

AYUDAS EXTRAORDINARIAS FIN DE PROYECTO FUNDACIÓN DOMINGO MARTÍNEZ INFORME FINAL DE ACTIVIDADES. ÚLTIMA ANUALIDAD (2023).

PROYECTO

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

Investigadores principales: Francisco Javier Oliver Pozo y Ángel García Díaz.

Personal Investigador: Ana Belén Herrera Campos (Investigadora Predoctoral), Daniel Delgado Belido (Investigador postdoctoral), Laura López Jimenez (Personal Técnico) y Angel García Díaz (Coordinador y Co-IP).

Fecha: 10/02/2024.

Resumen

Durante el periodo final de ampliación de la ayuda de la Fundación Domingo Martínez, hemos abordado principalmente un estudio transcriptómico más ambicioso y amplio, incluyendo rangos de tiempo de 4 a 72 horas, tanto en condiciones de hiperoxia al 30% como al 60% de O₂ y en combinación con el inhibidor de PARP Olaparib, en los dos tipos celulares que hemos usado a lo largo del proyecto, las células tumorales de melanoma uveal MUM2B y las células no tumorales de epitelio pulmonar HBEC-3KT.

Para el análisis bioinformático de la ingente cantidad de datos generados en estos estudios, la investigadora predoctoral Ana Belén Herrera Campos ha realizado una estancia formativa de 3 meses en el Instituto Sanger del Reino Unido, en el grupo de la doctora Raheleh Rahbari, especialista en el análisis de datos de RNA Sequencing (RNA-Seq). Actualmente se están completando dichos análisis bioinformáticos en nuestro laboratorio, lo que nos está proporcionando resultados muy robustos sobre las adaptaciones genéticas, metabólicas y funcionales de las células de melanoma uveal a las condiciones de hiperoxia, en comparación con las células sanas.

Un apartado importante dentro de estos análisis ha sido el estudio de mediadores inflamatorios, que también ha sido completado mediante ELISA y qPCR.

Paralelamente, se han abordado estudios de migración e invasión celular en un modelo 2D mediante la técnica de cerramiento de herida o wound healing (como medida indirecta de la capacidad de metástasis) que indican que la capacidad de migración e invasividad de las células tumorales se ve muy limitada por la aplicación de la hiperoxia, lo que apoya nuestra hipótesis de partida.

También y con vistas a las próximas publicaciones científicas, estamos finalizando estudios complementarios de adaptaciones metabólicas, como la glicolisis, producción

de adenosina o proliferación y ciclo celular, necesarios para apoyar los puntos principales de los artículos. En este sentido, hemos podido publicar un primer artículo en Cancers y actualmente tenemos un segundo manuscrito en preparación, que se enviará en breve presumiblemente a iScience (Cell Press). Por último de cara al verano, enviaremos una tercera publicación que englobará todo el trabajo realizado durante los años en los que hemos disfrutado de la ayuda de la FDM.

Finalmente, es importante destacar que este proyecto ha abierto nuevas preguntas y horizontes relacionados con las posibilidades de prevención de la inmunosupresión a través de la exposición a la hiperoxia, y que por tanto se están solicitando nuevos fondos en convocatorias de diferentes instituciones para continuar respondiendo a las incógnitas abiertas sobre las posibilidades del uso terapéutico de la hiperoxia frente a la progresión tumoral y la potenciación de la inmunoterapia.

INFORME DE ACTIVIDADES

1. Estudio transcriptómico global mediante RNASeq:

En los primeros compases de este proyecto, durante 2019, se planteó el objetivo de realizar un estudio transcripcional mediante RNAseq, que en ese momento se realizó comparando las condiciones de normoxia (21% O₂) e hiperoxia (30% O₂) con un tiempo de exposición de 4 horas, similar al que tradicionalmente se usaba en nuestro laboratorio para las condiciones de hipoxia. Sin embargo, durante el desarrollo del proyecto, nosotros y otros grupos, observamos que se obtenía mayor efecto de la hiperoxia sobre diferentes parámetros celulares a tiempos de exposición más prolongados y exposición a niveles de oxígeno más próximas a las utilizadas en las aplicaciones clínicas (60% O₂).

Por tanto, y como se ha mencionado, surgió la necesidad de realizar un estudio transcriptómico más ambicioso y global, incluyendo un rango de tiempos de exposición desde las 4 a las 72 horas y aumentando la concentración de oxígeno hasta el 60%. También entendimos importante la comparación de los perfiles transcripcionales a baja y alta concentración de oxígeno dado que ya teníamos información a las 4 horas de exposición y 30% O₂.

En la **Figura 1** se muestra el esquema experimental del estudio transcripcional realizado mediante RNAseq tanto en células de melanoma uveal MUM2B como en las células no tumorales de epitelio pulmonar HBEK-3KT. Nótese que además de un nuevo análisis en un lapso de tiempo entre 4 y 72 horas al 60% O₂, también se amplió el análisis inicial al 30% incluyendo muestras a las 48 y 72 horas para poder realizar una comparación general. En ambos casos también se incluyó el inhibidor de PARP olaparib.

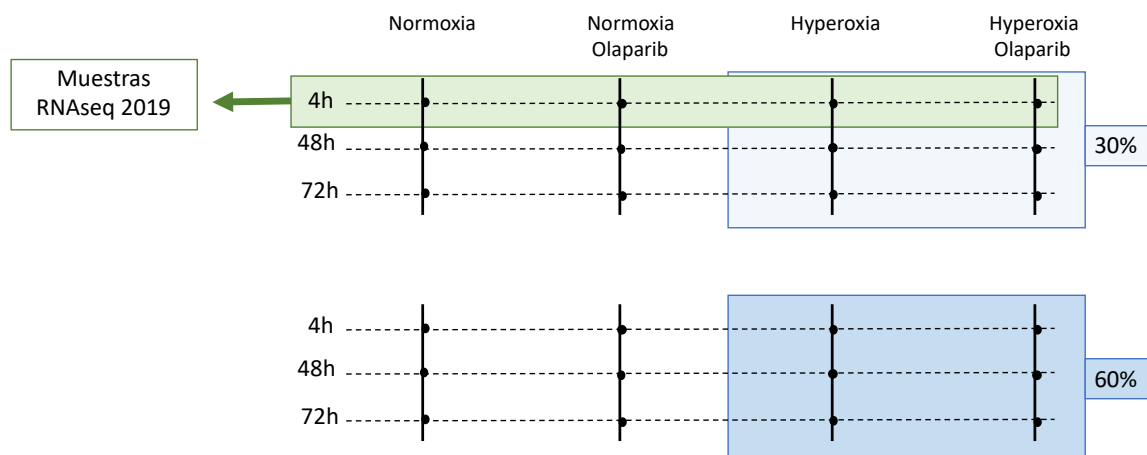


Figura 1. Esquema experimental del estudio transcripcional realizado mediante RNA-Seq. Se realizó un análisis comparativo entre las concentraciones de oxígeno del 30% y 60%, a lo largo del tiempo, entre 4 y 72 horas, con y sin Olaparib y en los dos tipos celulares de estudio, MUM2B y HBEC-3KT.

Actualmente continuamos analizando los resultados, ya que se ha generado una ingente cantidad de información, que debe ser ordenada y analizada mediante métodos bioinformáticos, sin embargo, ya podemos avanzar algunos de los análisis y resultados preliminares obtenidos hasta la fecha.

Análisis de las Funciones celulares más afectadas: Gene Ontology.

Uno de las representaciones de mayor utilidad derivada del análisis de secuencias de RNA-Seq es la de las funciones biológicas o celulares más afectadas en los diferentes tratamientos conocida como gene Ontology. A modo de ejemplo en la figura 2, se puede observar como las funciones celulares más afectadas, con hiperoxia a las 72 horas, son muy diferentes entre las células MUM2B de melanoma uveal y las no tumorales HBEC-3KT.

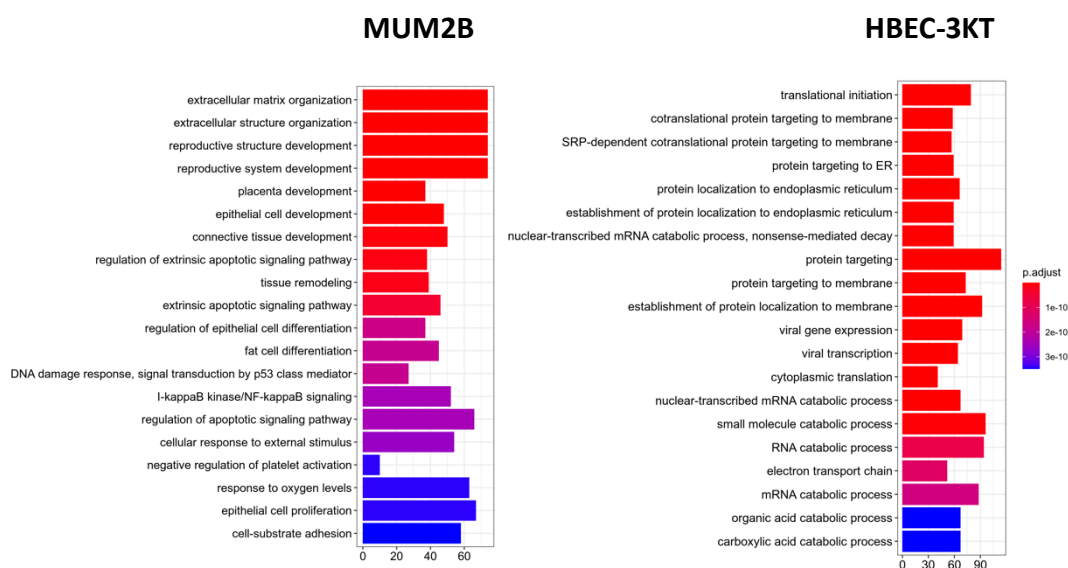


Figura 2. Representación de las funciones biológicas más afectadas (Gene Ontology), durante el tratamiento con hiperoxia a 72 horas en células MUM2B y HBEC-3KT.

En el caso de las células MUM2B en línea con otros resultados obtenidos son de gran interés funciones como las de señalización a través del factor de transcripción NF-KappaB, muy relacionadas con inflamación, o las de daño al ADN. La relevancia biológica de estas funciones en nuestro modelo están siendo objeto de un análisis detallado en la actualidad en nuestro grupo.

Gene Set Enrichment Analysis GSEA

Otro de los análisis o representación gráfica de los resultados de ARN-Seq que aporta más información son los denominados GSEA o *Gene Set Enrichment Analysis*. En estas representaciones se observa de manera gráfica si un determinado grupo transcritos de genes relacionados con una función concreta se ven enriquecidos por efecto del tratamiento o lo contrario, es decir si sube o baja la expresión de un conjunto de genes relacionados con funciones celulares concretas. De nuevo a modo de ejemplo, una de las conclusiones a las que estamos llegando mediante diferentes aproximaciones es que la cascada inflamatoria se ve aumentada por el tratamiento de hiperoxia, especialmente en combinación con Olaparib en células MUM2B (Figura 3).

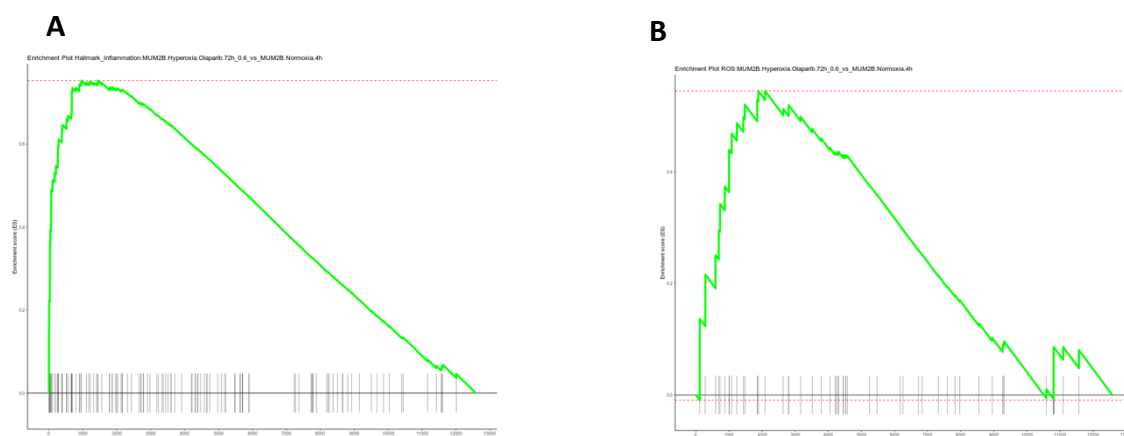


Figura 3. Análisis GSEA de células MUM2B tras el tratamiento combinado de Hiperoxia y Olaparib durante 72 horas. Dos de los grupos de genes más afectados por el tratamiento son los relacionados con la inflamación (A) o los relacionados con liberación de especies reactivas de oxígeno (B).

Expresión diferencial de genes: Volcano Plots

Por su parte, los gráficos de volcán o *volcano plots*, muestra las expresión diferencial de genes individuales, a nivel global en una muestra o tratamiento concreto. En nuestro modelo de nuevo observamos como en las células tumorales MUM2B se eleva la expresión de mediadores inflamatorios como IL1-A e IL1-B, o IL8 (CXCL8) en respuesta a la hiperoxia especialmente en combinación con Olaparib (Figura 4)

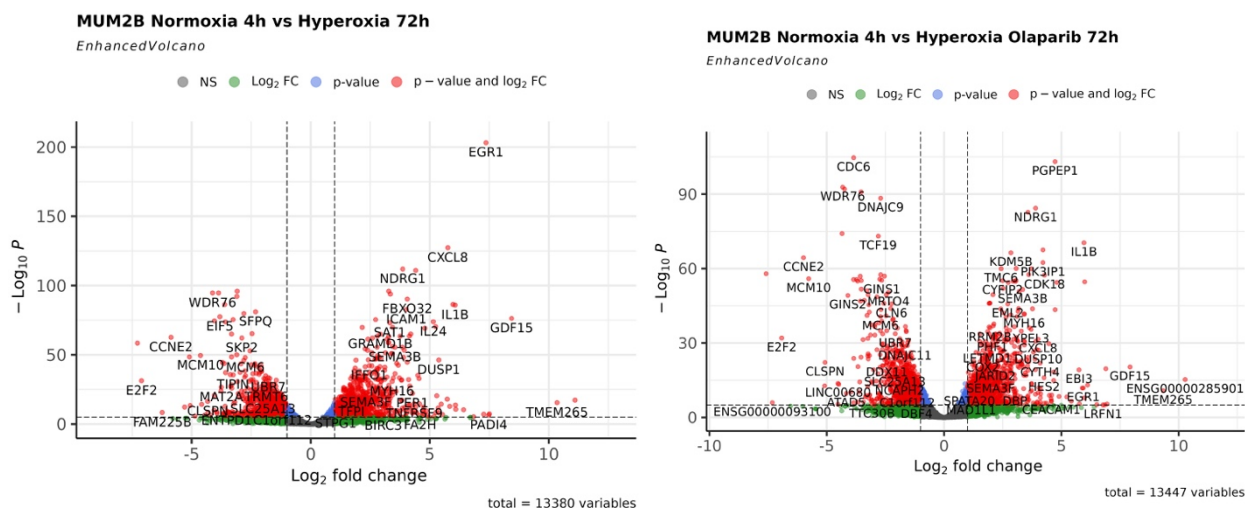


Figura 4. Representación gráfica en forma de Volcano Plots de la expresión diferencial de genes en de células MUM2B sometidas a Hiperoxia con y sin Olaparib. Entre otros genes, se observa alta expresión de citoquinas proinflamatorias como IL1-A e IL-1B o CXCL8 (IL-8).

2. Confirmación de los mediadores inflamatorios:

Una de las principales conclusiones de los estudios transcriptómicos ha sido que la hiperoxia, y también la combinación con Olaparib, activa la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1B, IL-1A, IL-6 o IL-8. Para confirmar los datos de RNA-Seq, se realizaron análisis mediante qPCR y ELISA, llegando a conclusiones similares a los estudios transcripcionales, lo que confirma por tanto las observaciones como se puede observar en la *figura 5*.

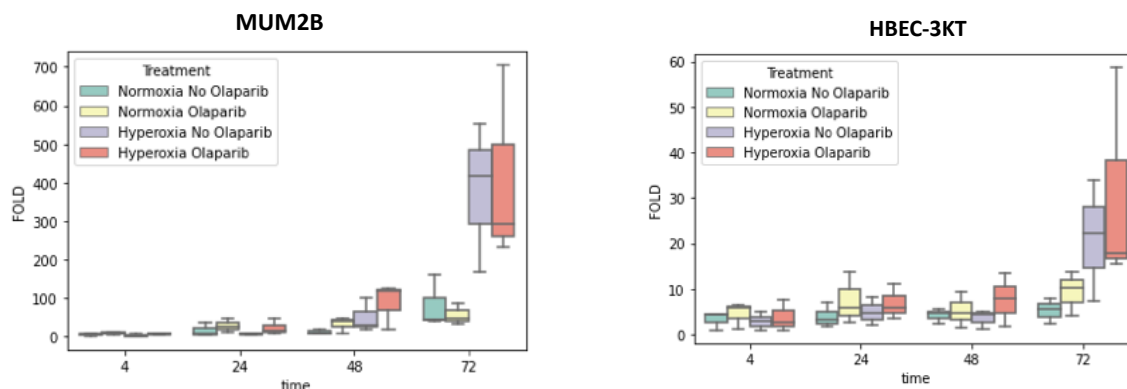


Figura 5. Estudio mediante qPCR de la acumulación de mensajero para la IL-1B a lo largo del tiempo en las condiciones experimentales habituales. El análisis confirma que la hiperoxia aumenta la expresión de IL-1B lo que se ve potenciado por el Olaparib.

También se realizaron ensayos Elisa que confirmaron la expresión de IL-1B a nivel de proteína, en línea con los resultados obtenidos mediante qPCR y RNA-Seq.

3. Estudios de proliferación, migración e invasión (Wound Healing)

Para determinar la migración e invasión celular se realizaron ensayos 2D de cerramiento de heridas o wound healing, bajo las condiciones experimentales habituales. En este tipo de ensayos se cultivan las células en una placa con una barrera de silicona, que cuando se retira deja un surco o espacio sin células (Figura 6) y se mide el tiempo que tardan las células en cubrir ese área.

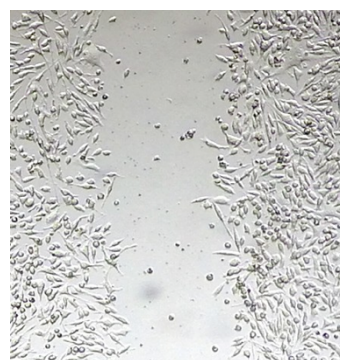


Figura 6. Fotografía tomada al microscopio de las células tumorales MUM2B mostrando el surco característico de los ensayos de Wound Healing. Se cuantifica el área cerrada a lo largo del tiempo.

Mediante la realización de estos ensayos, pudimos concluir que tanto la hiperoxia como la combinación de hiperoxia con el inhibidor de PARP Olaparib, interfieren con la migración e invasión celular, tanto de las células tumorales MUM2B como de las no tumorales HBEC-3KT (Figura 7).

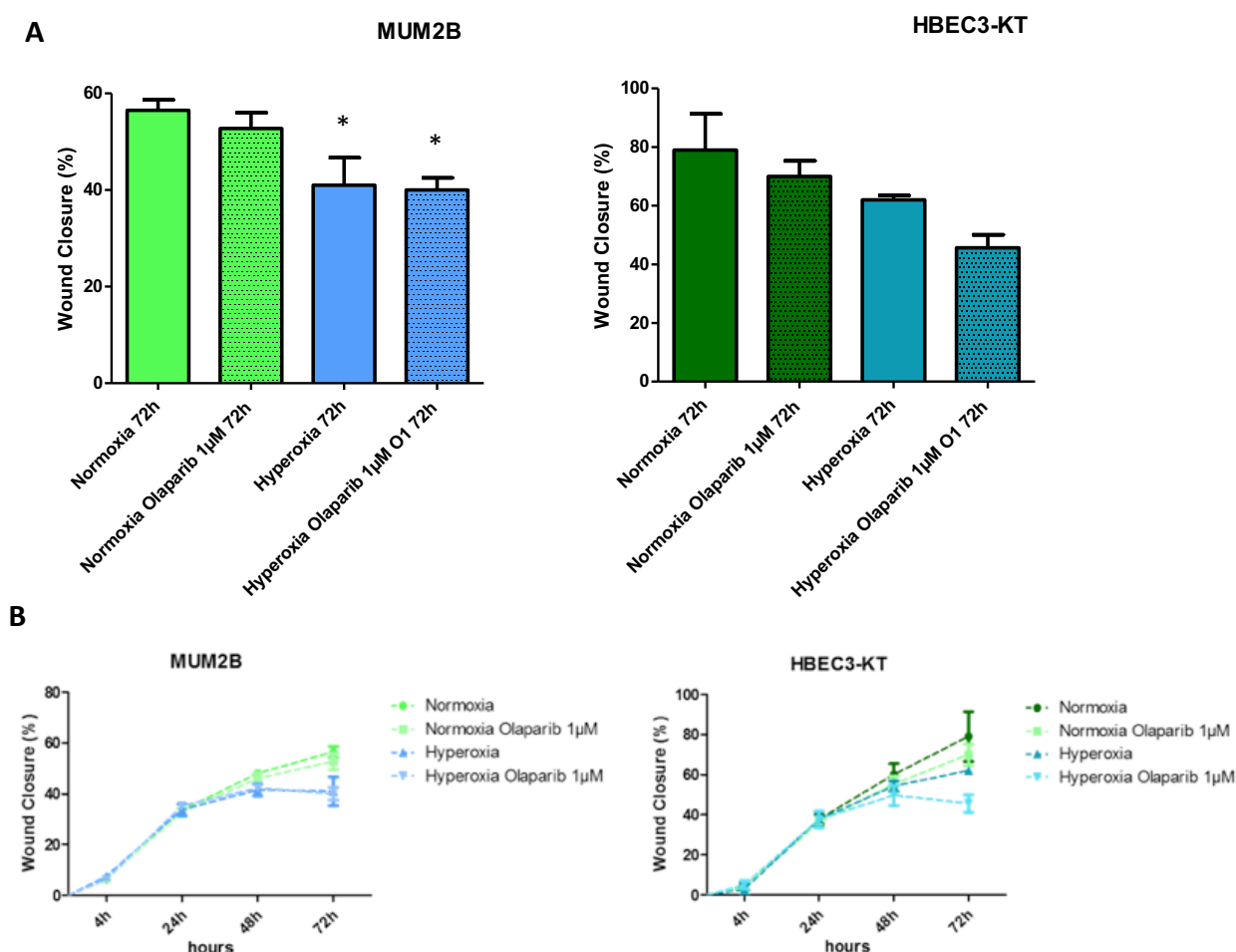


Figura 7. Análisis de migración e invasión 2D mediante cerramiento de herida (Wound Healing) en células MUM2B(A) y HBEC-3K a las 72 horas (A) o durante un curso de tiempo (B). En ambos casos la hiperoxia interfiere con la migración siendo más acusado el efecto en combinación con Olaparib.

4. Estudios metabólicos:

Uno de los campos que suscita más atención tanto en la biología del cancer en general como en el de la inmunoterapia es el de la reprogramación metabólica de las células tumorales. En este sentido este proyecto aborda la adaptación metabólica del consumo de la glucosa ya presentada con anterioridad y en los últimos meses hemos comenzado el estudio de la producción de Adenosina extracelular por parte de las células tumorales. La Adenosina , es una molécula que se genera en condiciones de estrés como la hipoxia y tiene un fuerte carácter inmunosupresor, de ahí su interés. Pensamos que si la Adenosina se genera en respuesta a hipoxia, concentraciones mayores de oxígeno

pueden ser beneficiosas para reducir esta producción y por tanto lograr un microambiente tumoral más inmunopermisivo.

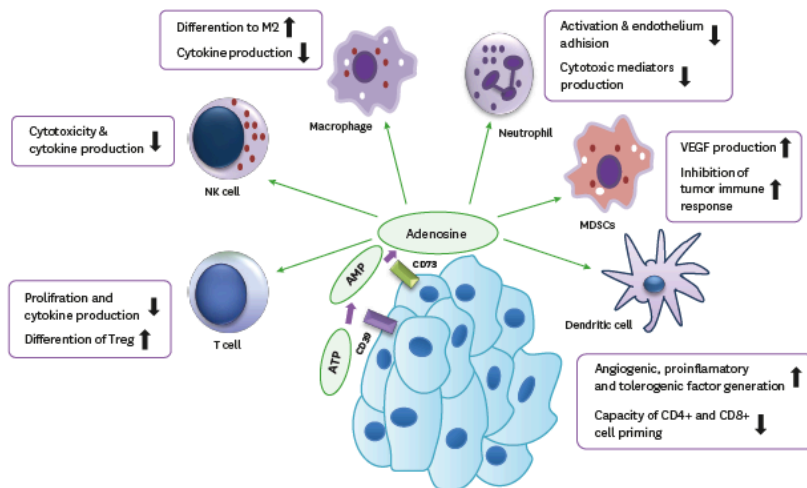


Figura 8. Inhibición de la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por la adenosina. La vía purinérgica a través de las

moléculas de adenosina crea un TME inmunosupresor. La función biológica de diferentes células inmunitarias, como las células T, las DC, las MDSC, las células NK, los macrófagos y los neutrófilos, se ve impedida por la adenosina, lo que ayuda a la progresión del tumor (de Samaneh Arab et al, 2019 ¹).

Experimentos preliminares en células de melanoma MUM2B muestran producción de Adenosina en condiciones de hipoxia (72 horas), mientras que los niveles de Adenosina son indetectables al aumentar la concentración de oxígeno, tanto en normoxia como en hiperoxia.

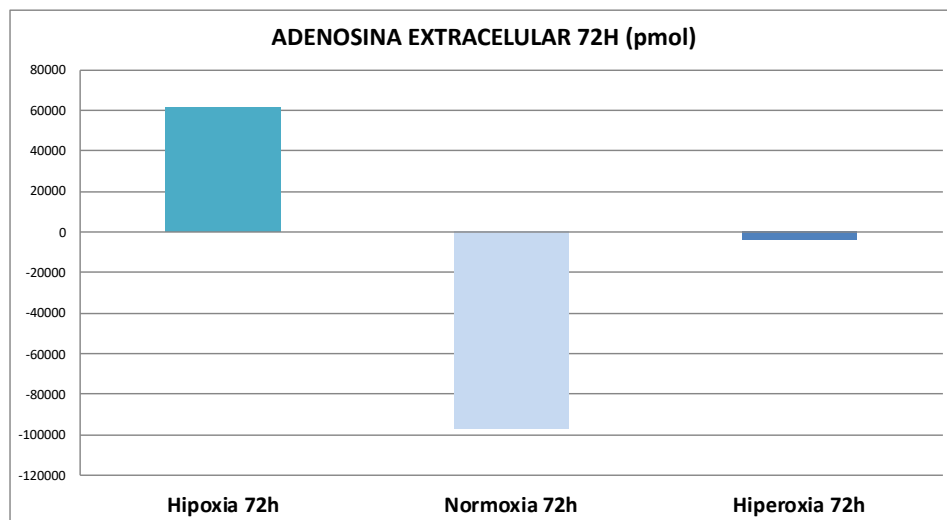


Figura 9. *Análisis de la Adenosina extracelular en condiciones de Hipoxia , Normoxia e Hiperoxia (72horas) en células MUM2B mediante un Kit Fluorométrico (Cell Biolabs). Mientras que las células tumorales producen Adenosina en condiciones de Hipoxia sus niveles son indetectables al subir la concentración de oxígeno (normoxia e hiperoxia).*

CONCLUSIONES OBTENIDAS DE LOS ÚLTIMOS RESULTADOS

i. La hiperoxia impide por sí misma la proliferación y migración de las células tumorales MUM2B y afectando en menor grado a las células sanas del epitelio pulmonar HBEC3-KT.

ii. Los resultados en un modelo murino, ya presentados en anteriores informes, parecen confirmar el potencial antiproliferativo del tratamiento con hiperoxia y los análisis de inmunohistoquímica sugieren un reducción tanto en el numero de nódulos de metástasis como en las zonas de hipoxia tras el tratamiento con hiperoxia

iii. El tratamiento conjunto con hiperoxia e inhibidores de PARP induce un aumento en la expresión de mediadores inflamatorios siendo la inducción de la señal infamatoria una de las conclusiones más sólidas de estos estudios con potenciales implicaciones en potenciación de la inmunoterapia.

iv. El tratamiento con hiperoxia logra reprogramar en parte las células tumorales, tanto a nivel del consumo de la glucosa (presentado en anteriores informes) como a nivel de la producción de adenosina, que solo se detecta en células de melanoma uveal sometidas a hipoxia, pero no a mayores concentraciones de oxígeno.

Como se ha mencionado, este proyecto ha generado nuevos retos de investigación que pretendemos abordar en los años venideros.

COMUNICACIONES A CONGRESOS Y ESTANCIAS

En la última anualidad, la ayuda de la Fundación Domingo Martinez, nos ha permitido acudir a diferentes reuniones y congresos, tanto a nivel nacional como internacional, donde se han presentado comunicaciones en forma de poster y orales.

Además como se ha mencionado, nuestra investigadora predoctoral más directamente implicada en este proyecto, Ana Belén Herrera Campos ha tenido la oportunidad de realizar una estancia formativa en técnicas bioinformáticas, en el laboratorio de la Doctora Raheleh Rahbari en el Instituto Sanger de Cambridge (U.K). Ana Belén se ha formado durante algo más de 3 meses en métodos bioinformáticos de análisis de secuencias de RNA Sequencing (RNA-Seq) y actualmente está poniendo en práctica dicha formación en el análisis pormenorizado del ensayo que se describe en la actividad del apartado 1 de esta memoria.

Por tanto, durante esta última anualidad hemos asistido a los siguientes eventos científicos:

-Estancia de tres meses de Ana Belén Herrera Campos en el laboratorio de la Dra. Rahbari, Cancer predisposition and Ageing, Wellcome Sanger Institute, Cambridge U.K.

-26th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy. Los Angeles 16-20 Mayo 2023.

-Reunión Conexión Cáncer CSIC, Benidorm, Enero 2023.

-VIII Annual Meeting of the Spanish Group of Hypoxia. Sevilla. 24-42 Noviembre 2023.

PUBLICACIONES

Como ya se ha mencionado en anteriores informes, los conocimientos generados en este proyecto nos han permitido publicar un primer artículo en la revista científica Cancers (Herrera-Campos et al, Cancers. 2022) ².

Además, en la actualidad tenemos un segundo manuscrito en preparación, en el que vamos a abordar principalmente el estudio transcripcional de las células no tumorales de epitelio pulmonar HBEK-3KT, que nos parece importante debido a su relevancia clínica y que se enviará en breve presumiblemente a la revista iScience (Cell Press).

Por último, en los próximos meses, pero no después del próximo verano, enviaremos una tercera publicación, la mas relevante, puesto que englobará todo el trabajo y las principales conclusiones obtenidas durante estos años en los que hemos disfrutado de la ayuda de la FDM.

FUTURAS VÍAS DE EVOLUCIÓN:

Durante la realización de este proyecto, si bien hemos llegado a entender buena parte de la biología de la hiperoxia en el modelo de melanoma uveal y se han generado no pocas certezas, también es verdad que como suele ocurrir en investigación, han surgido nuevas preguntas y horizontes de conocimiento.

Una de esas certezas, inesperadas al comienzo del proyecto, pero muy robusta al día de hoy, nos ha llevado a demostrar un papel muy importante de la cascada de señalización inflamatoria en el caso del melanoma uveal que pensamos puede tener una gran relevancia para la mejora de la inmunoterapia. Si bien profundizar el campo la inmunoterapia no era parte de los objetivos originales de este proyecto, pensamos a la luz de las evidencias que debemos explorar esa posibilidad y por tanto estamos pidiendo nuevos proyecto para obtener los fondos que nos permitan abordar dichas cuestiones.

Concretamente, ya hemos presentado un proyecto, ahora pendiente de evaluación a la convocatoria de proyectos del Cancer Research Institute (USA) y así mismo se va a presentar otro a la inminente convocatoria de proyectos de la Junta de Andalucía, que se espera que se abra en breve.

En estos proyectos, creemos que es crucial el abordaje de un modelo animal en el que podamos testar la eficacia de la inmunoterapia en el caso concreto del melanoma uveal, usando una combinación de hiperoxia, inhibidores de los immunecheckpoints como PD-L1 y en su caso los inhibidores de PARP-1. La idea principal subyacente es que esta combinación va a actuar mejorando la inmunoterapia a través de la vía cGAS-STING, muy relacionada con la inestabilidad genética³, además de interferir con la progresión tumoral y causando una profunda reprogramación metabólica. Estás y otras cuestiones derivadas de este proyecto, que no hubiera sido posible sin el apoyo de la Fundación Domingo Martínez, deberán ser abordadas en tiempos y proyectos venideros.

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 hiperoxia. 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.
4. Colaboración con la Dra. Raheleh Rahbari, Wellcome Sanger Institute, Cambridge, Reino Unido, cuya colaboración ha sido clave para el desarrollo del estudio transcriptómico durante hiperoxia y análisis bioinformático acogiendo en su laboratorio a la investigadora predoctoral de nuestro laboratorio Ana Belén Herrera Campos.

REFERENCIAS

1. Arab, S. & Hadjati, J. Adenosine Blockage in Tumor Microenvironment and Improvement of Cancer Immunotherapy. *Immune Netw.* **19**, (2019).
2. Herrera-Campos, A. B. *et al.* Implications of Hyperoxia over the Tumor Microenvironment: An Overview Highlighting the Importance of the Immune System. *Cancers (Basel)*. **14**, (2022).
3. Shen, J. *et al.* PARPI triggers the STING-dependent immune response and enhances the therapeutic efficacy of immune checkpoint blockade independent of BRCANess. *Cancer Res.* **79**, 311–319 (2019).