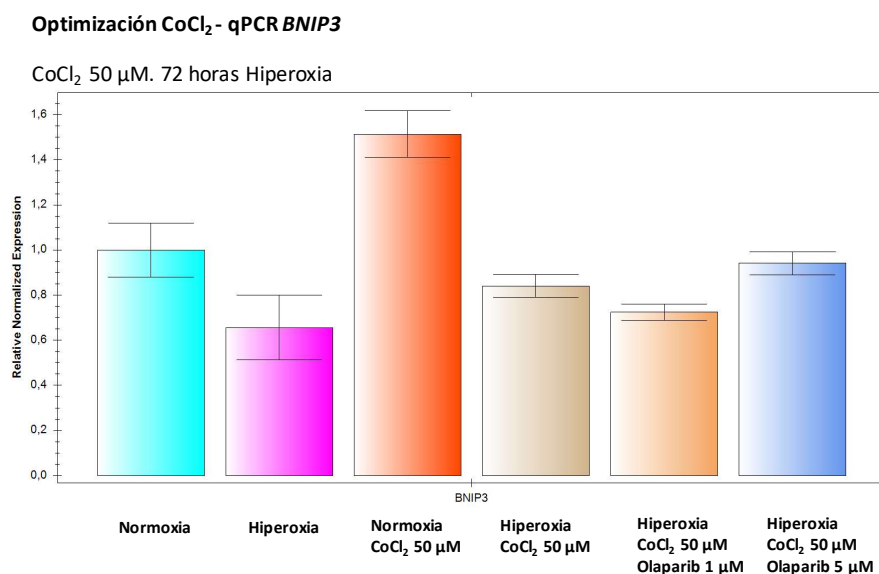


Figura 5. qPCR de células tumorales MUM2B a 72 horas de hiperoxia y 50uM CoCl_2 con distintas concentraciones de Olaparib. Bajo estas condiciones la hiperoxia es capaz de compensar totalmente la inducción química de la hipoxia y el Olaparib también mejora la situación.

Tarea 1.3 Determinación de los niveles de liberación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en condiciones de hipoxia, hiperoxia 30% en combinación con el inhibidor de PARP olaparib.

Como ya se reflejó en el informe anterior los resultados obtenidos sugieren que las células epiteliales sanas podrían ser protegidas al menos parcialmente por la inhibición de PARP.

Se muestran los resultados obtenidos en condiciones de hiperoxia (30%) en 3 tipos celulares, células de melanoma maligno (MM) MUM2B y C8161 y en células de epitelio pulmonar no transformadas (HBEC3KT). Los análisis muestran lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) con un máximo en torno a las 4 horas de tratamiento que después se reduce. Mientras que el inhibidor de PARP, olaparib, producía un descenso significativo de la liberación de ROS en las células de epitelio sano de pulmón, no se apreció efecto en este parámetro relativo a las células de melanoma maligno (Figura 6), lo que sugiere al menos una protección parcial de las células sanas frente a la hiperoxia con respecto a las tumorales.

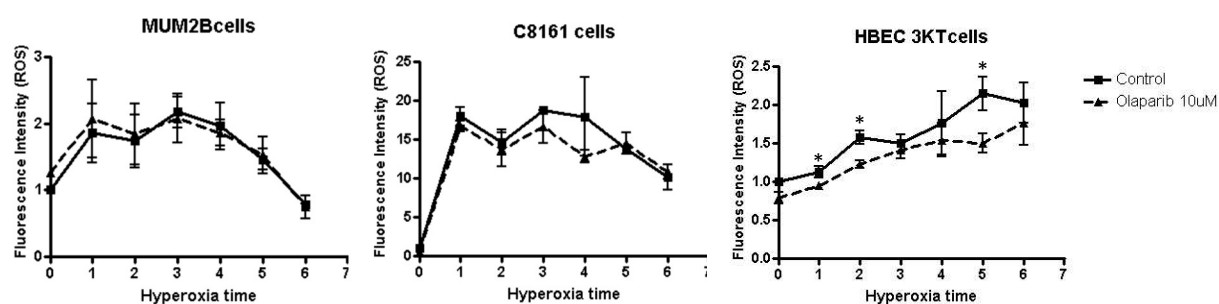


Figura 6. Cinética de producción de especies reactivas de oxígeno en células de melanoma maligno, MUM2B y C8161, y epiteliales de pulmón (HBEC3KT).

Tarea 2. Análisis del exoma por RNAseq:

En el anterior informe, se detalló el estudio de RNAseq a tiempos cortos de hiperoxia (4 horas) que se detalla a continuación. No obstante, como en la mayoría de los estudios que hemos realizado durante el proyecto, es nuestra intención realizar un nuevo estudio de RNASeq a tiempos largos, de manera que podamos comparar los

efectos de la hiperoxia a lo largo del tiempo tanto a tiempos cortos (short term) como a tiempos mas largos (long term).

Se extrajeron 3 muestras independientes de ARN total de cultivos de células tanto MUM2B como HBEC3KT, en las condiciones especificadas en el esquema experimental (Figura 7): Normoxia frente a Hiperoxia (4 Horas), con Olaparib (5uM) y sin Olaparib (control) en ambos tipos celulares. Se cuantificaron y se secuenciaron mediante tecnología NGS (Next Generation Sequencing).

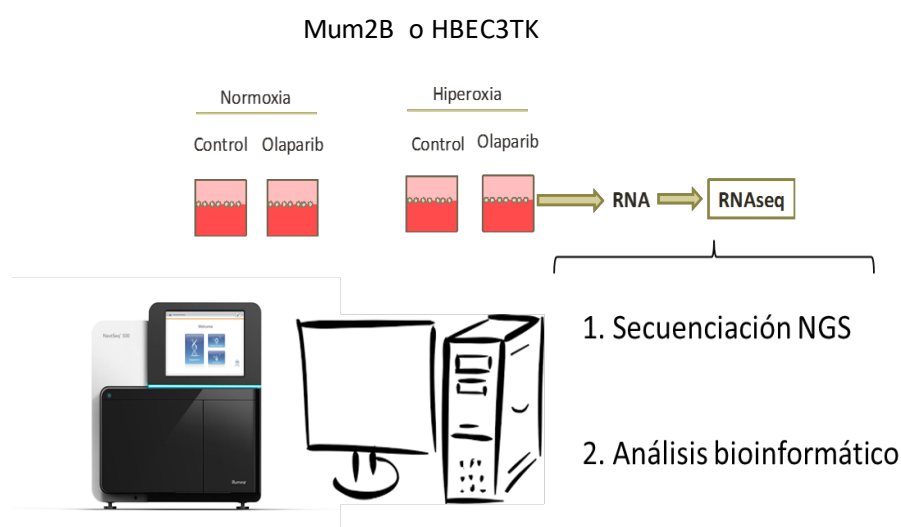


Figura 7. Esquema experimental de la obtención de RNA y posterior procesamiento para el análisis global de la expresión génica mediante estudio bioinformático en las condiciones indicadas en el esquema.

Posteriormente se realizó un análisis bioinformático de las secuencias y se establecieron diversas comparaciones entre los grupos.

Se realizó una primera comparación entre todas las muestras para analizar la calidad de los grupos o clusters, llamado clustering jerárquico, cuya finalidad es comprobar que los triplicados pertenecientes a una misma muestra clusterizan entre si, es decir que cada uno de los triplicados de cada grupo se parecen mas entre si (hay menos distancia), que al resto de las muestras (Figura 8).

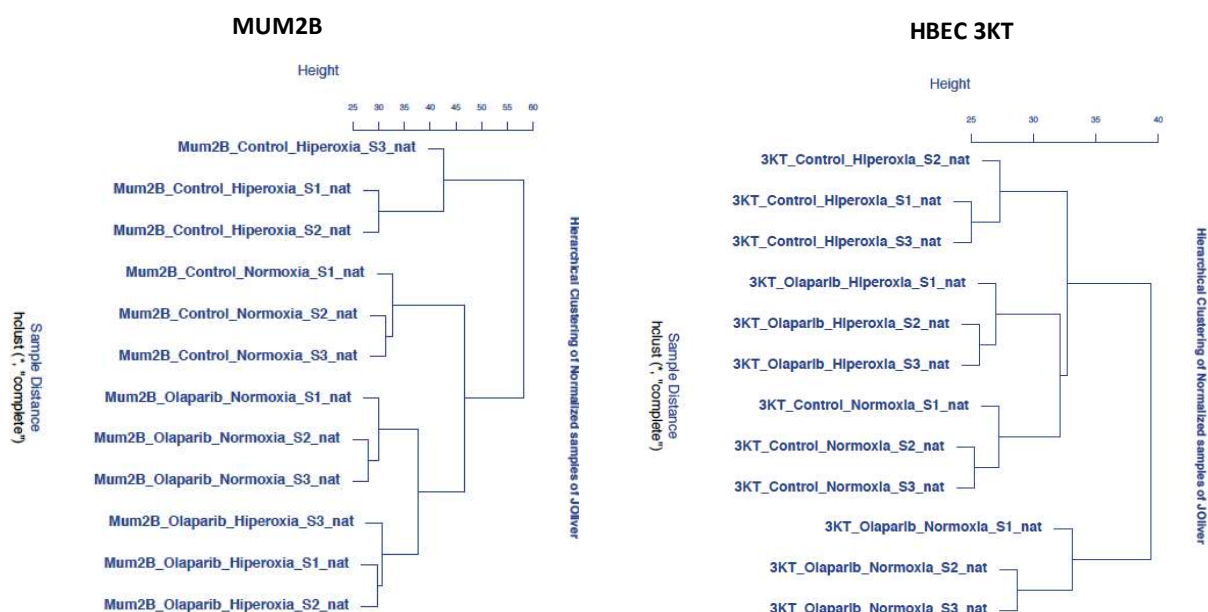


Figura 8. Clustering jerárquico de las muestras normalizadas. Como se puede comprobar las muestras de cada triplicado se agrupan juntas. Existe menos distancia entre ellas, lo que indica que son mas parecidas entre si, como cabe esperar, lo que permite continuar con el análisis una vez comprobada la calidad.

A continuación de realizaron todas las posibles comparaciones entre grupos para ver cuales genes se inducían y cuales de reprimían en cada condición con respecto a la que se comparaba tanto en MUM2B como en HBEC3KT y debido a que estos análisis arrojan de media cientos si no miles de genes afectados, para simplificar la interpretación se analizaron cuales eran las funciones celulares mas afectadas.

A continuación se muestra para cada comparación una lista de los genes que mas se inducen (upregulated) en rojo, o se reprimen (downregulated) en verde. Un Volcano plot que muestra gráficamente este mismo análisis y un diagrama de barras de las funciones celulares mas afectadas.

2.1 Análisis RNAseq de las células Mum2B bajo las diferentes condiciones experimentales:

2.1.1 Normoxia versus Hiperoxia en células MUM2B: cuando comparamos la condición de Normoxia con la de Hiperoxia se detectan cambios de expresión en un total de 2762 genes, de los cuales 1267 se downregulan y 1495 upregulan (Figura 9). En cada lista se muestran los 20 genes mas afectados y otros 10 seleccionados en base a su posible interés. Aunque como se puede observar en el volcano plot hay muchos transcritos no asociados a genes, las funciones celulares que aparecen mas

afectadas son las reguladas por genes mitocondriales, traducción y algunos relacionados con sistema inmune , pero no especialmente afectados (Figura 10). Es interesante la afectación de la actividad mitocondrial, que tiene la lógica de que al haber mayor concentración de oxígeno se modifica la homeostasis metabólica como veremos después.

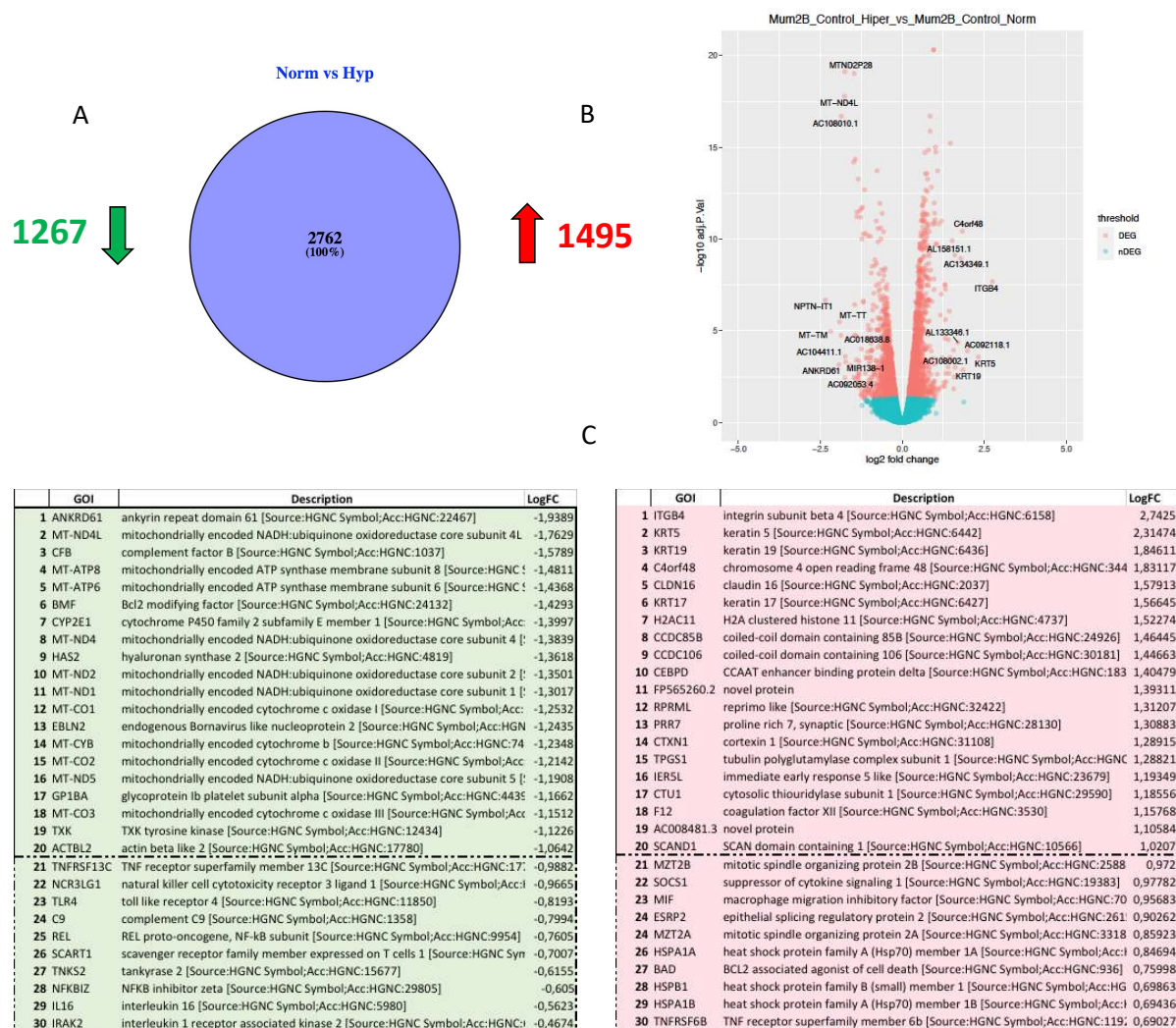


Figura 9. Comparación entre las condiciones de Normoxia e Hiperoxia en células MUM2B. A. Diagrama de Venn mostrando el numero de genes cuya expresión cambia en Hiperoxia respecto a Normoxia. En verde el numero de genes que están downregulados y en rojo los Upregulados. B. Volcano plot con anotación de los transcritos mas afectados. C. Lista de los genes cuya expresión se ve más afectada, en verde los downregulados y el rojo los Upregulados.

MUM2B Norm vs. Hyp: Funciones celulares más afectadas

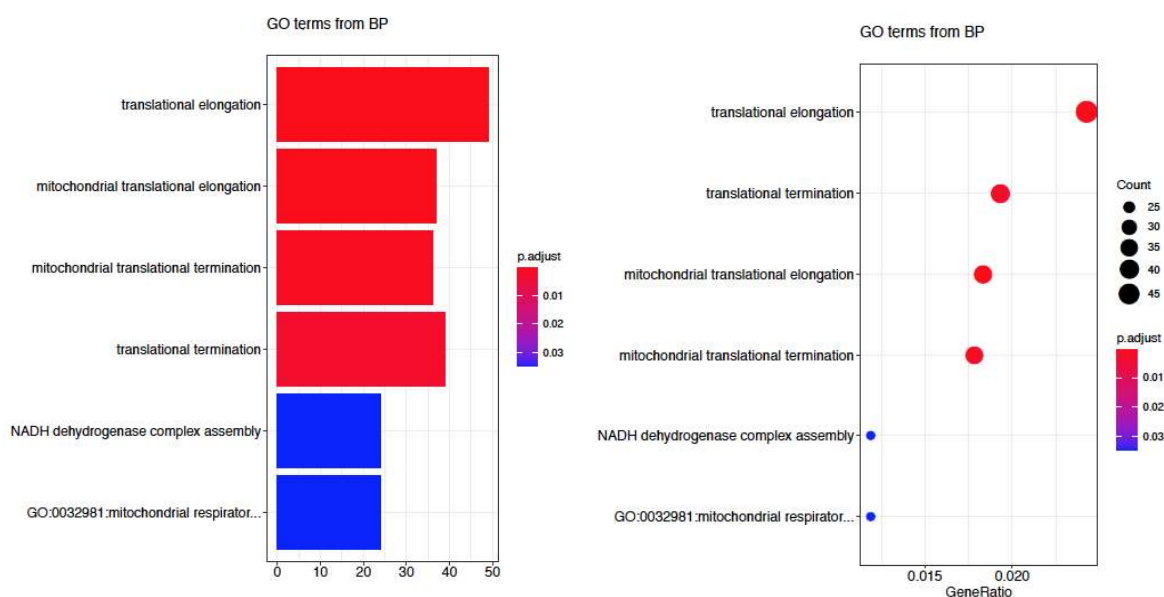


Figura10. Análisis de las funciones celulares más afectadas en hiperoxia con respecto a la condición de Normoxia en células MUM2B.

2.1.2 Hiperoxia versus Hiperoxia con Olaparib en células MUM2B: cuando comparamos la condición de Hiperoxia con la de Hiperoxia al incubar con Olaparib se detectan cambios de expresión en un total de 3268 genes, de los cuales 1560 se downregulan y 1708 upregulan (Figura 11). Las funciones más afectadas en este caso son las de división celular y genes mitocondriales (Figura 12). Aunque nuestra hipótesis de partida era que la hiperoxia aumentaría la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios y que el Olaparib nos ayudaría a controlar los mediadores inflamatorios, a cortos tiempos cortos de hiperoxia (4 horas), no vemos eso exactamente. Como hemos visto en el apartado anterior la hiperoxia a 4 horas no aumenta especialmente los mediadores inflamatorios, y lo que es más curioso es que el Olaparib, parece inducir típicos mediadores inflamatorios como IL1 β e IL1A. No obstante tambien induce inhibidores de la señalización de interferones que participan directamente en las vías de señalización de los mediadores inflamatorios como son la familia SOCS (*Suppressor of cytokine signaling*), concretamente SOCS 2 y 4, por lo que estos resultados parecen indicar la presencia de algún tipo de mecanismo de compensación, además de que abren la puerta para investigar los efectos de la hiperoxia utilizando tiempos de incubación mas largos, que por otro lado serían mas parecidos a la practica clínica.

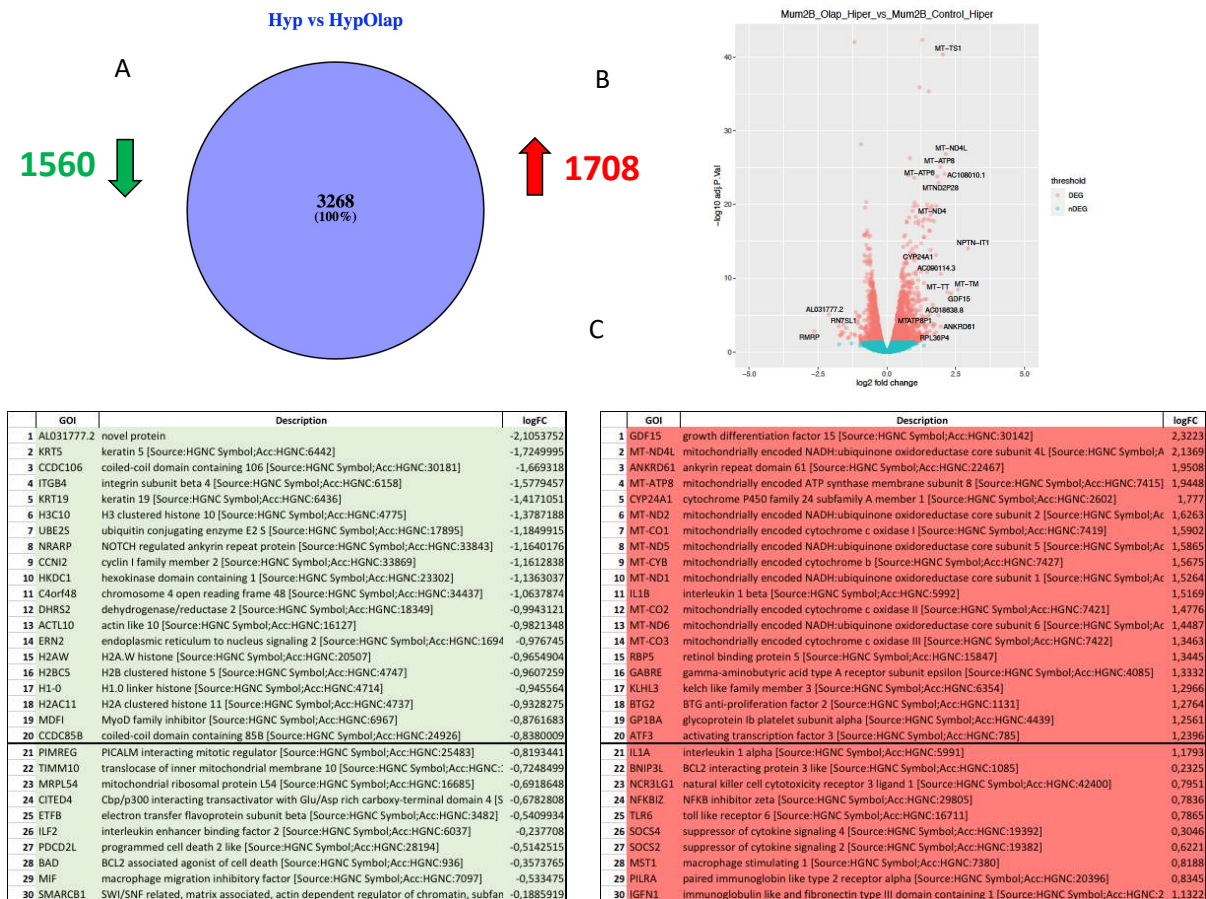


Figura 11. Comparación entre las condiciones de Hiperoxia e Hiperoxia con Olaparib en células MUM2B. A. Diagrama de Venn mostrando el número de genes cuya expresión cambia en Hiperoxia Olaparib con respecto a Hiperoxia. En verde el número de genes que están downregulados y en rojo los Upregulados. B. Volcano plot con anotación de los transcritos mas afectados. C. Lista de los genes cuya expresión se ve más afectada, en verde los downregulados y el rojo los Upregulados.

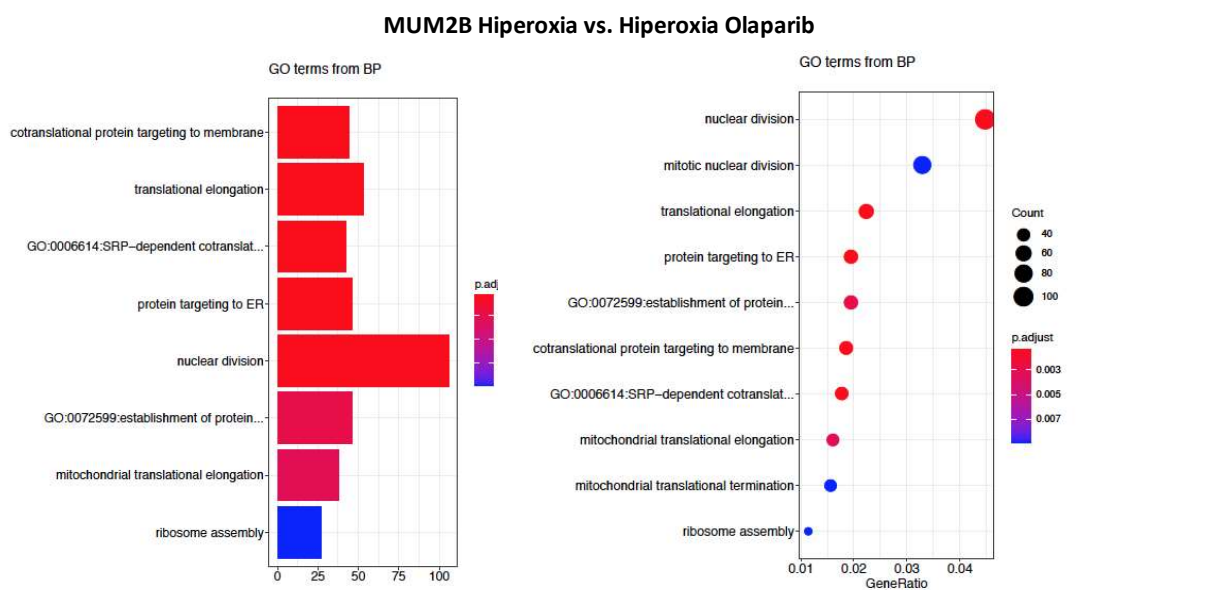


Figura 12. Análisis de las funciones celulares más afectadas en hiperoxia con Olaparib con respecto a la condición de Hiperoxia en células MUM2B.

2.1.3 Normoxia versus Normoxia con Olaparib en células MUM2B: cuando comparamos la condición de normoxia con la de normoxia con tratamiento de Olaparib se detectan cambios de expresión en un total de 1759 genes, de los cuales 678 se downregulan y 1081 upregulan (Figura 13). Las funciones más afectadas vuelven a ser las relacionadas con división celular y fisión de organelas y vuelven a aparecer algunas citoquinas inflamatorias como IL1B, inhibidores de NFKB, TLRs (toll like receptors) o serpinas entre otros (Figura 13 y 14).

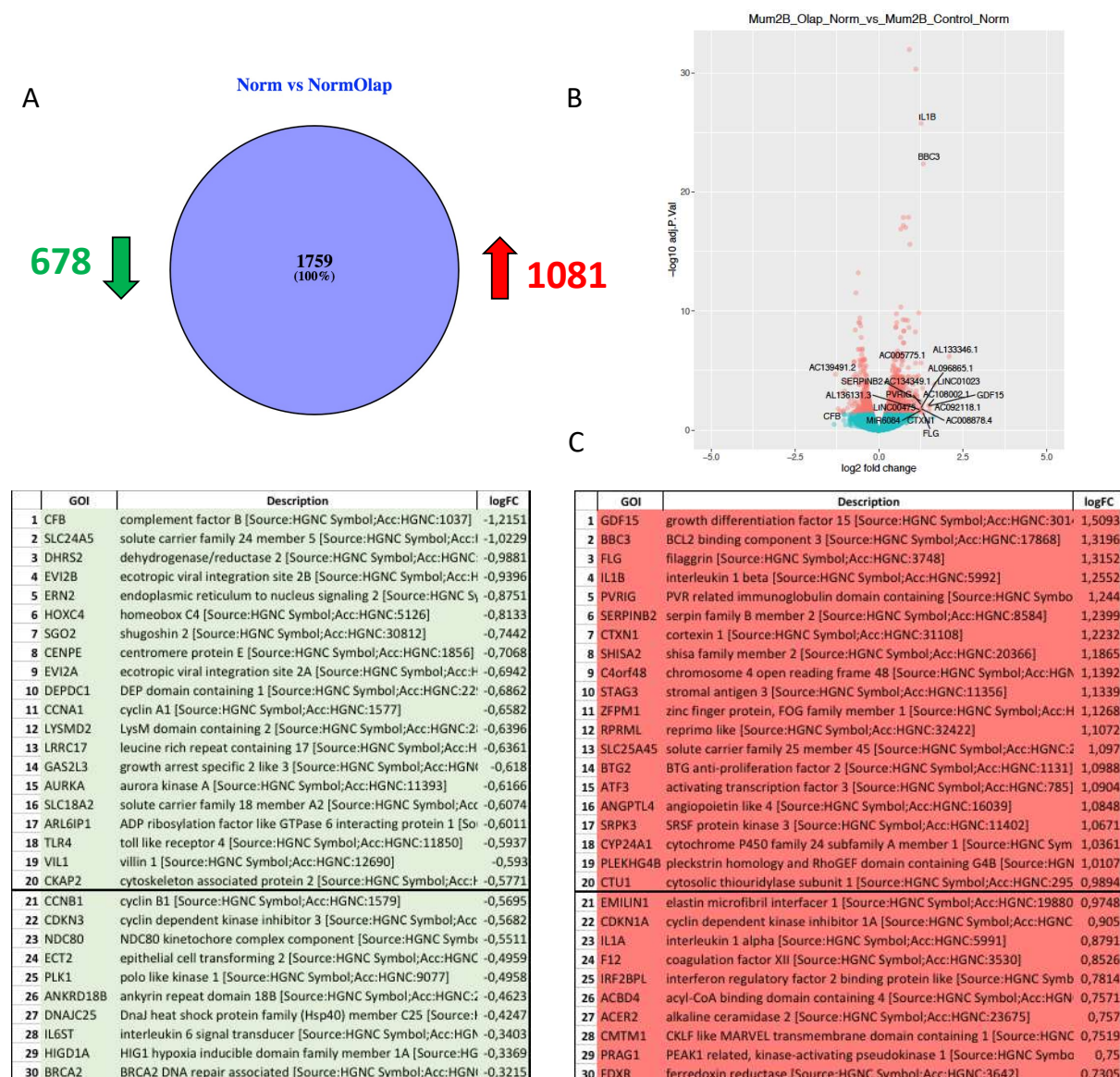


Figura 13. Comparación entre las condiciones de Normoxia y Normoxia con Olaparib en células MUM2B. A. Diagrama de Venn mostrando el numero de genes cuya expresión cambia en Hiperoxia Olaparib con respecto a Hiperoxia. B. Volcano plot con anotación de los transcritos mas afectados. C. Lista de los genes cuya expresión se ve más afectada, en verde los downregulados y el rojo los Upregulados.

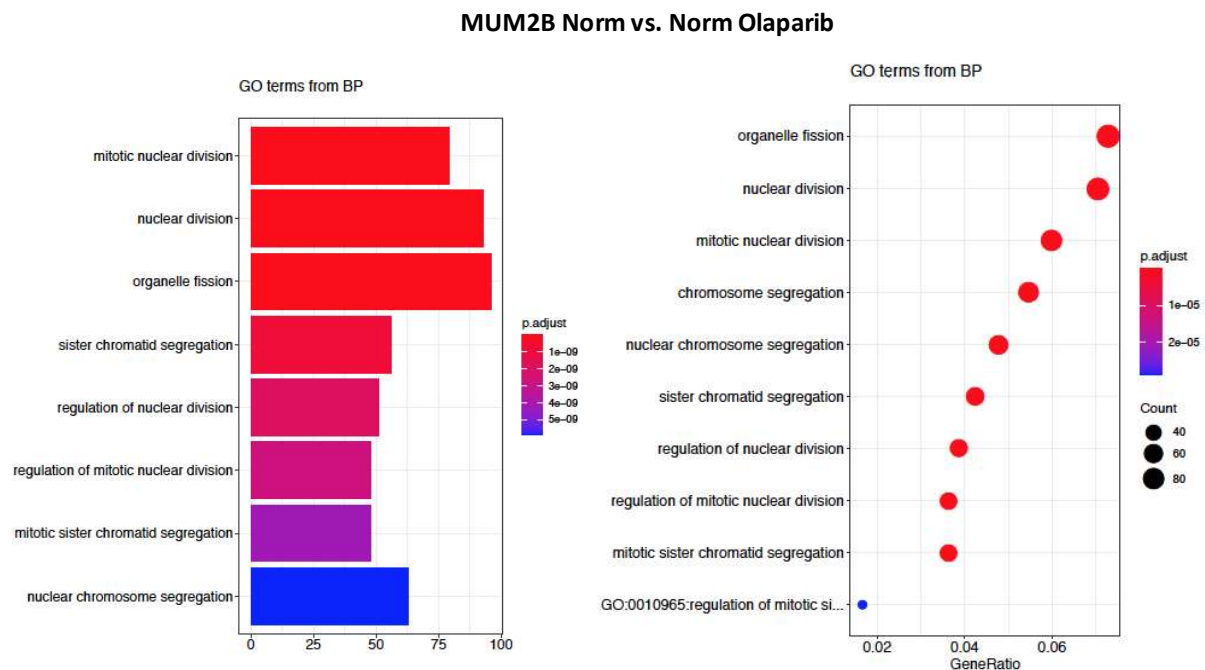


Figura 14. Análisis de las funciones celulares más afectadas en la condición de Normoxia con tratamiento de Olaparib con respecto a la condición de Normoxia en células MUM2B.

2.1.4 Normoxia versus Hiperoxia con Olaparib en células MUM2B: cuando comparamos la condición de normoxia con la de Hiperoxia con tratamiento de Olaparib se detectan cambios de expresión en bastantes menos genes que en los casos anteriores siendo un total de 695 genes, de los cuales 270 se downregulan y 425 upregulan (Figura 15).

Las funciones más afectadas en esta ocasión están relacionadas con la actividad de los microtúbulos, además de la actividad señalizadora de citoquinas mediada por ligandos y sus receptores. Se hace muy evidente tanto la activación de citoquinas proinflamatorias (IL1A y B) así como la de los genes represores de la señalización de citoquinas SOCS1 y 2 (Figura 15 y 16). No obstante parece que la activación de la actividad de citoquinas es moderada. Como se ha mencionado previamente estos resultados parecen indicar la aparición de mecanismos compensatorios que convendría investigar en profundidad en próximos estudios.

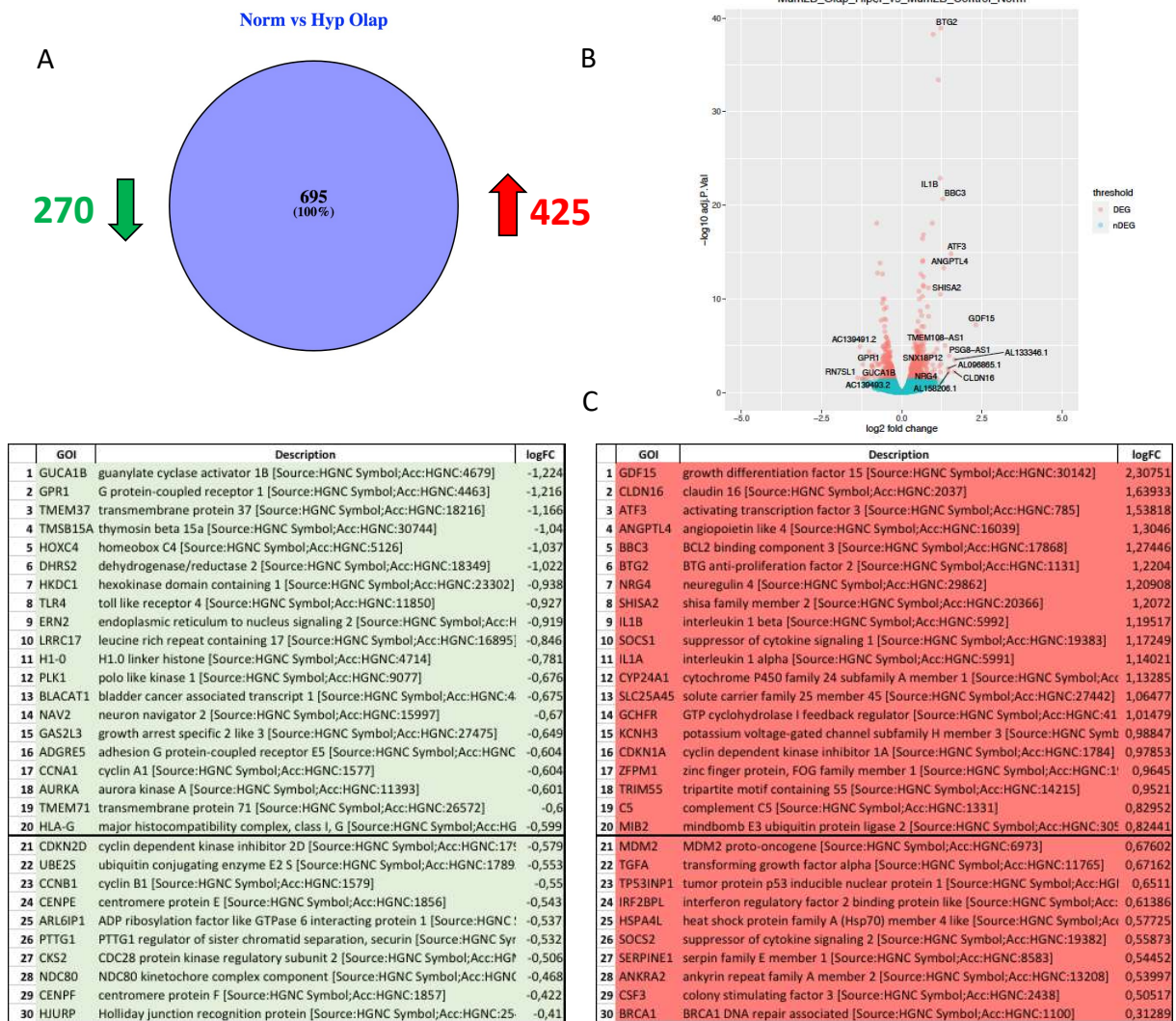


Figura 15. Comparación entre las condiciones de Normoxia e Hiperoxia con Olaparib en células MUM2B. A. Diagrama de Venn mostrando el número de genes cuya expresión cambia en Normoxia con respecto a Hiperoxia con Olaparib. B. Volcano plot con anotación de los transcritos mas afectados. C. Lista de los genes cuya expresión se ve más afectada, en verde los downregulados y el rojo los Upregulados.

MUM2B Norm vs. Hiperoxia Olaparib

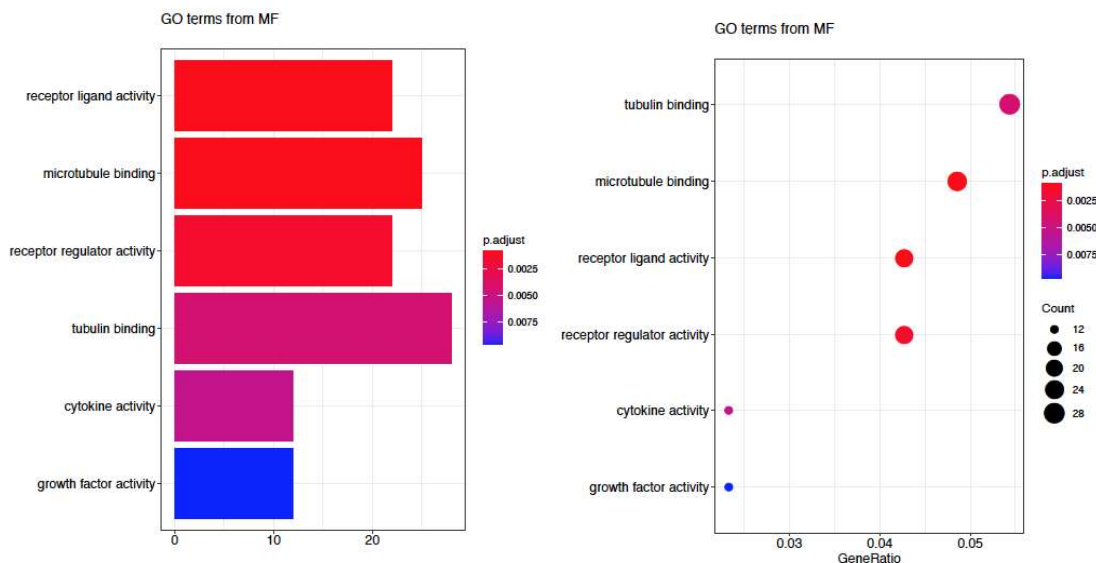


Figura 16. Análisis de las funciones celulares más afectadas en la condición de Normoxia con respecto a la condición de Hiperoxia con Olaparib en células MUM2B.

2.2 Análisis RNAseq de las células HBEC3KT bajo las diferentes condiciones experimentales:

2.2.1 Normoxia versus Hiperoxia en células HBEC3KT: Al realizar las mismas comparaciones en células sanas del epitelio pulmonar HBEC 3KT la situación cambia, ya que son muchos menos genes los que se ven afectados con respecto a las MUM2B, concretamente hay 109 genes que ven modificada su expresión en Hiperoxia con respecto a la condición de Normoxia, 37 downregulados y 72 upregulados (Figura 17). Estos resultados sugieren que estas células sanas son mucho menos reactivas a la alta concentración de oxígeno que las tumorales. Tan escaso es el número de genes que se modifican que el programa no permite analizar cuales son las actividades celulares mas afectadas de manera significativa, aunque en general vemos menor afectación de los genes mitocondriales.



Figura 17. Comparación entre las condiciones de Normoxia e Hiperoxia en células HBEC 3KT. A. Diagrama de Venn mostrando el número de genes cuya expresión cambia en Hiperoxia con respecto a Normoxia. B. Volcano plot con anotación de los transcritos mas afectados. C. Lista de los genes cuya expresión se ve más afectada, en verde los downregulados y el rojo los Upregulados.

2.2.2 Normoxia versus Normoxia Olaparib en células HBEC3KT:

En este caso el número de genes que cambian su expresión es de 344 en total. Siempre mas bajo que en el caso de las MUM2B lo que parece confirmar la menor reactividad de estas células tanto a la Hiperoxia como al Olaparib. 188 genes se downregulan y 156 upregulan (Figura 18). Volvemos a encontrar algunos genes mediadores inflamatorios aunque no en los primeros puestos y las funciones mas afectadas aunque se observa de nuevo la división celular y fisión de organelas, aparece tambien como una de las funciones mas afectadas el desarrollo de piel y epidermis concretamente. Tambien se observa menos expresión de genes relacionados con citoquinas y actividad ligando/receptor (Figura 18 y 19).

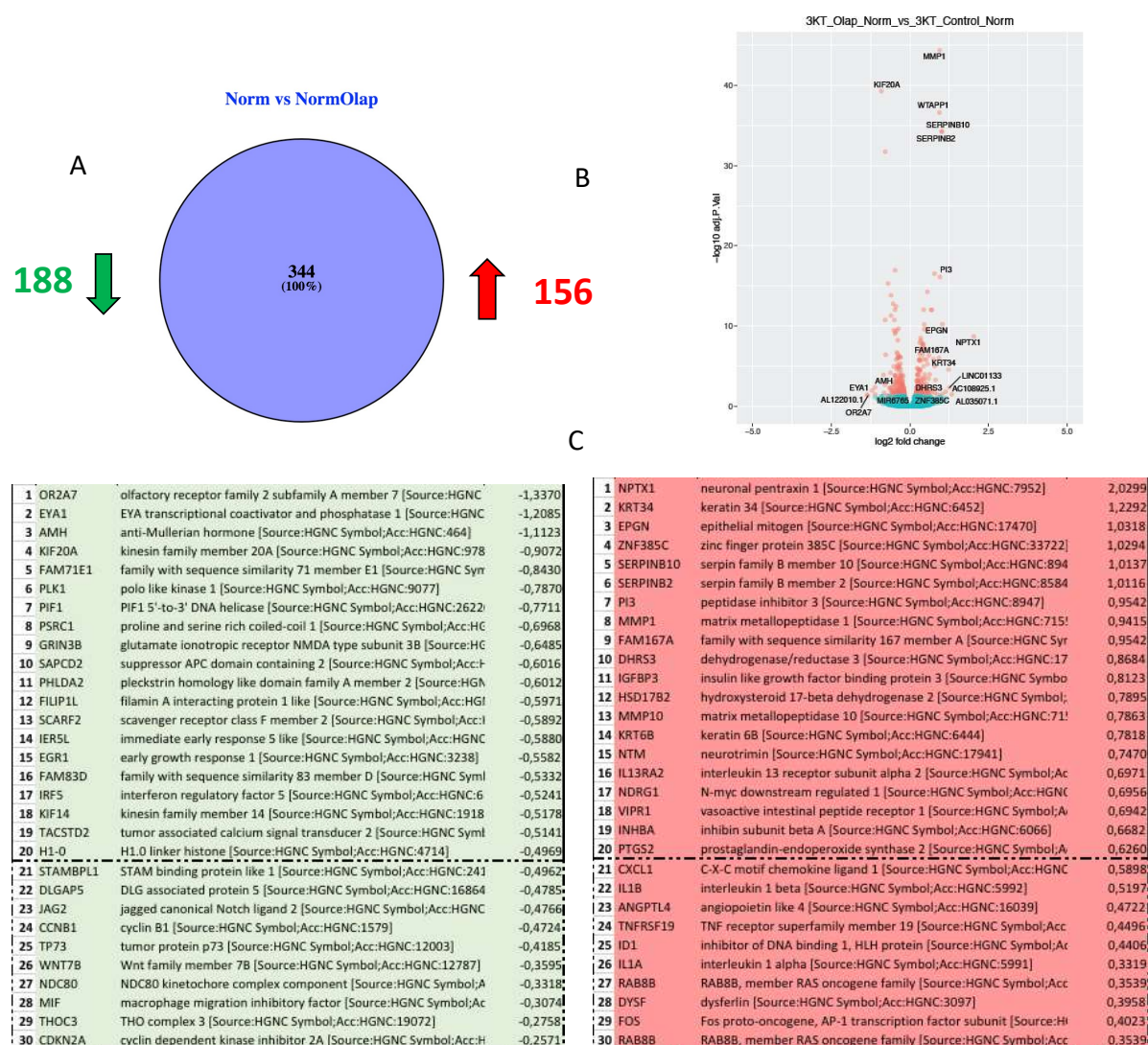


Figura 18. Comparación entre las condiciones de Normoxia y Normoxia Olaparib en células HBEC 3KT. A. Diagrama de Venn mostrando el numero de genes cuya expresión cambia en Normoxia Olaparib con respecto a Normoxia. B. Volcano plot con anotación de los transcritos mas afectados. C. Lista de los genes cuya expresión se ve más afectada, en verde los downregulados y el rojo los Upregulados.

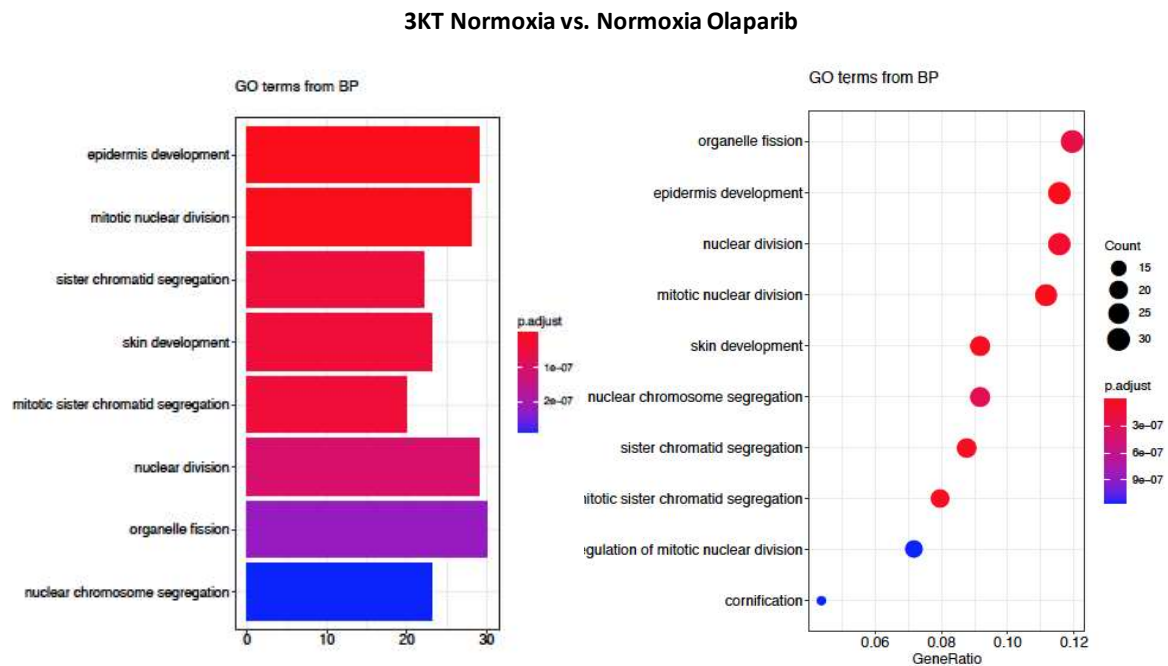


Figura 19. Análisis de las funciones celulares más afectadas en la condición de Normoxia Olaparib con respecto a la condición de Normoxia en células HBEC 3KT.

2.2.3 Hiperoxia versus Hiperoxia Olaparib en células HBEC3KT:

En este caso cambia la expresión de 304 genes, siendo 156 downregulados y 148 upregulados (Figura 20). En cuanto a las funciones la condición de hiperoxia olaparib parece tener un claro efecto en cuanto a la movilidad de los microtúbulos como ya se vio en el caso de MUM2B y en este caso parece downregularse la actividad ligando/receptor, o al menos su activación es moderada como en el caso de MUM2B y la actividad de los quimiorrepelentes si está claramente downregulada (Figura 20 y 21).

IL1B vuelve a aparecer aunque no en los primeros puestos, por lo que parece que el efecto en estas células es menor que en MUM2B, no obstante parece confirmarse un efecto del Olaparib en algunos mediadores proinflamatorios a tiempos cortos de hiperoxia (4 horas). Esto nos hace de nuevo la necesidad de analizar la situación a tiempos de hiperoxia mas largos, como por otro lado es mas parecido a lo que se daría en la practica clínica habitual.

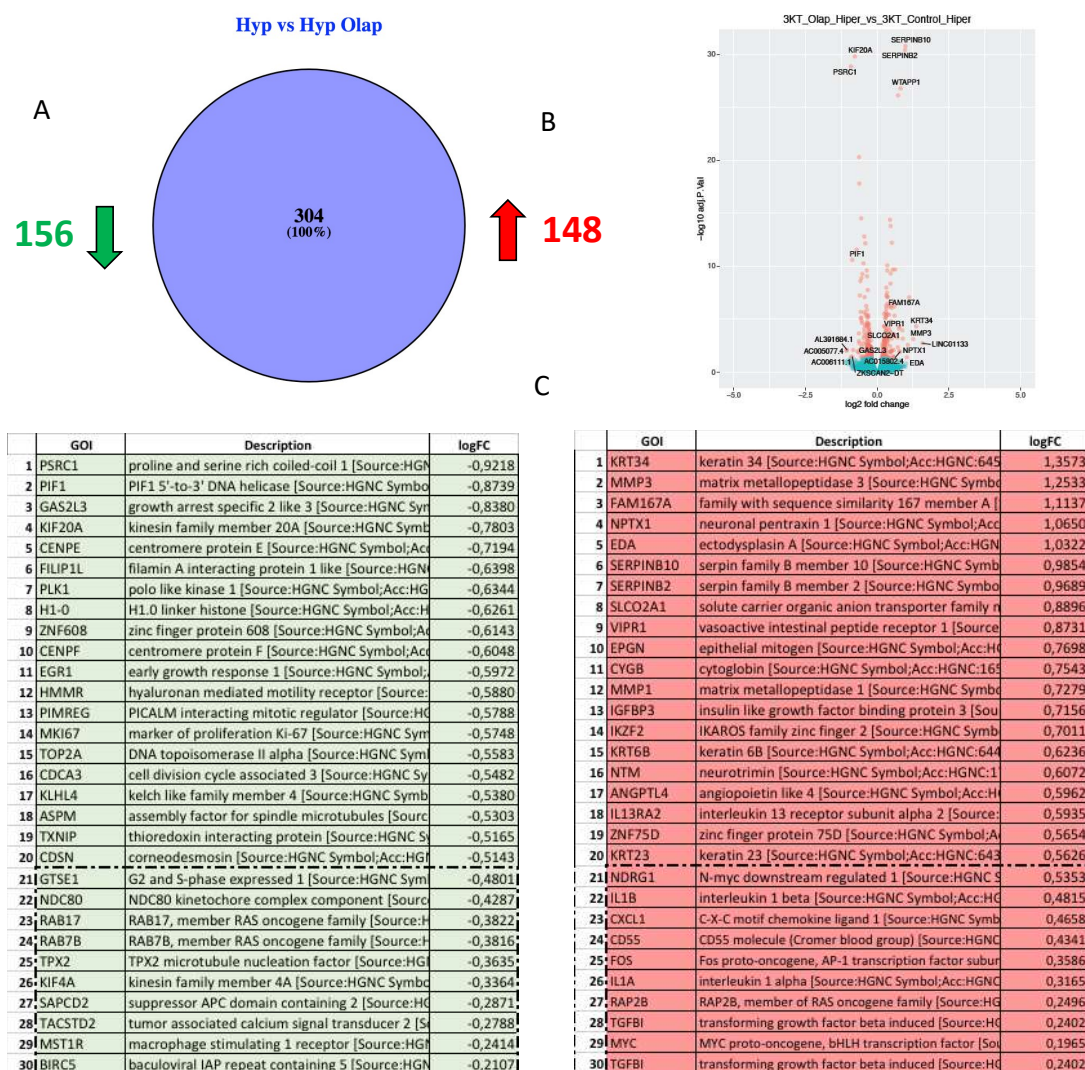


Figura 20. Comparación entre las condiciones de Hiperoxia e Hiperoxia Olaparib en células HBEC 3KT. A. Diagrama de Venn mostrando el número de genes cuya expresión cambia en Hiperoxia Olaparib con respecto a Hiperoxia. B. Volcano plot con anotación de los transcritos mas afectados. C. Lista de los genes cuya expresión se ve más afectada, en verde los downregulados y el rojo los Upregulados.

3KT Hiperoxia vs. Hiperoxia Olaparib

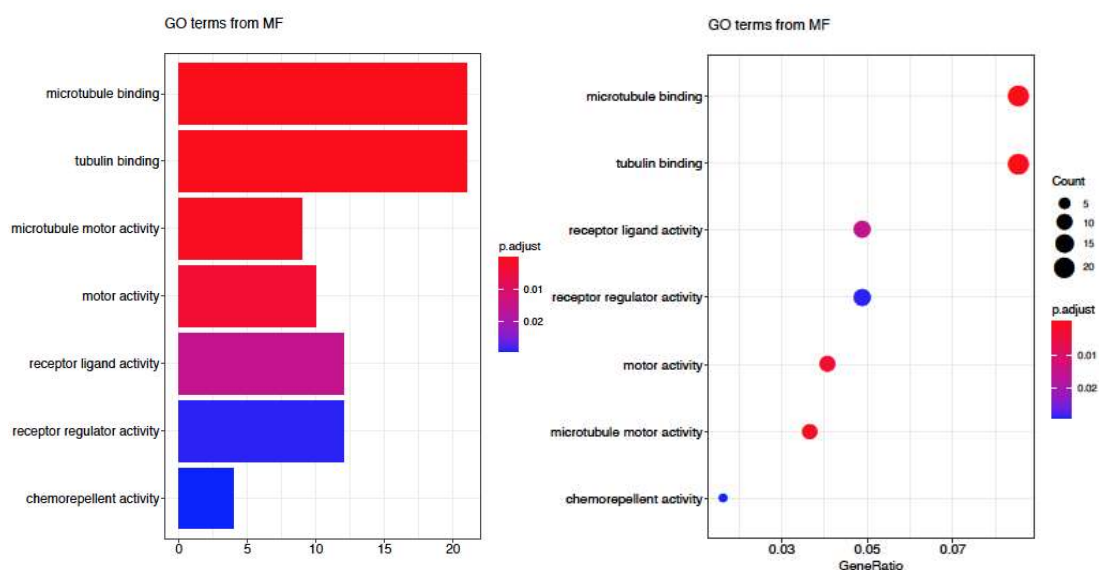


Figura 21. Análisis de las funciones celulares más afectadas en la condición de Hiperoxia Olaparib con respecto a la condición de Hiperoxia en células HBEC 3KT.

2.2.4 Normoxia versus Hiperoxia Olaparib en células HBEC3KT:

Por ultimo la comparación entre Normoxia e Hiperoxia Olaparib detecta cambios de expresión en 326 genes, de los cuales 152 downregulan y 174 upregulan (Figura 22).

La actividades afectadas son parecidas a las de MUM2B, tomando un fuerte protagonismo la actividad motora y de los microtúbulos (Figura 22 y 23).

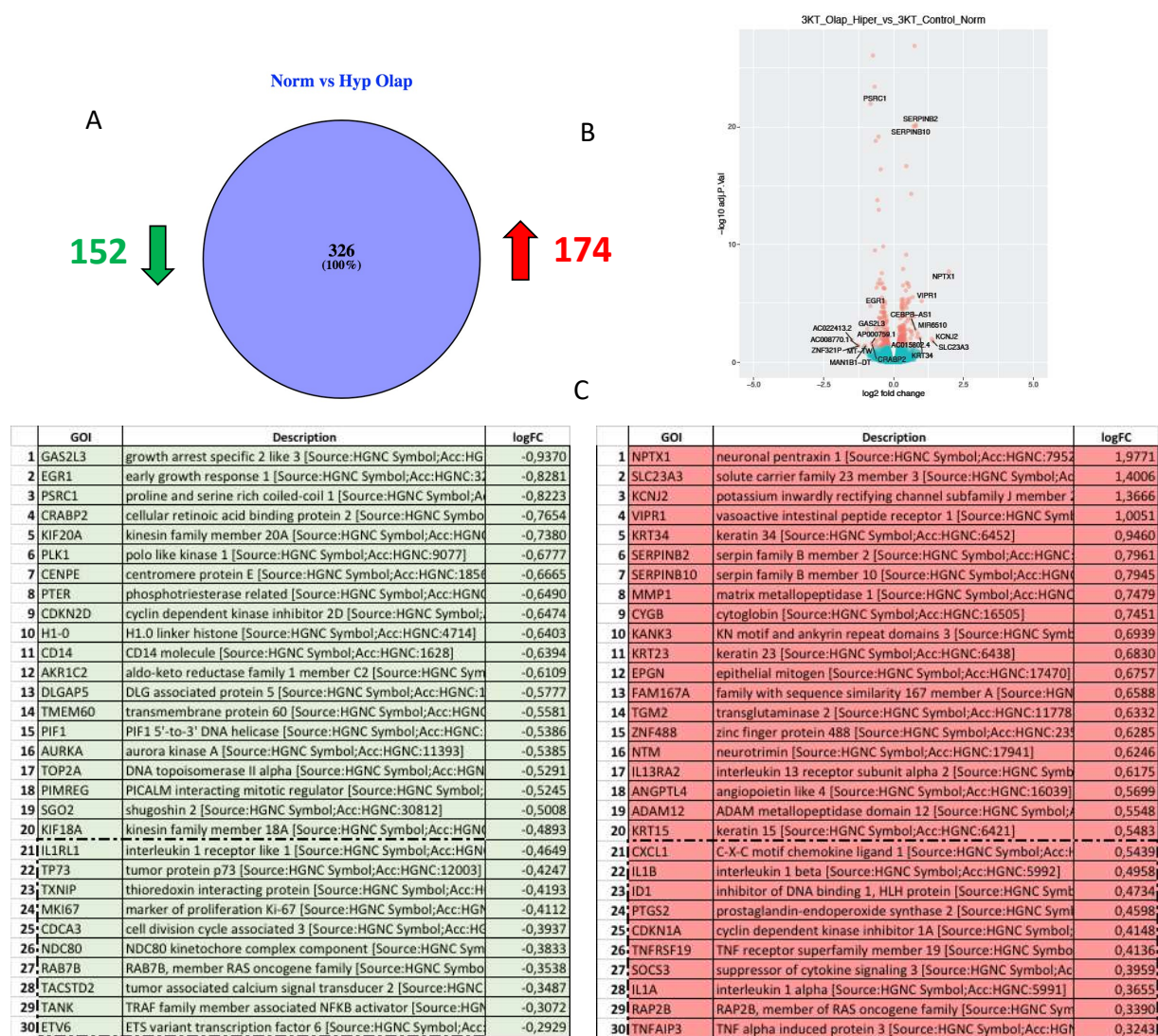


Figura 22. Comparación entre las condiciones de Normoxia e Hiperoxia Olaparib en células HBEC 3KT. A. Diagrama de Venn mostrando el numero de genes cuya expresión cambia en Hiperoxia Olaparib con respecto a Normoxia. B. Volcano plot con anotación de los transcritos mas afectados. C. Lista de los genes cuya expresión se ve más afectada, en verde los downregulados y el rojo los Upregulados.

3KT Normoxia vs. Hiperoxia Olaparib

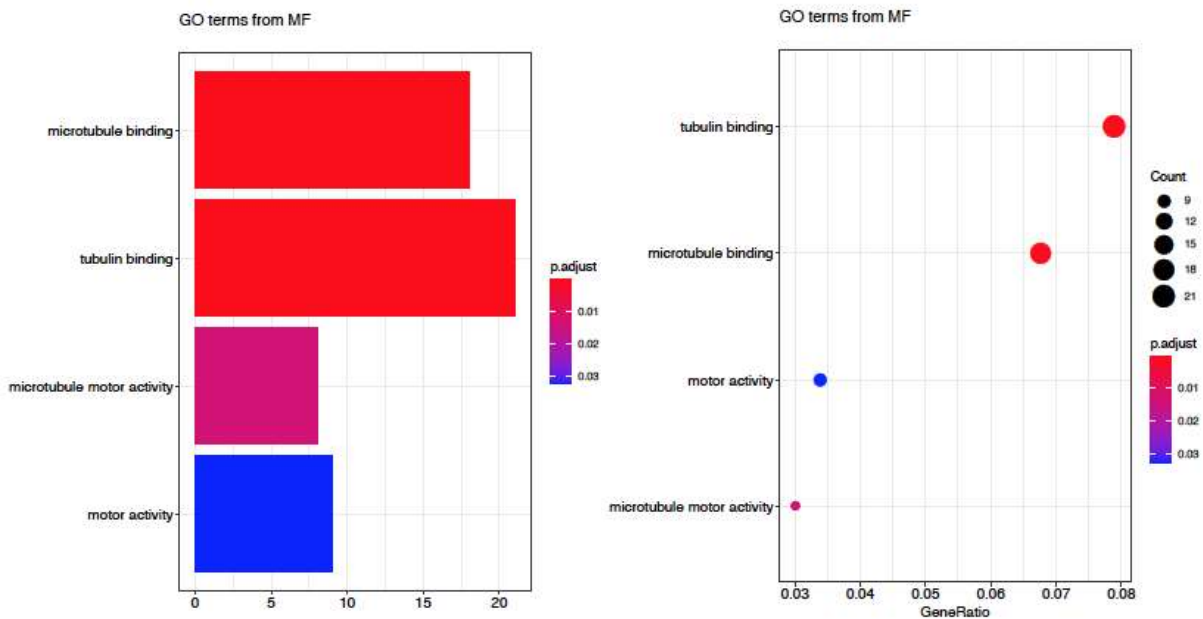


Figura 23. Análisis de las funciones celulares más afectadas en la condición de Hiperoxia Olaparib con respecto a la condición de Normoxia en células HBEC 3KT

Como reflexión para cerrar este bloque, quisiéramos poner de manifiesto que aunque nuestra hipótesis de partida era que la hiperoxia iba a producir altos niveles de mediadores proinflamatorios y el Olaparib iba a ayudar a compensar esta situación. No hemos observado una alta expresión de mediadores inflamatorios en hiperoxia a tiempos cortos, sin embargo el olaparib si parece inducir algunos mediadores inflamatorios a tiempos cortos como el IL1B e IL1A. No obstante, la situación es bastante mas compleja porque al tiempo que se inducen estos mediadores inflamatorios, tambien lo hacen algunos inhibidores de la señalización de interferones que afectan a funciones inmunológicas como la inflamación, como genes de la familia SOCS (Supressor of Citokyne Signaling), inhibidores de NFkB, serpinas (Inhibidores de proteasas con papel en múltiples procesos, entre ellos inmune, Heat Shock Proteins (respuesta a stress) o TLRs, factores de complemento, etc..

Esto nos indica que debemos seguir investigando en esta vía ya iniciada, por un lado analizando que ocurre a tiempos de hiperoxia mas largos y por otro analizando todas estas cascadas de señalización en un futuro próximo.

Tarea 3. Niveles de mediadores inflamatorios en células tumorales MUM2B y células sanas del epitelio pulmonar HBEC 3KT:

Como ya se describió en informes previos el aumento de la concentración de oxígeno puede aumentar los niveles de ROS, lo que está directamente relacionado con una activación de la respuesta inflamatoria. Para comprobar el efecto anti-inflamatorio de la inhibición de PARP en condiciones de hiperoxia se determinaron los niveles de mediadores inflamatorios (IL1beta, IL6, IL8, TNF α ..etc) tanto en células inmortalizadas sanas de epitelio pulmonar HBEC3KT, como en las líneas tumorales sometidas a hiperoxia en presencia o ausencia de los inhibidores de PARP.

De manera previa a las técnicas inmunológicas, decidimos analizar los perfiles transcripcionales de los mediadores inflamatorios mediante qPCR usando sondas Taqman. Se incluyeron además otros genes de importancia en inmunoterapia como CTLA4 o PD-L1, cuya expresión había sido descrita previamente en células de melanoma, aunque nosotros hemos encontrado muy baja expresión de estos genes en nuestro modelo y por tanto solo se muestran en esta sección los resultados de los principales mediadores proinflamatorios a tiempos cortos de hiperoxia (4 horas) con las mismas condiciones de inducción química de hipoxia y olaparib previamente ensayados en las secciones anteriores (Figura 24).

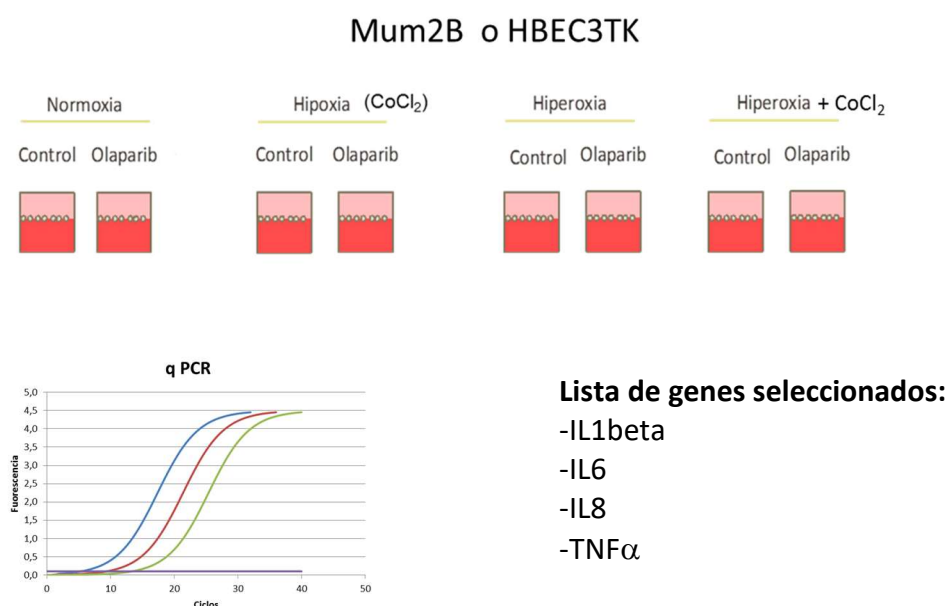


Figura 24. Esquema experimental del análisis transcripcional mediante qPCR de los genes y condiciones experimentales de interés. Se incluyen únicamente los genes en los que hemos podido detectar niveles apreciables de expresión en nuestro modelo.

Una vez analizados los perfiles transcripcionales, está previsto un análisis más detallado de las condiciones mas interesantes mediante métodos inmunológicos (ELISA).

3.1 TNF α : Es un mediador pro-inflamatorio de primera línea (fase aguda), producido principalmente por macrófagos (y otros tipos celulares). Su acción pro-inflatoria es conjunta con IL-1, IL-6. A nivel tisular produce la remodelación y recuperación de los tejidos. Activa genes NF- κ B dependientes. Tiene dos formas una de membrana y otra soluble. Produce fiebre e inhibición del apetito vía hipotálamo. En el hígado: estimula la respuesta de fase aguda. En nuestro modelo, a las 4 horas aunque hemos observado cierta variabilidad entre replicas biológicas, en general detectamos ciertos beneficios de la condición que combina la Hiperoxia con Olaparib sobre todo en células HBEC 3KT lo que es interesante para un posible uso terapéutico ya que disminuirían sus efectos pro-inflamatorios (Figura 25).

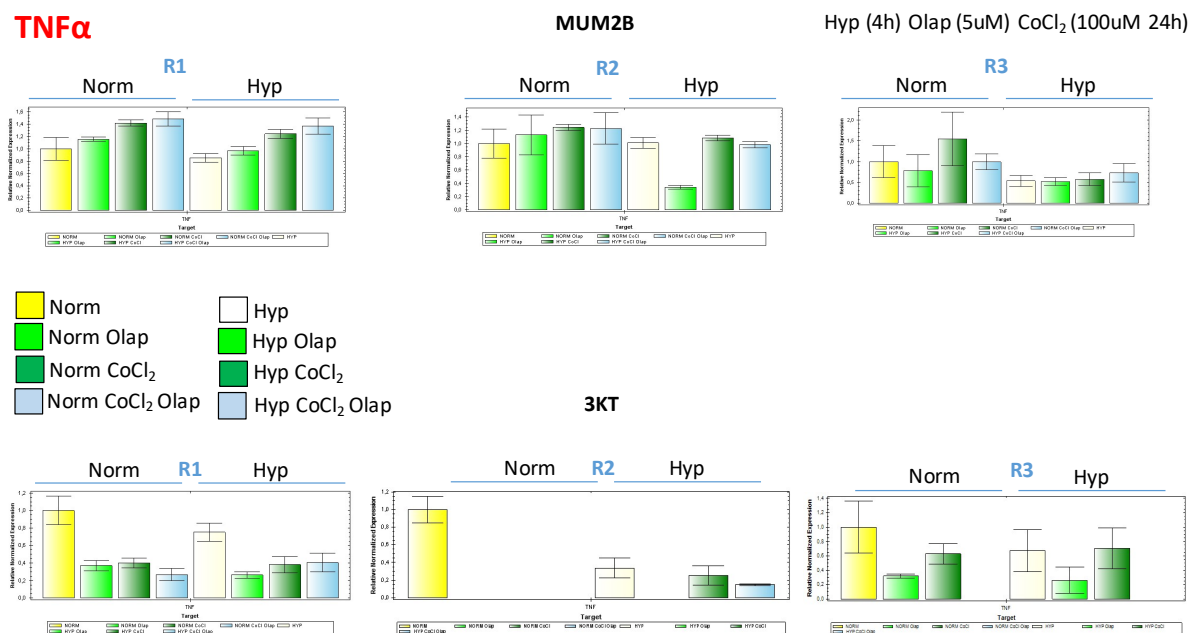


Figura 25. Análisis de los niveles transcripcionales de TNF α en células MUM2B (arriba) y 3KT (paneles de abajo). Se muestran los resultados correspondientes a 3 replicas biológicas. Aunque observamos cierta variabilidad las condiciones de hiperoxia y concretamente hiperoxia con olaparib disminuyen los niveles de expresión de TNF α .

3.2 IL1 β : Tiene una acción pro-inflamatoria, producto de la liberación de histamina por mastocitos causando vasodilatación y los signos de inflamación localizada. Actividad similar a TNF α (1^{as} fases de inflamación). Actividad quimotáctica sobre los granulocitos. Pirógeno causando fiebre por liberación de prostaglandinas. Junto con IL-6 y TNF α causa elevación de las proteínas hepáticas de fase aguda (por ej., fibrinógeno y proteína C reactiva). Producida por monocitos y macrófagos y las células endoteliales. Se presenta en dos formas, denominadas IL-1 α e IL-1 β .

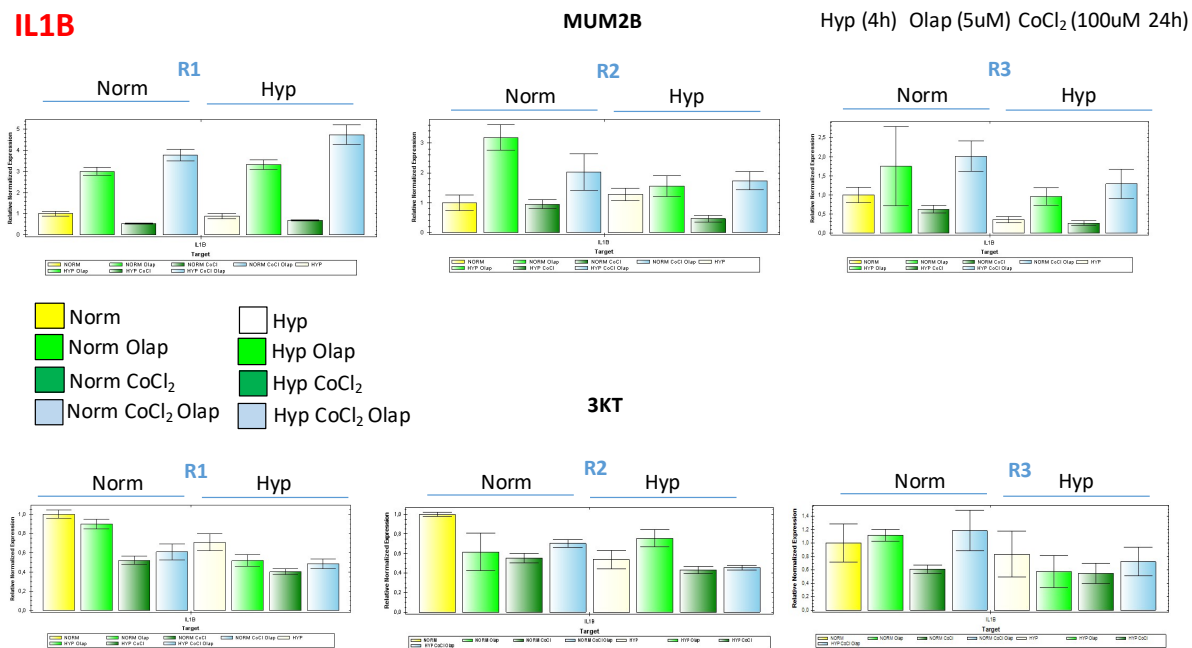


Figura 26. Análisis de los niveles transcripcionales de IL1 β en células MUM2B (arriba) y 3KT (paneles de abajo). Se muestran los resultados correspondientes a 3 replicas biológicas. Los resultados de qPCR parecen confirmar los resultados del RNAseq que revelan un aumento de los niveles transcripcionales de IL1 β en la condición de olaparib y a tiempos de hiperoxia cortos (4 horas).

En nuestro modelo, aunque la condición de hiperoxia disminuye la expresión, hemos detectado un aumento de IL-1 β en la condiciones con Olaparib y a tiempos cortos de hiperoxia especialmente en células MUM2B lo que confirma los resultados previamente observados en los ensayos de RNA Seq (Figura 26). Estos experimentos nos llevan a pensar como ya hemos dicho que deberíamos analizar tambien tiempos más largos de hiperoxia.

3.3 IL-6: Es secretada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a $TNF\alpha$. Es un pirógeno. Interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa a los linfocitos T citotóxico mediante diferenciación de Th17 (IL-17), modula la hematopoyesis y es la responsable, junto con la IL-1, de la síntesis de proteínas de fase aguda hepática, en especial fibrinógeno.

En nuestro modelo aunque volvemos a observar cierta variabilidad entre replicas la tendencia general que IL6 se expresa menos en las condiciones de hiperoxia y aunque el olaparib parece ofrecer cierto beneficio aunque moderado especialmente en células 3KT (Figura 27).

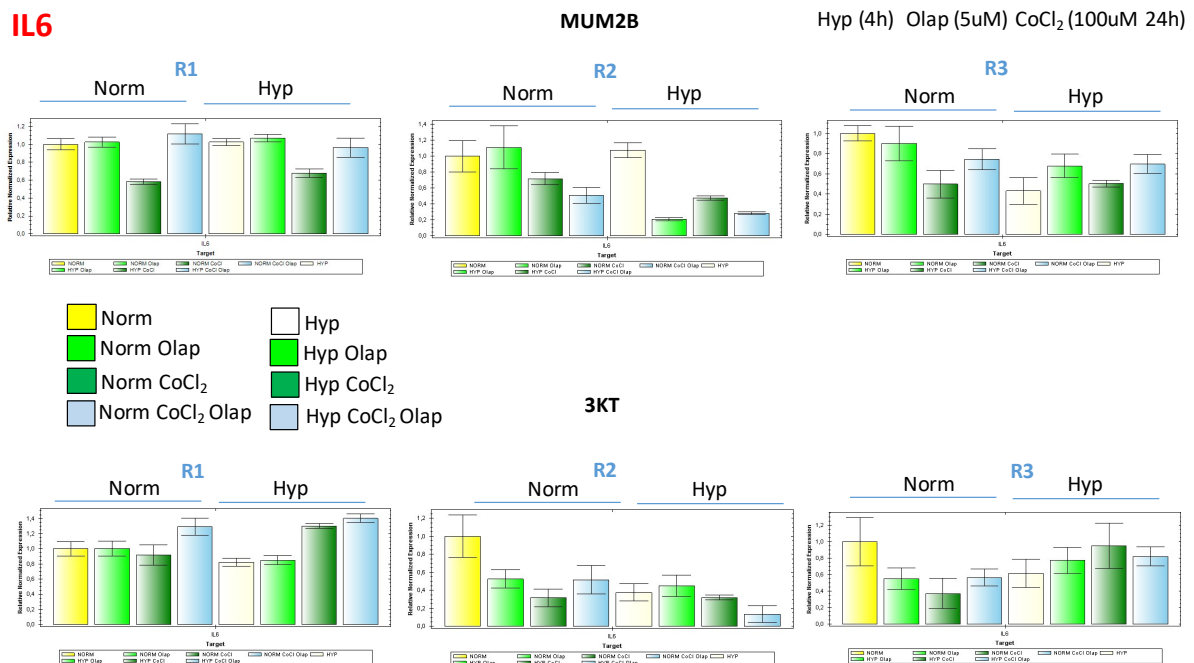


Figura 27. Análisis de los niveles transcripcionales de IL6 en células MUM2B (arriba) y 3KT (paneles de abajo). Se muestran los resultados correspondientes a 3 replicas biológicas. Aunque con cierta variabilidad la tendencia general es una disminución de la expresión de IL6 en las condiciones de hiperoxia, con cierto beneficio del uso de Olaparib.

3.3 IL-8: es conocido como factor quimiotáctico de neutrófilos. Tiene 2 funciones principales: Induce la quimiotaxis principalmente de neutrófilos pero también de otros granulocitos. IL-8 también estimula la fagocitosis y se sabe que IL-8 es un potente promotor de la angiogénesis. En las células diana, la IL-8 induce una serie de respuestas fisiológicas necesarias para la migración y la fagocitosis.

En nuestro caso, llama la atención un aumento de expresión de IL-8 sobre todo en MUM2B cuando se combinan todos los tratamientos (Barras azul claro. Figura 28). Como en el caso anterior los tratamientos con hiperoxia, sobre todo en 3KT parecen disminuir la expresión de IL8 y el olaparib parece tener un moderado beneficio.

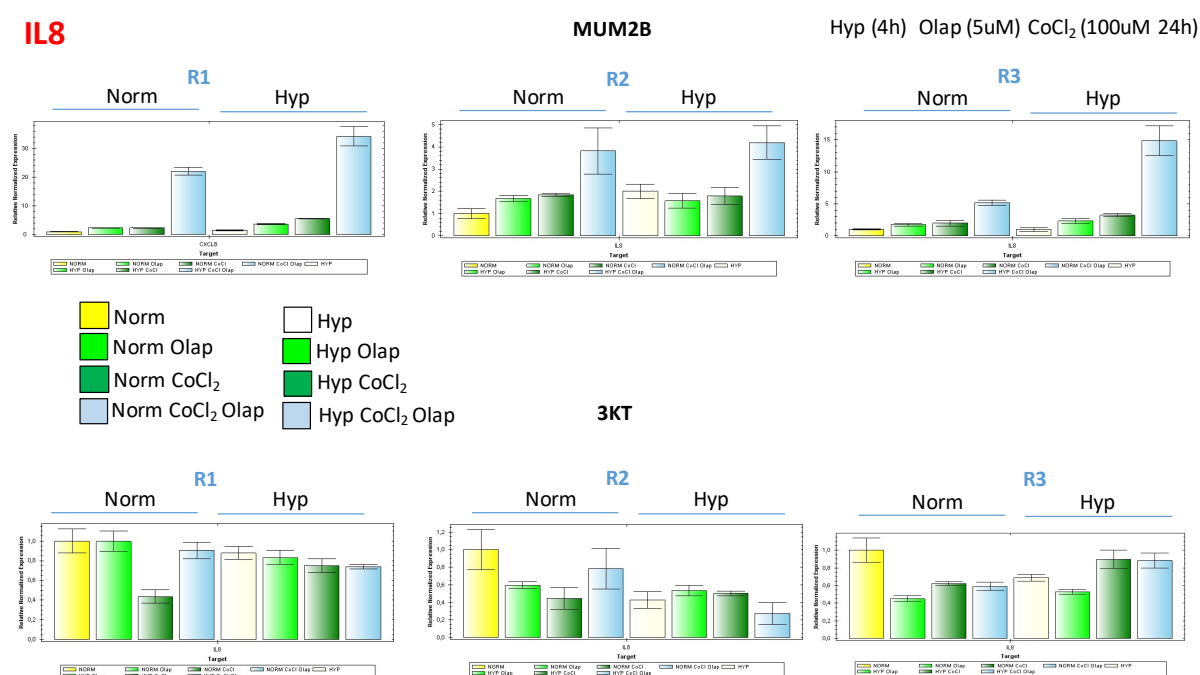


Figura 28. Análisis de los niveles transcripcionales de IL8 en células MUM2B (arriba) y 3KT (paneles de abajo). Se muestran los resultados correspondientes a 3 replicas biológicas. Es notorio el aumento de expresión de IL8 en MUM2B cuando se combinan los tratamientos (barras azul claro). En general se obtiene una disminución de la expresión de IL8 en los tratamientos con hiperoxia, y ofreciendo el olaparib un beneficio moderado.

Para terminar esta sección, habría que decir que tambien hemos analizado los niveles transcripcionales del Interferon gamma y de los inmunocheckpoints CTLA4 y PD-L1, aunque lo niveles de expresión han sido indetectables en este modelo experimental.

Análisis de expresión de mediadores pro-inflamatorios a las 24 y 72 horas de hiperoxia:

Como ya expusimos en la memoria anterior, nos sorprendió desde el principio no ver un mayor efecto de la hiperoxia sobre los mediadores inflamatorios tanto en el análisis por qPCR como en el ARN Seq con tiempos cortos de hiperoxia (4 horas) y decidimos hacer una prueba aumentando los tiempos de hiperoxia a 72 horas, lo que nos obligaba a disminuir la concentración de Olaparib a 1uM para reducir la mortalidad de las células asociado a este largo plazo.

Los resultados preliminares apoyaron nuestra hipótesis lográndose un aumento de los niveles de los pro-inflamatorios analizados a las 24 horas y 72 horas de hiperoxia además de un beneficio claro del uso del Olaparib como pudimos observar en los análisis mediante qPCR (datos no mostrados).

Estos resultados abren la puerta a la realización de los ensayos usando periodos de hiperoxia mayores, que por otro lado aunque son algo más complicados de mantener en cultivos celulares son más parecidos a las condiciones clínicas.

En el momento de la redacción de esta memoria, se estaban realizando replicas biológicas adicionales para corroborar nuestras observaciones iniciales.

Tareas 4 y 5. Oximetría mitocondrial durante hiperoxia/inhibición de PARP y Metabolismo glucolítico en hiperoxia/inhibición de PARP.

Finalmente para esta tarea hemos usado los kits colorimétricos de Abcam lo que nos ha permitido obtener algunos de los resultados más interesantes derivados del presente proyecto.

Tarea 4. Oximetría mitocondrial o medición del consumo de oxígeno.

Para esta tarea usamos un Kit de consumo de Oxígeno extracelular de Abcam ab197243 (Extracellular Oxygen Consumption Assay ,ab197243). La tasa de consumo de oxígeno es una medida de la tasa de respiración celular y de la función mitocondrial. El kit de ensayo de consumo de oxígeno extracelular es un ensayo de lectura de placas de fluorescencia de 96 pocillos para el análisis cinético en tiempo real de las tasas de consumo de oxígeno extracelular (OCR).

El compuesto fluorescente utilizado en este kit de ensayo se apaga con el oxígeno. Este colorante se excita a 360-380 nm (máximo 380) y emite a 630-680 nm (máximo 650).

En el ensayo, se agrega una capa de aceite en la parte superior del medio de ensayo para limitar la difusión de oxígeno al medio de ensayo. A medida que la respiración mitocondrial agota el oxígeno dentro del medio de ensayo, se reduce el apagamiento del tinte fluorescente y la señal de fluorescencia aumenta proporcionalmente. Se utiliza Antimicina A como control negativo y la glucosa oxidasa (GOx) como control positivo.

Se muestran a continuación los resultados obtenidos para el consumo de oxígeno tanto en células MUM2B como en 3KT (Figura 29) bajo las siguientes condiciones: Normoxia, Normoxia con Olaparib, Hiperoxia e Hiperoxia con Olaparib. En general observamos un aumento del consumo de oxígeno en hiperoxia en ambos tipos celulares, lo que tiene bastante lógica. A mayor concentración de Oxígeno, mayor consumo para la generación de energía en la mitocondria. Lo mas interesante es que el Olaparib logra reducir este consumo de manera diferencial en células sanas HBEC 3KT lo que tiene implicaciones terapéuticas.

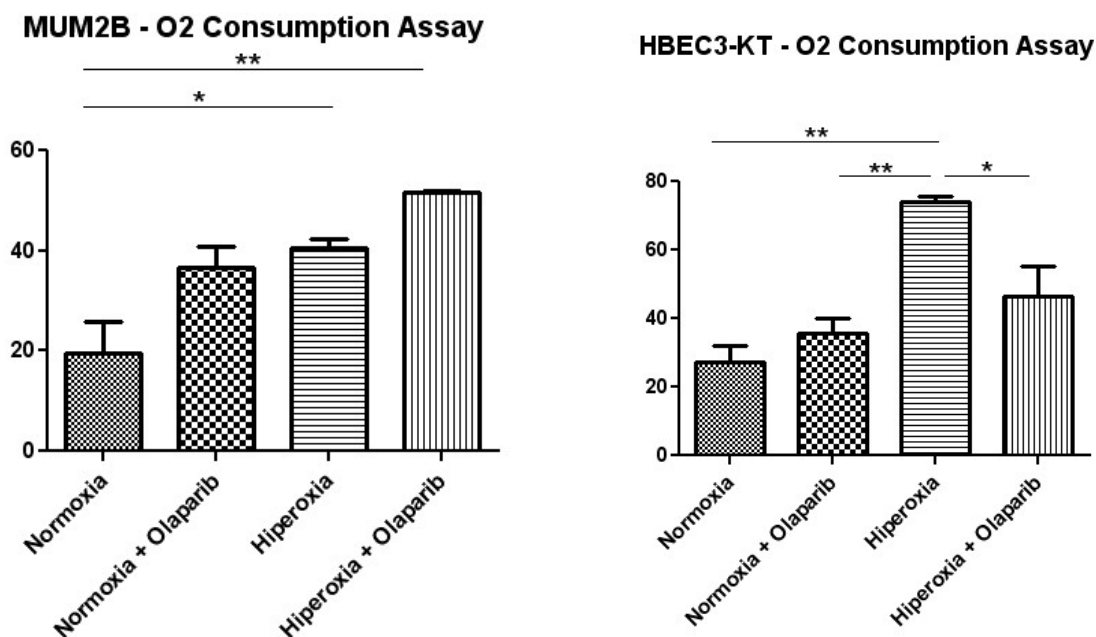


Figura 29. Análisis del consumo de oxígeno usando el kit *Extracellular Oxygen Consumption Assay* de Abcam en células MUM2B (gráfica superior) y en HBEC3KT (gráfica inferior). Como puede observarse se produce un aumento del consumo de oxígeno en hiperoxia, que es compensado mas eficazmente por el olaparib en células HBEC 3KT y esa diferencia de comportamiento puede ser importante para aproximaciones terapéuticas.

Una vez que hemos optimizado las condiciones de este ensayo, también se incluirán condiciones de hipoxia inducida químicamente para ver si se logra invertir la situación del consumo de oxígeno descrita.

Tarea 5. Análisis del Metabolismo glucolítico en hiperoxia/inhibición de PARP.

Una de las adaptaciones más importantes de los tumores para aumentar su tasa de crecimiento y supervivencia es el aumento del consumo de glucosa y este desbalance de la homeostasis metabólica les permite un crecimiento acelerado con respecto a las células sanas. Cualquier mecanismo que logre revertir estas adaptaciones puede tener grandes implicaciones para el tratamiento del cáncer.

Para el análisis del metabolismo glucolítico usamos el kit para medición de glucólisis de ABCAM (Acidificación Extracelular) [Glycolysis Assay .Extracellular acidification. (ab197244)]. También es un enfoque basado en un lector de placas de fluorescencia de 96 pocillos, fácil de mezclar y medir, para el análisis de la acidificación extracelular (ECA / ECAR). Como la producción de lactato es el principal contribuyente a esta acidificación, se obtiene una medida conveniente e informativa del flujo glucolítico celular. Dichas mediciones ofrecen una visión importante sobre el papel central que desempeña la actividad glucolítica alterada en una amplia gama de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluida la adaptación celular a la hipoxia e isquemia, y el desarrollo y la progresión de la tumorigénesis.

Las mediciones de la glucólisis están basadas en la variación de la tasa de acidificación extracelular y se calculan a partir de los cambios en la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo y, dado que la medición no es destructiva y es totalmente reversible (no se consume reactivo sensible al pH), es posible medir las

Se muestran a continuación los resultados obtenidos para la tasa de glucólisis tanto en células MUM2B como en 3KT (Figura 30) bajo las mismas condiciones que el ensayo anterior: Normoxia, Normoxia con Olaparib, Hiperoxia e Hiperoxia con Olaparib.

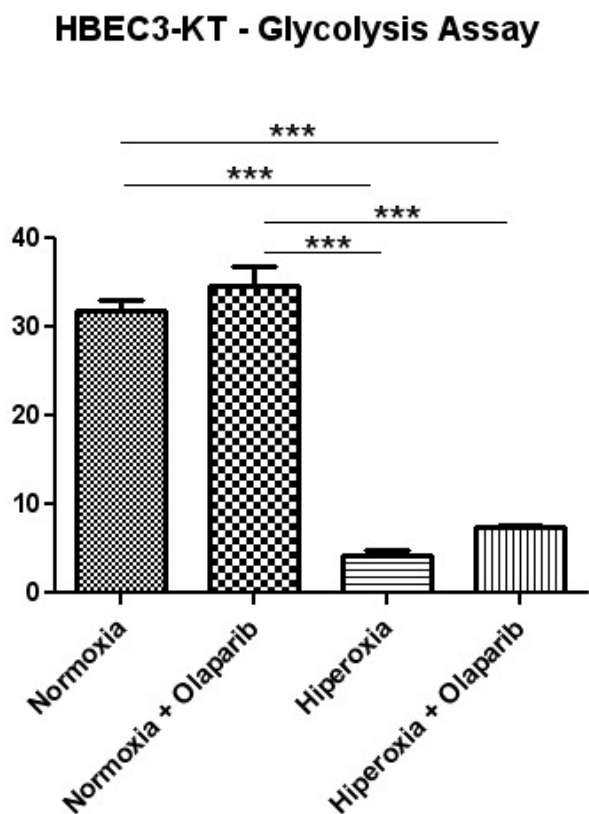
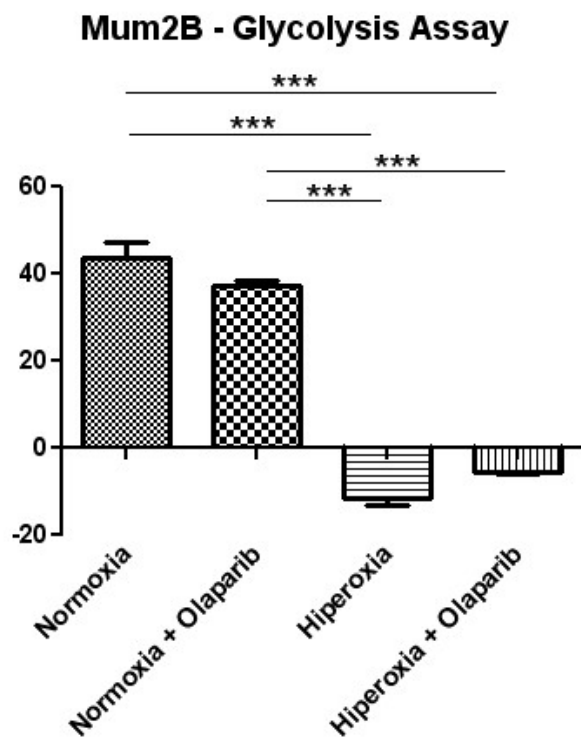


Figura 30. Análisis de la tasa de glucolisis usando el kit Glycolysis Assay Extracellular acidification de Abcam en células MUM2B (gráfica superior) y en HBEC3KT (gráfica inferior). Como puede observarse se produce una disminución dramática de la glucolisis hiperoxia. El Olaparib tiene un efecto moderado en estas condiciones.

En general observamos una dramática disminución de la tasa de glucólisis en hiperoxia en ambos tipos celulares lo que supone un switch metabólico de mucha importancia para la adaptación y proliferación del tumor. Es bien conocido que las condiciones de hipoxia del tumor modifican la actividad de la mitocondria consumiendo menor cantidad de oxígeno y provocando un aumento de la tasa de glucólisis. Estos resultados son muy importantes ya que aumentando la cantidad de oxigeno estamos logrando contrarrestar las adaptaciones del tumor y por tanto dificultando su proliferación.

No obstante, debido a la trascendencia de estos resultados para el metabolismo energético del tumor, se realizaron réplicas 3 biológicas más de los ensayos, en cada tipo celular cuyos resultados se muestran a continuación (Figura 31) y que sirvieron para confirmar las observaciones previas.

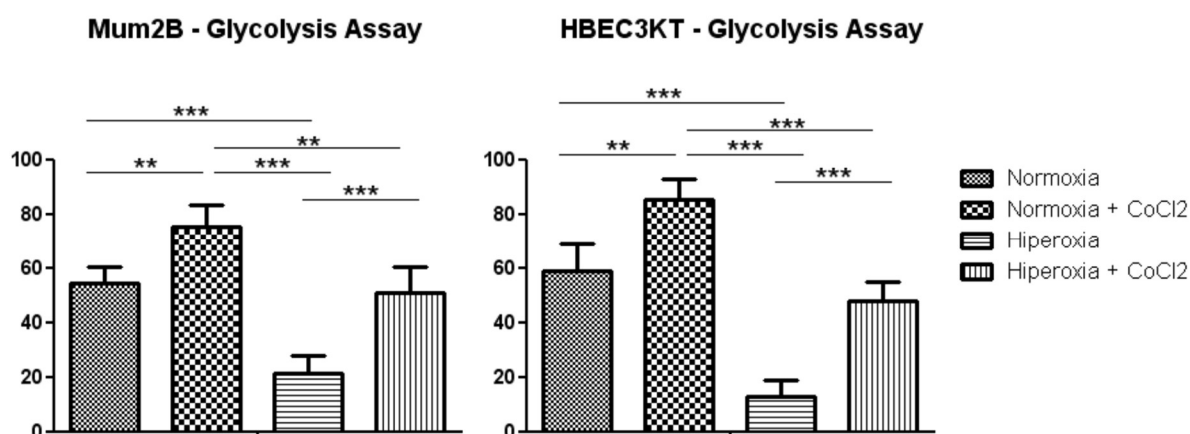


Figura 31. Análisis de la tasa de glucólisis usando el kit Glycolysis Assay Extracellular acidification de Abcam en células MUM2B y en HBEC3KT. Las barras representan la media de 3 réplicas independientes.

Es necesario destacar que una de las adaptaciones más frecuentes de los tumores es el aumento de la tasa de glucólisis, lo que les permite acaparar recursos energéticos y por tanto una elevada proliferación. Mediante el uso combinado de hiperoxia e inhibidores de PARP, se abre una puerta terapéutica para el control de las tasas metabólicas y proliferativas de las células tumorales en contextos clínicos.

Tareas 6 y 7. Modelo murino de metástasis y estudio histopatológico.

Se realizó un estudio usando un modelo murino de metástasis, en colaboración con el grupo del Dr. Alberto Pascual en el IBIS, CSIC, Sevilla, entre el 27 de Abril y el 26 de Mayo de 2021. También se realizó un estudio histopatológico de los tumores en colaboración con el grupo de Francisco O'Valle en la Universidad de Granada. Estos resultados no se muestran en la versión del informe publicada en la web por incompatibilidad con el procesos de patentabilidad.

Cabe destacar que se realizó un ensayo piloto previo en nuestro laboratorio de Granada , para optimizar las condiciones experimentales usadas en el ensayo definitivo (Figura 32).



Figura 32. Investigadores de nuestro grupo durante la realización del ensayo piloto en las instalaciones del IPBLN-CSIC y del Centro de Investigación Biomédica (CIB) de la Universidad de Granada que cuenta con un equipo analizador de imagen IVIS.

Análisis de resultados:

En el momento de la redacción de la presente memoria se está realizando el procesamiento de los bloques de parafina y OCT, sobre los que se realizarán los estudios histopatológicos y el análisis de los datos correspondientes a las imágenes del

IVIS y de los tumores. Estos datos deben presentarse necesariamente en combinación con los estudios histopatológicos, que aun llevaran unos meses de trabajo, para poder realizar conclusiones significativas.

CONCLUSIONES Y LINEAS DE TRABAJO FUTURO

Principales conclusiones:

Este proyecto se ha llevado a cabo en lo últimos 22 meses y los resultados conseguidos se envían en la memoria adjunta. De manera resumida recogemos las principales conclusiones:

1. La hiperoxia moderada (30%) y aguda (hasta 6 horas) induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tanto en células tumorales altamente agresivas (MUM2B) como en células epiteliales de pulmón, no tumorales (HBEC3KT).
2. La inhibición de PARP con olaparib disminuye la producción de ROS en células no tumorales HBEC3KT.
3. Hemos realizado el primer ensayo de transcriptómica global en respuesta a hiperoxia de toda la literatura científica y demuestra una alteración de la expresión génica afectando sobre todo a la actividad mitocondrial, que es mucho más acusada en células tumorales y se modifica tras el tratamiento con olaparib. La inhibición de PARP pone de manifiesto una alteración diferencial en la respuesta inflamatoria.
4. Los niveles de mediadores inflamatorios TNF-alfa, IL1beta, IL6 determinados a 72 horas tras la hiperoxia moderada, aumentan de manera muy significativa y el tratamiento con olaparib reduce fuertemente este aumento.
5. La hiperoxia limita la activación del factor inducible por hipoxia HIF1alfa, e impide la activación de la glucólisis lo que puede tener un impacto muy considerable sobre la adaptación tumoral al microambiente.
6. En un modelo de metástasis en ratón utilizando condiciones de hiperoxia hemos obtenido resultados prometedores que serán presentados en la correspondiente publicación.

Aplicabilidad y potencial de transferencia

Tal como ponen de manifiesto los resultados obtenidos hasta la fecha, este proyecto tiene un enorme potencial de proporcionar estrategias terapéuticas completamente novedosas y frente a los mecanismos de invasión por parte de las células tumorales. Como se mencionó, la adquisición de comportamiento altamente agresivo, impulsado por la hipoxia, es una de las principales causas de la invasión y la recaída del tumor, que

posteriormente conduce a la muerte de los pacientes. La disponibilidad de herramientas terapéuticas para contrarrestar eficazmente la activación de HIF en tumores e impedir el fracaso de las terapias contra la angiogénesis sigue siendo un desafío clínico importante. Por lo tanto, dada su relevancia clínica, existe una necesidad urgente de investigar y descubrir los mecanismos y genes involucrados en este fenómeno y, como tal, tienen implicaciones directas para mejorar la eficiencia de los regímenes terapéuticos actuales para tratar el cáncer. Además, el uso controlado de hiperoxia en paralelo a la inhibición de PARP protegería al epitelio pulmonar del daño masivo producido por la generación de ROS y el daño mitocondrial. Por tanto, si se encuentra una manera de evitar las lesiones pulmonares acompañadas de una nueva aplicación farmacológica del oxígeno, los resultados de este proyecto pueden traducirse en el desarrollo de nuevas estrategias para limitar la diseminación del melanoma metastásico.

Los resultados, una vez elaborada la inmunohistoquímica de las metástasis de pulmón, se van a presentar a la Oficina de Transferencia de Tecnología del CSIC, para su **evaluación de patentabilidad**, antes de publicarlos.

No obstante, **el proyecto, con todo su potencial translacional, puede quedar truncado si no se prevé una financiación adicional** que permita finalizar los experimentos que están en marcha y que se describieron en la solicitud presentada a la convocatoria de Biomedicina de la FDM de este año 2021.

Agradecimientos

Queremos de manera muy sincera **expresar nuestro enorme agradecimiento a la Fundación Domingo Martínez** por su confianza en nuestro proyecto. Somos conscientes de las dificultades del momento presente. Este tipo de iniciativas son un ejemplo a seguir por otras fundaciones privadas para aumentar la masa crítica de la investigación científica en nuestro país y su conexión con el sistema productivo.

Así mismo queremos agradecer al los grupos colaboradores que se nombran en el siguiente apartado su imprescindible ayuda para la consecución de los objetivos incluidos en este proyecto.

Colaboraciones establecidas para el desarrollo del proyecto:

1. Este proyecto nos ha permitido iniciar una colaboración con el **Dr. Alberto Pascual (IBIS, Sevilla)** para llevar a cabo la experimentación de los ratones en una cámara de piperoxia. Durante el tiempo que ha requerido esta experimentación un investigador de nuestro laboratorio, el Dr. Daniel Delgado, ha estado trabajando en el laboratorio del Dr. Pascual en Sevilla. Esta colaboración ha sido fundamental para llevar a cabo la experimentación en un modelo in vivo que se ha descrito en la presente memoria.
2. Colaboración con el **Dr. Luis Montuenga (CIMA, Navarra)** que nos ha proporcionado células primarias de epitelio bronquial para establecer los controles respecto al comportamiento de las células tumorales en todos los ensayos realizado in vitro.
3. Colaboración con el **Dr. Francisco Javier O'Valle**, Departamento de Anatomía Patológica e Historia de la Ciencia de la Universidad de Granada, que nos ha permitido realizar el estudio histopatológico de los tumores del modelo animal.

Publicaciones en las que aparece referenciada la ayuda de la Fundación Domingo Martínez

1. Zamudio-Martinez E, Herrera-Campos AB, Muñoz A, Rodríguez-Vargas JM, Oliver FJ. Tankyrases as modulators of pro-tumoral functions: molecular insights and therapeutic opportunities. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021 Apr 28;40(1):144. doi: 10.1186/s13046-021-01950-6. PMID: 33910596; PMCID: PMC8080362.
2. Martí JM, Garcia-Diaz A, Delgado-Bellido D, O'Valle F, González-Flores A, Carlevaris O, Rodríguez-Vargas JM, Amé JC, Dantzer F, King GL, Dziedzic K, Berra E, de Álava E, Amaral AT, Hammond EM, Oliver FJ. Selective modulation by PARP-1 of HIF-1 α -recruitment to chromatin during hypoxia is required for tumor adaptation to hypoxic conditions. *Redox Biol*. 2021 May;41:101885. doi: 10.1016/j.redox.2021.101885. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33581682; PMCID: PMC7878192.
3. Fernández-Cortés M, Andrés-León E, Oliver FJ. The PARP Inhibitor Olaparib Modulates the Transcriptional Regulatory Networks of Long Non-Coding RNAs during Vasculogenic Mimicry. *Cells*. 2020 Dec 15;9(12):2690. doi: 10.3390/cells9122690. PMID: 33333852; PMCID: PMC7765283
4. Martí JM, Fernández-Cortés M, Serrano-Sáenz S, Zamudio-Martinez E, Delgado-Bellido D, Garcia-Diaz A, Oliver FJ. The Multifactorial Role of PARP-1 in Tumor Microenvironment. *Cancers* (Basel). 2020 Mar 20;12(3):739. doi: 10.3390/cancers12030739. PMID: 32245040; PMCID: PMC7140056.
5. Delgado-Bellido D, Bueno-Galera C, López-Jiménez L, Garcia-Diaz A, Oliver FJ. Endothelial Phosphatase VE-PTP Participates in Vasculogenic Mimicry by Preventing Autophagic Degradation of VE-Cadherin. *Front Oncol*. 2020 Jan 24;10:18. doi: 10.3389/fonc.2020.00018. PMID: 32117706; PMCID: PMC7025541.