

Investigador Principal: Prof. Santos Mañes Brotón
Centro Nacional de Biotecnología/CSIC
Darwin 3. Campus de Cantoblanco
28049-Madrid
Tfno: 915854840
e-mail: smanes@cnb.csic.es

Título del Proyecto:

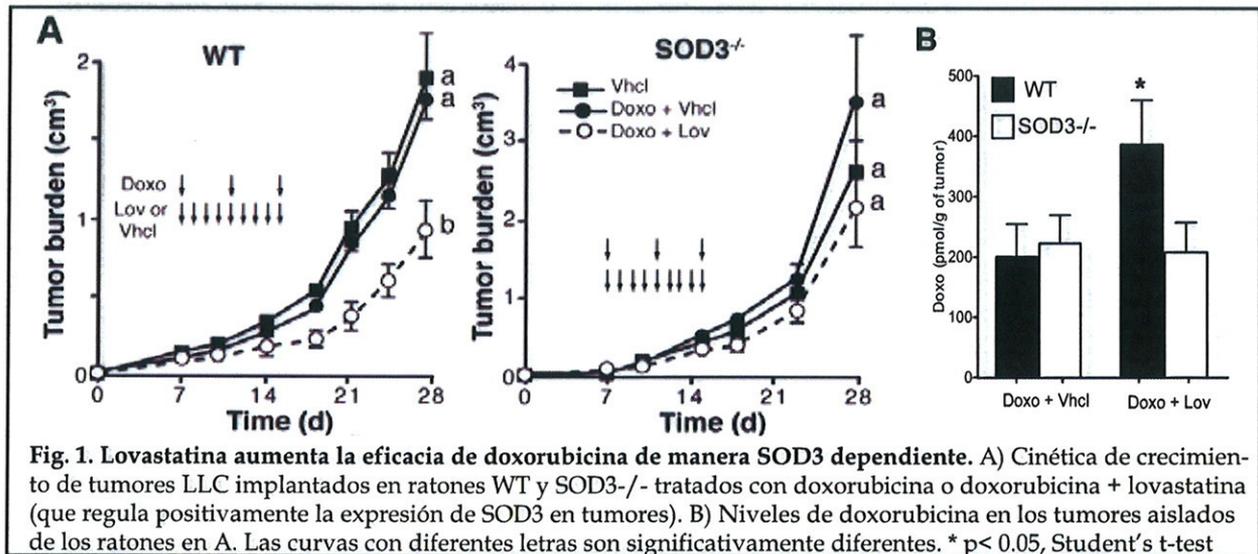
Regulación de la biodisponibilidad de óxido nítrico en tumores: Nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer.

Resumen

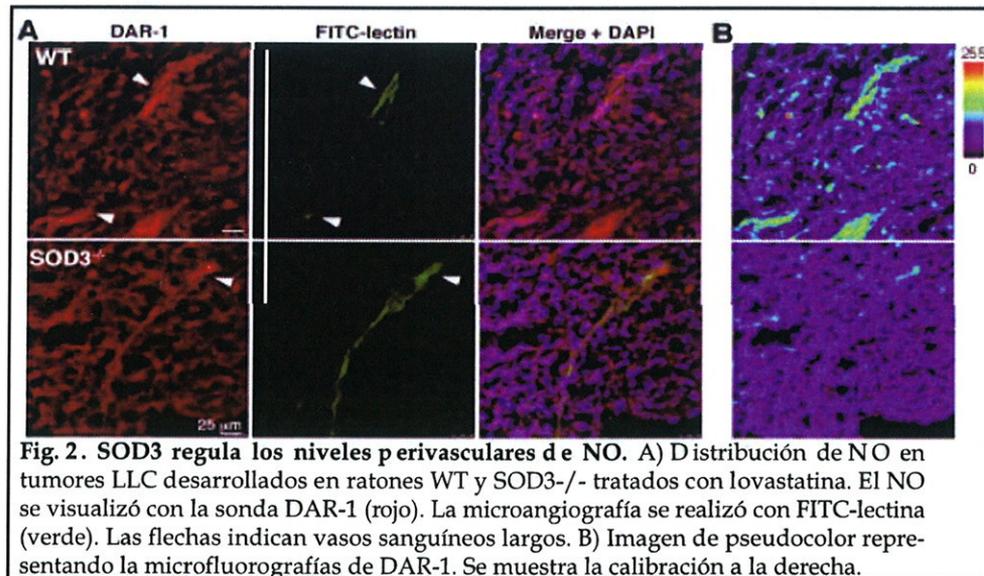
La regulación espacio-temporal del óxido nítrico (NO) es un factor esencial en cáncer. En los últimos años, nuestro grupo ha generado una amplia colección de datos mostrando el papel clave que juega el NO en la normalización de los vasos sanguíneos que infiltran los tumores. Usando modelos celulares y animales hemos demostrado que preservar niveles adecuados de NO cerca de estos vasos favorece la función barrera de los mismos y, en último término, mejora la liberación de compuestos anti-neoplásicos en el microambiente tumoral. Los estudios previos sugerían que el NO podría regular los niveles de la proteína VE-cadherina, una molécula clave en el establecimiento de los contactos célula-célula en el endotelio. Comprender las señales intracelulares por las cuales el NO aumenta la expresión de VE-cadherina y mejora la función de la vasculatura tumoral puede tener, por tanto, un impacto directo en la eficacia de estrategias terapéuticas en cáncer. Esta ha sido la motivación del presente proyecto

Efecto de la actividad enzimática de SOD3 sobre los niveles de NO y VE-cadh.

Las vasos presentes en los tumores tienen anormalidades funcionales que impiden la correcta irrigación del tejido tumoral y, por tanto, constituyen una barrera para la liberación de compuestos con actividad anti-tumoral. Si bien las causas que causan dichas anormalidades vasculares en tumores no se conocen totalmente, nuestros datos previos sugerían que la pérdida de gradientes perivasculares de NO podría ser un factor importante. Estos gradientes de NO se desorganizan debido a la síntesis aberrante de NO por las células tumorales, así como por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el anión superóxido (O_2^-), el cual oxida al NO para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). SOD3 es una metaloproteína responsable de la dismutación enzimática del anión O_2^- en el espacio extracelular. SOD3 atenua el estrés oxidativo y aumenta la biodisponibilidad del NO al impedir su oxidación. De hecho, la sobre-expresión de SOD3 en el parénquima tumoral reducía la presión del líquido intersticial en los tumores, favoreciendo la salida de doxorubicina desde el torrente sanguíneo al tumor. Como consecuencia de ello, el aumento de SOD3 en el ambiente tumoral mejoró el efecto quimioterapéutico de la doxorubicina y redujo significativamente el crecimiento de los tumores (Fig. 1). Asociado a este fenotipo se encontró

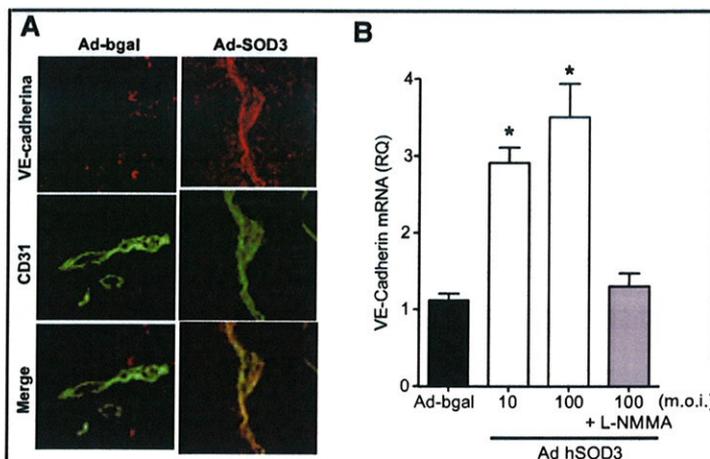


SOD3 aumentaba los niveles de NO cerca de los vasos sanguíneos (Fig. 2), así como los niveles de VE-cadh de una forma dependiente del óxido nítrico (Fig. 3). Si bien estos antecedentes sugerían



una conexión entre la actividad enzimática de SOD3, los niveles de NO y la expresión de VE-cadh en células del endotelio, no existían pruebas fehacientes de dicha conexión funcional.

Por ello,



el primer objetivo del proyecto fue determinar si la actividad enzimática de SOD3 era relevante para controlar los niveles de NO y VE-cadh en células endoteliales. Generamos dos mutantes inactivos de SOD3 (SOD3^{S227C} y

recombinantes para SOD3 (Ad-SOD3), con anticuerpos anti-VE-cadh (rojo) y anti-CD31 (verde); colocalización en amarillo. B) Células humanas de microvasculatura (HMVC) se infectaron con Ad-bgal o Ad-SOD3 a 10 y 100 moi (unidades infectivas), y se trataron con vehículo o L-NMMA (pan inhibidor de NOS). Los niveles de mRNA para VE-cadh se determinaron a las 48h por RT-qPCR. RQ cantidad relativa; *p < 0.05, one-way ANOVA with Dunnet post-test

SOD3^{N212A/R218A}) mediante mutagénesis dirigida, y demostramos mediante ensayos enzimáticos específicos una disminución >80% de la dismutación del anión O₂⁻ en el mutante SOD3^{S227C}. Por el contrario, el mutante SOD3^{N212A/R218A} no tenía una pérdida significativa de actividad SOD, por lo que se descartó para subsiguientes estudios.. Para comprobar si la actividad enzimática de SOD3 afectaba a los niveles de NO, se

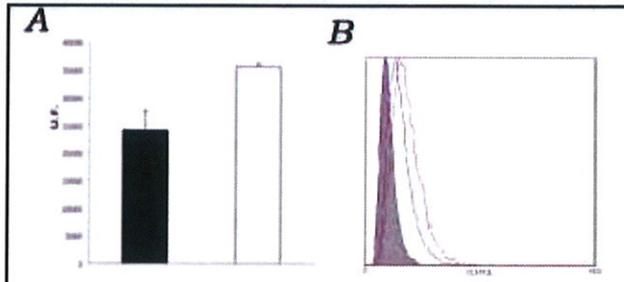


Fig. 4 . La actividad catalítica de SOD3 regula los niveles intracelulares de NO. A) Cuantificación de las sonda de NO DAF2 en células endoteliales que sobre-expresan el mutante SOD3^{S227C} (negro) o SOD3 activo (blanco). B) Análisis por citometría de flujo de la cantidad de DAF2 en las células que sobre-expresan el mutante SOD3 inactivo (línea azul) o SOD3 activo (línea roja). Datos representativos de 3 experimentos.

transfectaron las células endoteliales 1G11 con la forma salvaje de SOD3 (SOD3^{WT}) o el mutante inactivo SOD3^{S227C}; estas células fueron posteriormente incubadas con la sonda de 4,5-Diaminofluoresceína (DAF-2) y la cantidad de NO determinada por citometría de flujo. La sobre-expresión de SOD3^{WT} aumentó los niveles de NO intracelular, mientras que el mutante SOD3^{S227C} no produce un aumento tan notable de NO (Fig. 4); estos resultados asocian la actividad de SOD3 con los niveles de NO.

Con el fin de asociar la actividad enzimática de SOD3 con los niveles de VE-cadh, inicialmente analizamos los niveles del mRNA de VE-cadh en las células 1G11 transfectadas con SOD3^{WT} o SOD3^{S227C} mediante PCR cuantitativa. Estos experimentos no han dado los resultados esperados, posiblemente porque el mutantes SOD3^{S227C} no pierde totalmente su actividad. Por

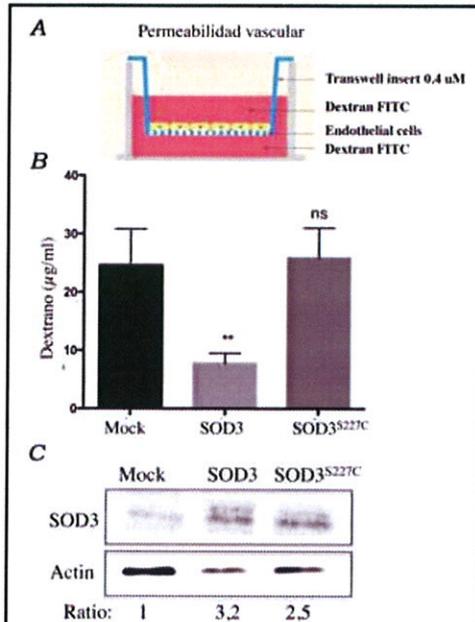


Fig. 5 . La actividad catalítica de SOD3 regula la permeabilidad vascular mediante el NO. A) Esquema del ensayo de permeabilidad in vitro. B) Cuantificación del FITC-Dextrano que atravesó la barrera de células endoteliales control (Mock) o que sobreexpresaban SOD3^{WT} (SOD3) o el mutante SOD3^{S227C}. C) Inmunoblot mostrando los niveles de SOD3 en cada condición. **p<0.01; n.s., no significativo respecto del control (mock). n= 3 exp.

este motivo, probamos el efecto de dichos mutantes sobre la permeabilidad de las células endoteliales 1G11, un proceso que hemos demostrado que es dependiente de NO y de VE-cadh (ver memoria del proyecto original). En este ensayo si hemos observado que la sobreexpresión de SOD3^{S227C} no causa la inhibición de la permeabilidad observada por la sobreexpresión de SOD3^{WT} (Fig.5). Esto indica que la actividad catalítica de SOD3 es fundamental para aumentar los niveles de NO y VE-cadh en las células endoteliales.

Efecto del NO sobre la actividad del promotor de VE-cadh.

Identificación de sitios relevantes.

El efecto de SOD3 sobre los niveles de VE-cadh es a nivel transcripcional, lo que sugiere que, de alguna manera, SOD3 debe afectar a la actividad del promotor del gen de VE-cadh. Clonamos un fragmento de 2.5kb upstream del gen de VE-cadh, y lo fusionamos al gen

de la proteína reportera luciferasa-firefly (f-luc). La inducción del promotor de VE-cadh debe incrementar la transcripción de f-luc, lo cual puede detectarse con un sustrato luminiscente. En la Fig. 6 se muestra un esquema básico de cómo se realizaron los ensayos. En primer lugar las células endoteliales se transfectaron con la construcción p2.5k-VE-cadh-f-luc, junto con otra isoforma de luciferasa (renilla; r-luc) bajo un promotor basal; r-luc servirá como control de transfección y normalizador para homogeneizar los datos entre pocillos. Tras la transfección, las células se someten a los diferentes estímulos, tras lo cual se determinan los niveles de f-luc y r-luc mediante

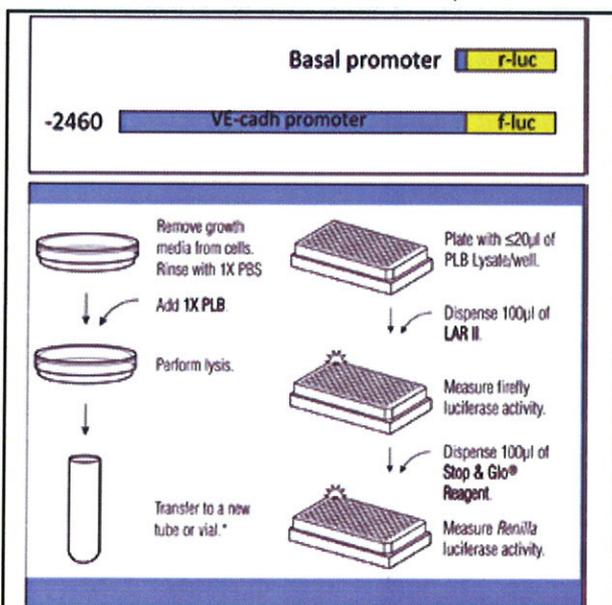


Fig. 6. Esquema del ensayo para determinar la actividad del promotor de VE-cadh. Las construcciones utilizadas se basan en la proteína firefly luciferasa acoplada a los distintos promotores de VE-cadh, y renilla luciferasa acoplada a un promotor basal (no regulable por estímulo; normalizador).

diferentes sustratos. Los datos se expresan como el cociente entre las unidades de luminiscencia obtenidas tras medir la actividad f-luc/r-luc.

En primer lugar analizamos si el NO inducía cambios en la actividad del promotor. Para ello estimulamos las células endoteliales 1G11 con un donador de NO DETA NONOate a diferentes concentraciones. Encontramos que el NO tiene un papel dual en la transcripción de VE-cadh; a concentraciones bajas estimula la transcripción de VE-cadh, mientras que a concentraciones altas la inhibe (Fig. 7). Esto demuestra que el NO directamente regula la transcripción de VE-cadh.

En un experimento inverso, analizamos si un inhibidor del NO afectaba la actividad transcripcional del promotor de VE-cadh en células que sobre-expresaban SOD3. De acuerdo a los datos mostrados el primer apartado, el aumento en los niveles de SOD3 lleva parejo un incremento en los niveles intracelulares de NO; bloqueando la

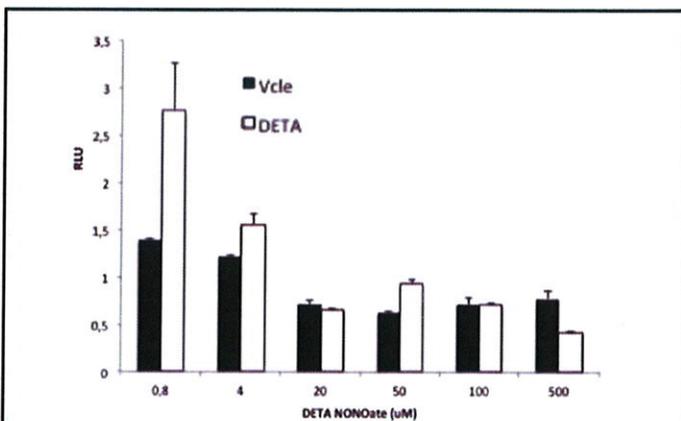


Fig. 7. Efecto dual del NO sobre la actividad del promotor de VE-cadh. Células endoteliales transfectadas con el promotor de 2.6 Kb de VE-cadh se trataron con distintas concentraciones de DETA NONOate (blanco) o vehículo (negro) durante 24h y se analizó la actividad luciferasa. Los datos muestran el cociente f-luc/r-luc en cada condición (n = 3).

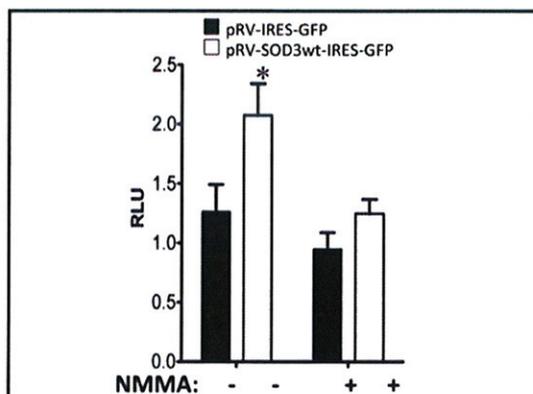


Fig. 8. SOD3 requiere del NO para activar el promotor de VE-cadh. Células endoteliales transfectadas con el promotor de VE-cadh y SOD3 (blanco) o control (negro) se trataron con NMMA (+) o vehículo (-). Los datos muestran el cociente f-luc/r-luc en cada condición (n = 3). * p<0.05, 2-tail Student's t-test.

síntesis de NO, SOD3 ya no sería capaz de aumentar dichos niveles y por tanto no debería haber un aumento de la actividad del promotor debido a la sobre-expresión de SOD3. Transfectamos las células endoteliales 1G11 con las construcciones p2.5k-VE-cadh-f-luc, pbasic-r-luc, p-SOD3 o GFP (como control), y tratamos dichas células con NMMA, un pan-NOS inhibidor. Observamos que el tratamiento con NMMA (un pan-inhibidor de las NOS) inhibió significativamente el efecto de activación del promotor mediado por SOD3 (Fig. 8). Estos datos indican que el efecto de SOD3 sobre la transcripción de VE-cadh está mediado por la regulación del NO intracelular.

A continuación, realizamos distintos mutantes de delección del promotor de 2.5KB, con el fin de acotar las regiones del promotor implicadas en el efecto transcripcional. En este caso, transfectamos las células 1G11 con SOD3, como un mecanismo para aumentar los niveles de NO intracelular. Se ensayaron 4 construcciones del promotor con una longitud de 2460 pb, 1054 pb, 515 pb y 266 pb; esta última contiene el promotor basal con los sitios EBS2 y EBS4. Observamos que el aumento de la

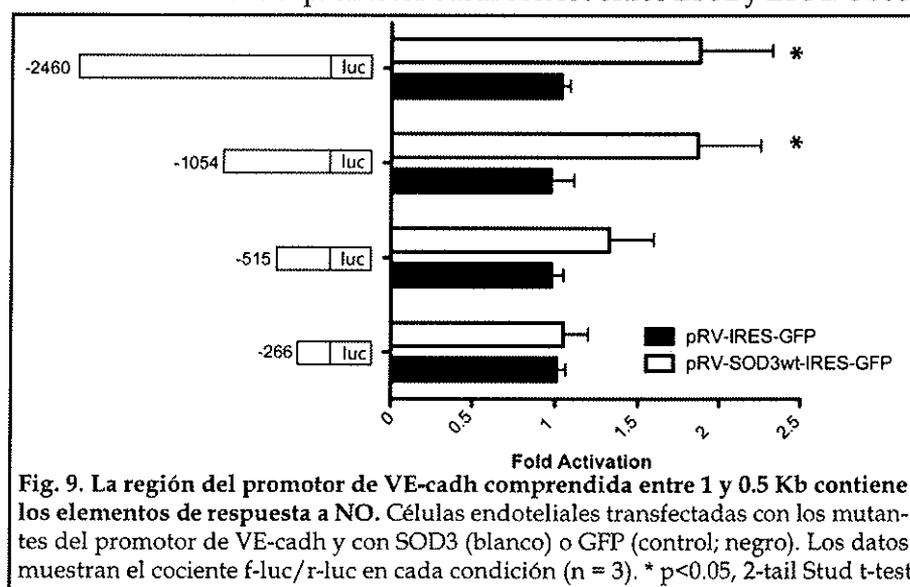


Fig. 9. La región del promotor de VE-cadh comprendida entre 1 y 0.5 Kb contiene los elementos de respuesta a NO. Células endoteliales transfectadas con los mutantes del promotor de VE-cadh y con SOD3 (blanco) o GFP (control; negro). Los datos muestran el cociente f-luc/r-luc en cada condición (n = 3). * p<0.05, 2-tail Stud t-test

actividad del promotor de VE-cadh mediado por la sobreexpresión de SOD3 ocurría con los promotores de 2.5 y 1.0 kb, pero no con el de 500 b (Fig. 9). Esto indica que la región del promotor responsable al aumento transcripcional de VE-cadh mediado

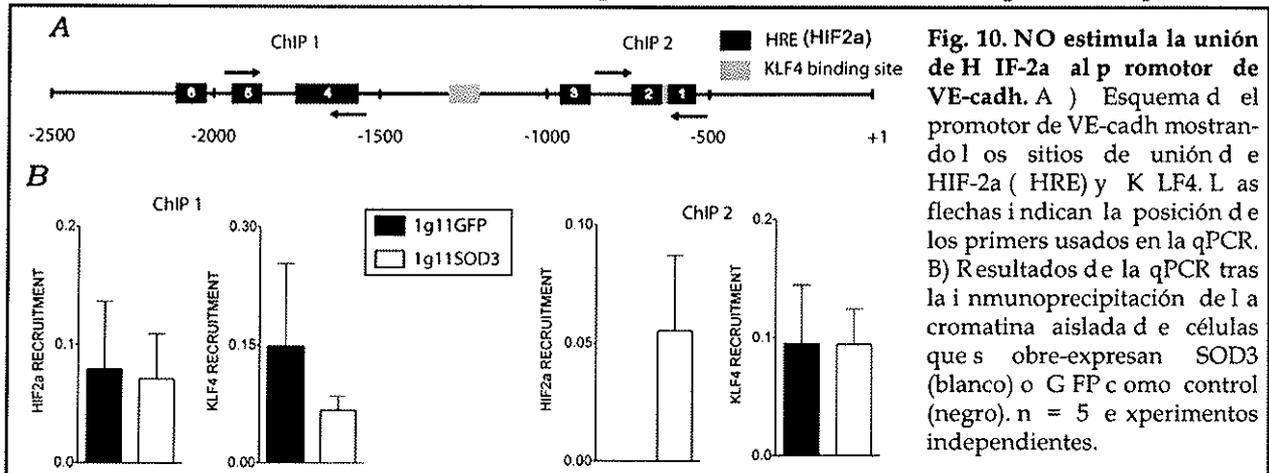
por SOD3/NO debe comprenderse en una región del promotor entre 1000 y 500 bases upstream del comienzo de transcripción.

Identificación de HIF-2alpha como mediador de la actividad de NO sobre el promotor de VE-cadh.

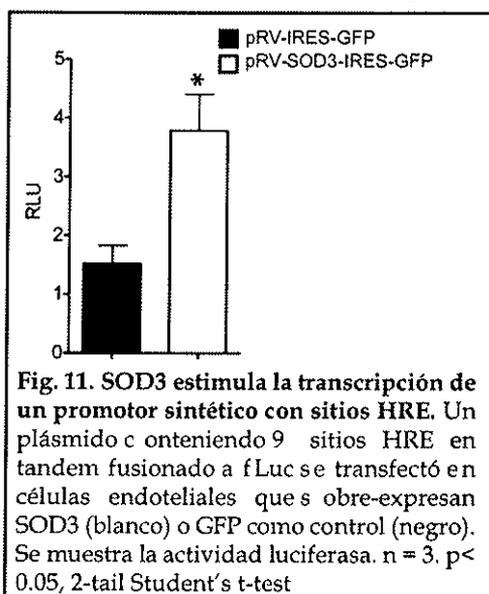
Si bien los anteriores resultados indican que el SOD3 regula la actividad transcripcional del promotor de VE-cadh a través del NO, desconocemos cual es el mecanismo por el cual ocurre dicha regulación. Inicialmente nos planteamos dos posibles escenarios: (1) que el NO aumentara directamente la actividad de un factor de transcripción capaz de unirse al promotor de VE-cadh e inducir su actividad, o (2) que el NO modificara el grado de metilación del promotor de VE-cadh permitiendo la unión del factor de transcripción KLF4, cuya actividad sobre el promotor ha sido reportada.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la Fig. 9, realizamos una búsqueda de factores de transcripción que pudieran unirse a la región del promotor de VE-cadh comprendida

entre 500-1000 bases upstream del inicio de transcripción. Encontramos que en esta región había tres sitios consenso para la unión del factor de transcripción HIF-2a (hypoxia inducible factor-2-alpha, EPAS1) y dos sitios de unión del factor de transcripción KLF4 (Fig. 10A). Con el fin de determinar si estos factores se unían de facto al promotor de VE-cadh y si dicha unión era alterada por SOD3, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células que sobre-expresaban o no SOD3, usando anticuerpos específicos contra estos dos factores de transcripción; posteriormente, se determinó la cantidad de DNA genómico inmunoprecipitado en cada condición mediante la amplificación por PCR cuantitativa de dos regiones del promotor,



una dentro de la región entre 500-1000 bases y otra en una región distante (1.5-2.0 kb) que también posee sitios de unión de estos factores. El protocolo de fragmentación de cromatina usado genera fragmentos de unas 500 pb, según se verificó en gel (datos no mostrados). Los resultados mostraron que la expresión de SOD3 aumentaba de forma consistente la unión de HIF-2a a la región proximal del promotor de VE-cadh; por el contrario la cantidad de KLF4 inmunoprecipitada fue similar entre las células que sobreexpresaban o no SOD3 (Fig. 10B). Es interesante señalar que la sobre-expresión de SOD3 aumentó directamente la actividad de un promotor artificial constituido por 9 sitios HRE (hipoxia responsable elements), que son consenso para la unión de HIF-2a (Fig. 11). Estos datos indican que SOD3/NO aumentan la cantidad de HIF-2a que se une al promotor proximal de VE-cadh a través de los sitios HRE presentes en dicho promotor; esto conduce a una mayor expresión del mRNA de VE-cadh. La falta de efecto en la unión del factor de transcripción KLF4 al promotor de VE-cadh descarta el segundo mecanismo de regulación (regulación epigenómica).



para la unión de HIF-2a (Fig. 11). Estos datos indican que SOD3/NO aumentan la cantidad de HIF-2a que se une al promotor proximal de VE-cadh a través de los sitios HRE presentes en dicho promotor; esto conduce a una mayor expresión del mRNA de VE-cadh. La falta de efecto en la unión del factor de transcripción KLF4 al promotor de VE-cadh descarta el segundo mecanismo de regulación (regulación epigenómica).

Con el fin de delimitar en mayor detalle los sitios del promotor de VE-cadh a los que se une HIF-2a en respuesta a SOD3, realizamos experimentos de

mutagénesis dirigida en los tres sitios HRE presentes en el promotor de VE-cadh. Para ello, co-transfectamos cada una de las construcciones del promotor con un plásmido que sobre-expresa SOD3 o GFP (control), y se analizó la activación del promotor midiendo la actividad luciferasa. Como se muestra (Fig. 12), la sobreexpresión de SOD3 aumento la actividad del promotor tanto en la forma del promotor silvestre, como en el promotor en el que se eliminó el sitio HRE1 (el más próximo al inicio de la transcripción). Por el contrario, la eliminación de los sitios HRE2 o HRE3 eliminó

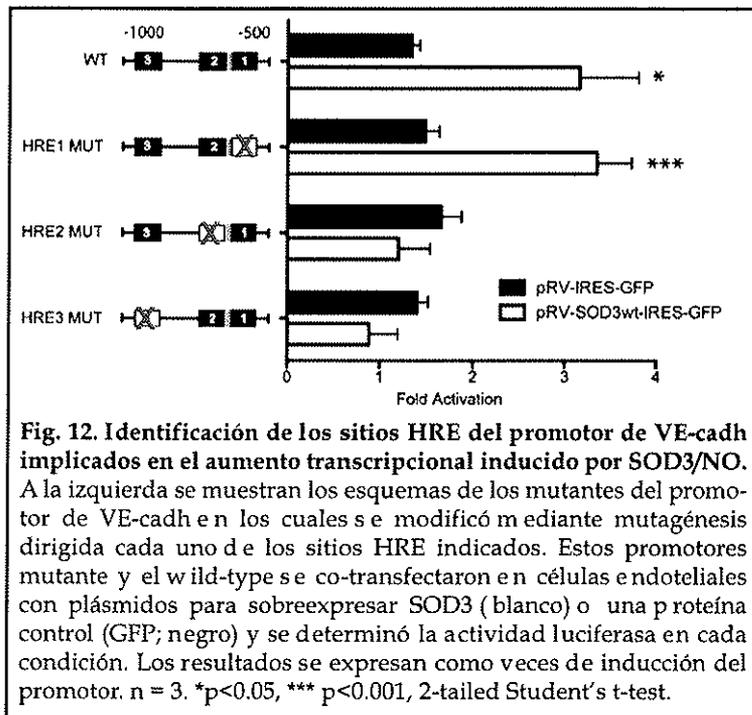


Fig. 12. Identificación de los sitios HRE del promotor de VE-cadh implicados en el aumento transcripcional inducido por SOD3/NO. A la izquierda se muestran los esquemas de los mutantes del promotor de VE-cadh en los cuales se modificó mediante mutagénesis dirigida cada uno de los sitios HRE indicados. Estos promotores mutante y el wild-type se co-transfectaron en células endoteliales con plásmidos para sobreexpresar SOD3 (blanco) o una proteína control (GFP; negro) y se determinó la actividad luciferasa en cada condición. Los resultados se expresan como veces de inducción del promotor. n = 3. *p<0.05, *** p<0.001, 2-tailed Student's t-test.

totalmente el efecto potenciador de SOD3 sobre la activación del promotor. Estos resultados indican que la vía SOD3/NO aumenta la unión de HIF-2a a los sitios HRE2 y HRE3 del promotor de VE-cadh.

Con el fin de implicar funcionalmente HIF-2a como mediador de la actividad transcripcional de SOD3 y NO sobre el promotor de VE-cadh, realizamos experimentos de actividad del promotor en fibroblastos, los cuales no expresan HIF-2a endógeno. En

condiciones basales (ausencia de HIF-2a), la actividad del promotor de VE-cadh es muy baja y la sobre-expresión de SOD3 (Fig. 13A) o el tratamiento con el dador de NO DetaNONOate (Fig. 13B)

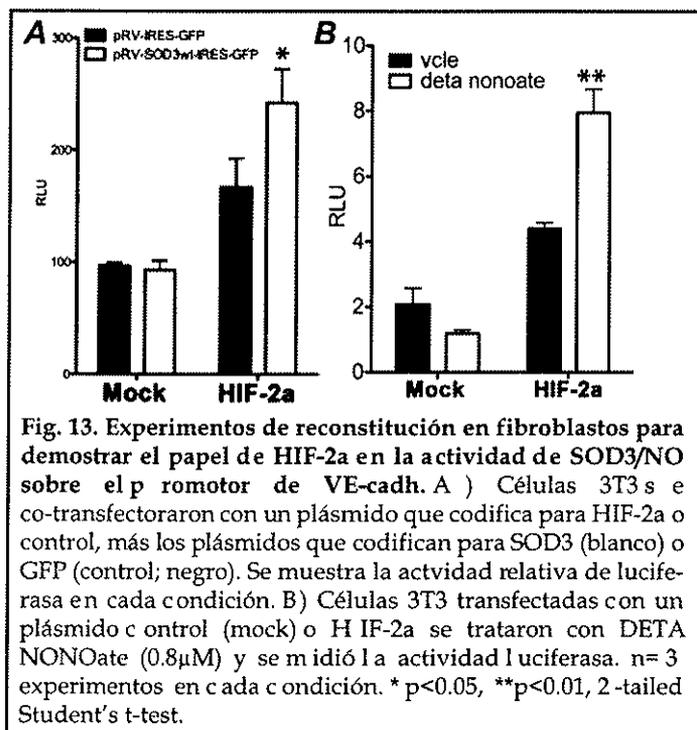


Fig. 13. Experimentos de reconstitución en fibroblastos para demostrar el papel de HIF-2a en la actividad de SOD3/NO sobre el promotor de VE-cadh. A) Células 3T3 se co-transfectaron con un plásmido que codifica para HIF-2a o control, más los plásmidos que codifican para SOD3 (blanco) o GFP (control; negro). Se muestra la actividad relativa de luciferasa en cada condición. B) Células 3T3 transfectadas con un plásmido control (mock) o HIF-2a se trataron con DETA NONOate (0.8µM) y se midió la actividad luciferasa. n= 3 experimentos en cada condición. * p<0.05, **p<0.01, 2-tailed Student's t-test.

no afecta a dicha actividad. La expresión de HIF-2a en estas células aumenta la actividad basal del promotor; en estas condiciones tanto la sobre-expresión de SOD3 (Fig. 13A) como el tratamiento con DetaNONOate (Fig. 13B) potencian la actividad del promotor de VE-cadh. Estos experimentos de reconstitución indican que HIF-2a es absolutamente necesaria para el aumento de la actividad transcripcional de VE-cadh por SOD3 y el NO.

Regulación de la estabilidad de HIF-2alpha por el NO.

Ya que HIF-2a parece ser el factor de transcripción esencial en el efecto de SOD3/NO sobre

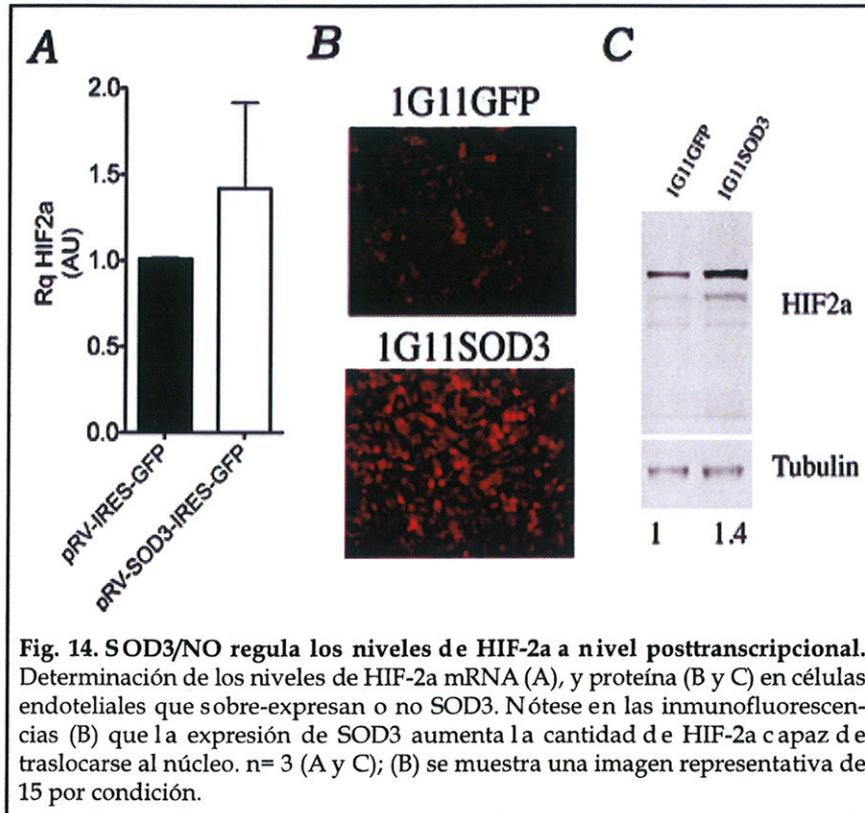


Fig. 14. SOD3/NO regula los niveles de HIF-2a a nivel posttranscriptional. Determinación de los niveles de HIF-2a mRNA (A), y proteína (B y C) en células endoteliales que sobre-expresan o no SOD3. Nótese en las inmunofluorescencias (B) que la expresión de SOD3 aumenta la cantidad de HIF-2a capaz de traslocarse al núcleo. n= 3 (A y C); (B) se muestra una imagen representativa de 15 por condición.

la activación del promotor de VE-cadh, decidimos analizar si la expresión de SOD3 o el NO cambia los niveles de dicha proteína. La sobre-expresión de SOD3 no cambió significativamente los niveles del mRNA de HIF-2a medidos por PCR cuantitativa (Fig. 14A). Sin embargo, si observamos cambios en los niveles de proteína de HIF-2a, tanto a nivel de inmunofluorescencia (Fig. 14B) como mediante

inmunoblot (Fig. 14C). Más aún, las inmunofluorescencias mostraron un mayor número de células con tinción intranuclear de HIF-2a en las células que sobre-expresaban SOD3 (Fig. 14B). Estos resultados indican que la vía SOD3/NO regula los niveles de HIF-2a a nivel posttranscriptional.

Un posible mecanismo por el cual SOD3/NO puede regular la estabilidad de HIF-2a es mediante el control de la actividad de las enzimas proil-hidroxilasas (PHD). Las PHD son las enzimas encargadas de hidroxilar residuos

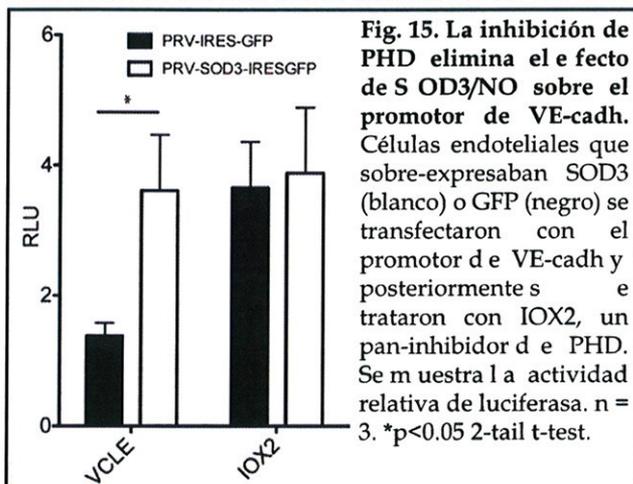
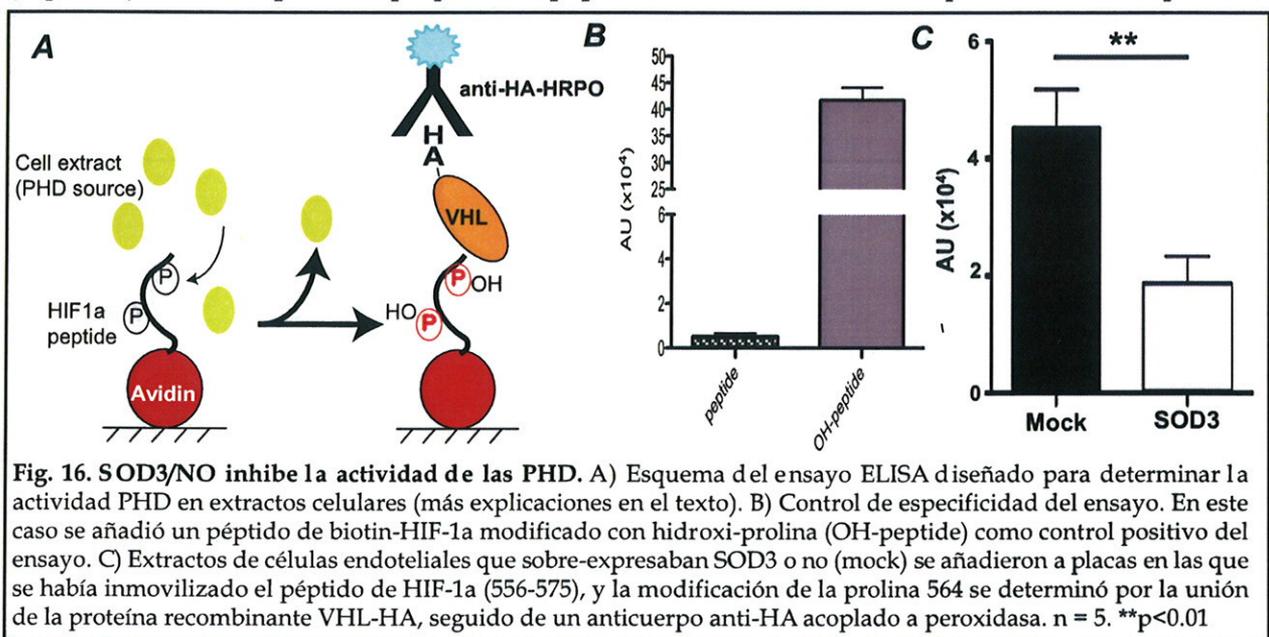


Fig. 15. La inhibición de PHD elimina el efecto de SOD3/NO sobre el promotor de VE-cadh. Células endoteliales que sobre-expresaban SOD3 (blanco) o GFP (negro) se transfectaron con el promotor de VE-cadh y posteriormente se trataron con IOX2, un pan-inhibidor de PHD. Se muestra la actividad relativa de luciferasa. n= 3. *p<0.05 2-tail t-test.

enzimas encargadas de hidroxilar residuos conservados de prolina de HIF-2a, lo que permite su ubiquitinación por el supresor tumoral VHL (von Hippel-Lindau), una E3-ubiquitin ligasa; esta modificación marca a HIF-2a para su rápida degradación por el proteosoma. Para analizar si las PHD estaban implicadas en el aumento de la transcripción de VE-

cadh, transfectamos el promotor de VE-cadh en células 1G11 que sobre-expresaban o no SOD3 y tratamos estas células con el inhibidor de PHD2, IOX2. En células tratadas con el vehículo (control), la sobreexpresión de SOD3 aumentó de forma significativa la transcripción del reporter; el tratamiento con IOX2 promovió un aumento notable de la transcripción en las células control y, lo que fue más relevante, dicha transcripción no aumentó por la sobreexpresión de SOD3 (Fig. 15). Estos resultados sugieren que el aumento de la actividad transcripcional del promotor de VE-Cadh mediado por la ruta SOD3/NO involucra la actividad enzimáticas de las PHD.

Con el fin de analizar si SOD3/NO podrían afectar directamente la actividad de las PHD pusimos a punto un ELISA para detectar la actividad de estas enzimas en extractos celulares (Fig. 16A). Por una parte se preparó un péptido sintético biotinilado que contiene las prolinas

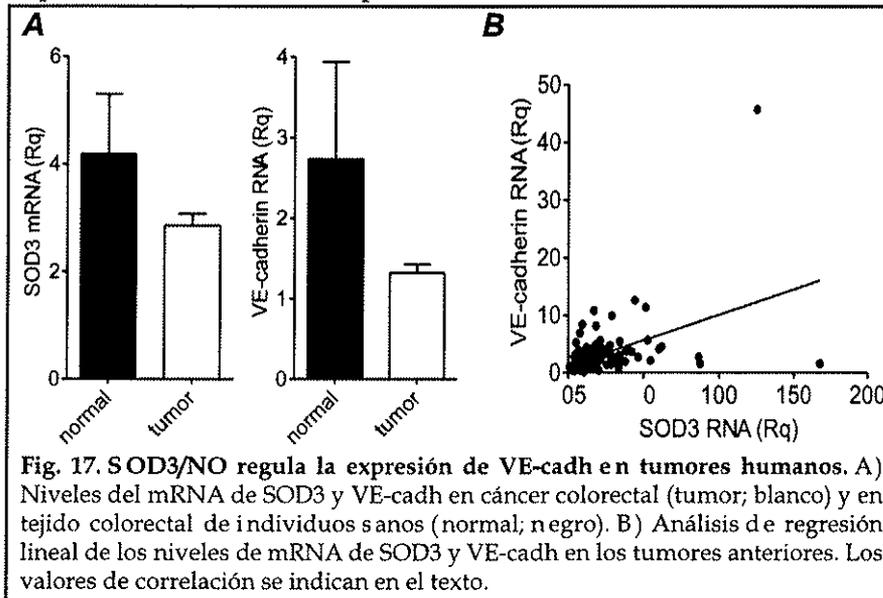


susceptibles de ser hidroxiladas del factor HIF-1a; este péptido se añadió a placas tapizadas con avidina y, tras los lavados para eliminar el exceso de péptido, se añadió extracto de células que sobre-expresaban o no SOD3. Estos extractos contienen la actividad PHD que modificará las prolinas del péptido sintético, lo cual se reveló posteriormente con la proteína HA-VHL y un anticuerpo anti-HA acoplado a peroxidasa. En la Fig. 16B se muestra la unión de HA-VHL al péptido no hidroxilado o hidroxilado de forma artificial (adición de hidroxiprolina durante la síntesis), lo que demuestra que este sistema de revelado es altamente específico para el péptido hidroxilado. El análisis de la actividad PHD en extractos celulares demostró que la sobre-expresión de SOD3 disminuye la actividad de las PHD comparado con las células control (Fig. 16C). Estos resultados indican que SOD3/NO impide la degradación de HIF-2a mediante la inhibición de las PHD.

Correlación entre los niveles de SOD3 y VE-cadh en tumores primarios humanos.

Aunque no estaba contemplado en la propuesta inicial, quisimos analizar si la asociación entre

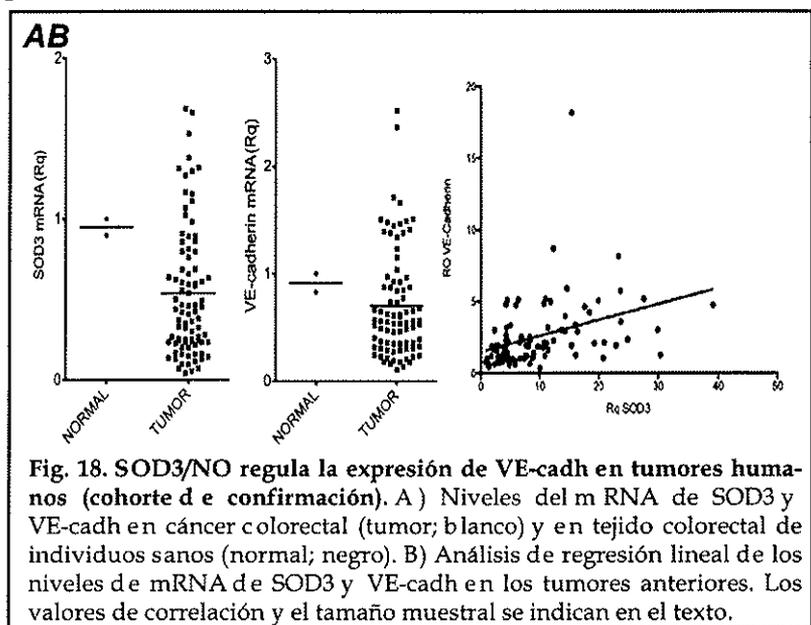
SOD3/NO y VE-Cadh ocurría en tumores humanos. En colaboración con el grupo del Dr. Díaz-Rubio (Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid), inicialmente estudiamos la expresión de SOD3 y VE-cadh en muestras congeladas (tumores primarios) de una cohorte de 105 pacientes de cáncer colorectal (CCR). Observamos que los niveles del mRNA de SOD3 y de VE-Cadh estaban disminuidos en el tumor comparados con los niveles en el tejido no-tumoral (Fig. 17A). La menor expresión de estos transcritos no estaba asociada al estadio tumoral ni a un subtipo específico de CCR. Sin embargo,



si encontramos una correlación significativa entre los niveles de SOD3 y VE-cadh ($r^2=0.2032$, $p<0.0001$; Fig. 17B); esto es, los tumores que tenían mayores niveles de SOD3 también los tenían de VE-cadh

y viceversa. En esta cohorte no se disponía de datos de supervivencia, por lo que no pudimos establecer una correlación con este parámetro.

Con el fin de profundizar más en este aspecto, estudiamos los niveles de mRNA para SOD3 y VE-cadh aislados de 88 muestras parafinadas de una cohorte multicéntrica de pacientes con CCR grado III. De nuevo observamos que los niveles de SOD3 y VE-Cadh eran significativamente menores en el tejido tumoral que en el tejido sano (Fig. 18A), así como una correlación positiva



entre VE-Cadh y SOD3 ($r^2=0.1343$, $p=0.0004$; Fig. 18B). Ya que disponíamos de microarray de tejido de estos tumores, decidimos estudiar si también existía una correlación entre los niveles de SOD3 y de HIF-2a en el estroma que rodea al tumor. Para ello se tiñeron los tejidos con CD34 (marcador endotelial), SOD3 y HIF-2a, y se cuantificó el % de área teñida y la intensidad de tinción en el estroma tumoral; calculamos un score para cada muestra tumoral multiplicando ambos

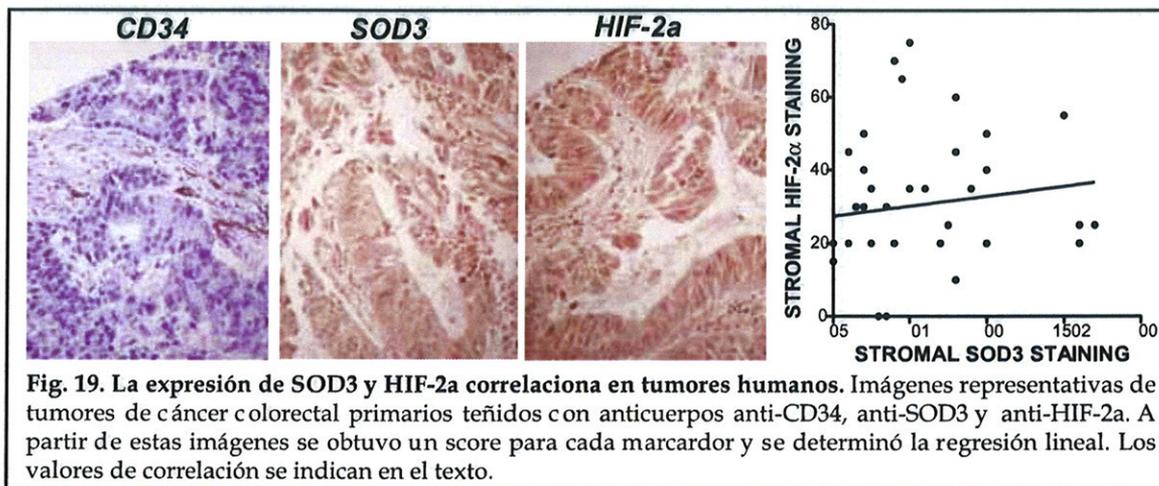


Fig. 19. La expresión de SOD3 y HIF-2α correlaciona en tumores humanos. Imágenes representativas de tumores de cáncer colorectal primarios teñidos con anticuerpos anti-CD34, anti-SOD3 y anti-HIF-2α. A partir de estas imágenes se obtuvo un score para cada marcador y se determinó la regresión lineal. Los valores de correlación se indican en el texto.

parámetros para convertirlo en una variable continua. De nuevo encontramos una asociación significativa entre la tinción de SOD3 y HIF-2α en las muestras tumorales ($r^2= 0.2753$, $p<0.045$; Fig. 19A,B). En estos momentos estamos a la espera de tener el seguimiento clínico a 5 años de estos pacientes, para poder establecer una correlación de estos parámetros con la supervivencia.

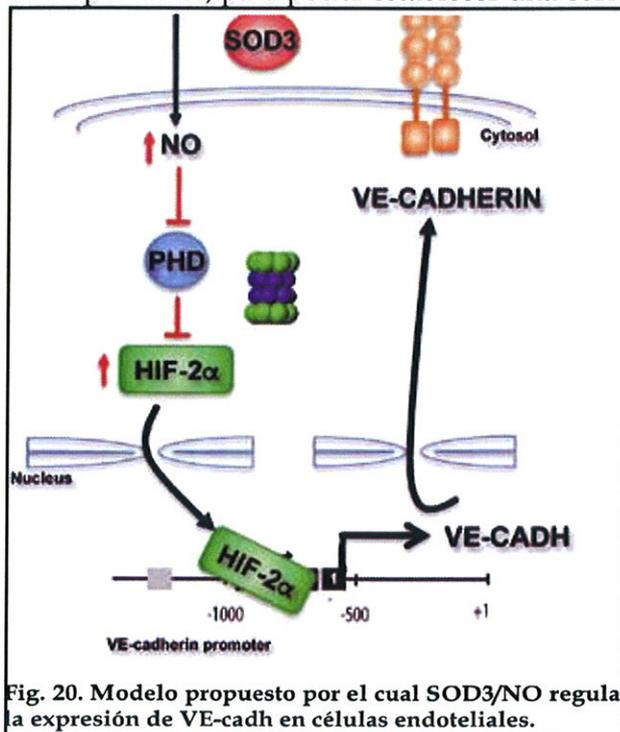


Fig. 20. Modelo propuesto por el cual SOD3/NO regula la expresión de VE-cadh en células endoteliales.

aumenta la cantidad de NO en el interior de las células vasculares que entonces inhibe a las PHD y aumenta la estabilidad de HIF-2α al prevenir su degradación por el proteosoma. Los niveles más altos de HIF-2α permiten su unión a los sitios HRE2 y HRE3 del promotor proximal de VE-cadh, lo que estimula la transcripción de VE-cadh y las interacciones intercelulares en el endotelio. En modelos de cáncer de ratón, el re-expresión de SOD3/NO y de VE-cadh en las células endoteliales mejora la entrada de agentes quimioterapéuticos y la inhibición del crecimiento tumoral. Es interesante señalar que esta asociación entre SOD3 y VE-cadh existe en tumores humanos de cáncer colorectal. Esperamos que los datos de seguimiento clínico nos permitan establecer también una correlación entre la vía SOD3/NO y la respuesta al tratamiento en estos pacientes.

Resumen de los principales resultados obtenidos en el proyecto

1. Hemos demostrado que la actividad enzimática de SOD3 es necesaria para aumentar la biodisponibilidad del NO y la función barrera del endotelio. Esta función barrera depende a su vez del NO.
2. Hemos demostrado que el NO regula directamente la actividad del promotor de VE-Cadherina con un efecto dual: a bajas concentraciones aumenta la transcripción mediada por este promotor mientras que a altas concentraciones la inhibe.
3. Hemos demostrado que SOD3 aumenta la actividad transcripcional del promotor de VE-cadherina de forma dependiente del NO
4. Hemos identificado el factor de transcripción HIF-2a como el mediador del aumento de transcripción de VE-cadherina inducido por SOD3/NO. Así mismo hemos demostrado que SOD3/NO aumenta la unión de HIF-2a a sitios específicos dentro del promotor de VE-cadherina.
5. Hemos demostrado que SOD3/NO aumenta la estabilidad de HIF-2a al inhibir la actividad de las PHD y su posterior degradación por el proteosoma.
6. Hemos observado una correlación positiva entre los niveles de SOD3 y VE-cadherina en tumores primarios de cáncer colorectal procedentes de dos cohortes. Estamos a la espera de los datos clínicos para analizar su asociación con la respuesta al tratamiento.

Presentaciones en congresos en los que se ha agradecido la financiación de la Fundación

- "Extracellular superoxide dismutase (SOD3) positively regulates VE-cadherin expression and improves tumor vascular function". Mira E, Carmona L, Heras I, Tardáguila M, Paz-Cabezas M, Oury TD, Díaz-Rubio E, Pérez-Villamil B, Mañes S. II International Immunothercan Symposium "Inflammation & Immunity in Cancer". Madrid. 3-4 December 2015.
- "SOD3 attenuates NF-kB activity in endothelial cells and enhances T cell infiltration of tumours". Carmona-Rodríguez L, Mira E, Franch M, Oury TD, Mañes S. II International Immunothercan Symposium "Inflammation & Immunity in Cancer". Madrid. 3-4 December 2015.
- "Re-programación del estroma tumoral en la terapia del cáncer". Mañes S. 41th Congreso Asociación Española de Enfermedades Hepáticas. Madrid, 17-19 Feb. 2016

Publicaciones

Aunque los datos obtenidos permitirían en estos momentos la obtención de publicaciones, consideramos que los resultados son tan interesantes que tenemos posibilidades de publicar en revistas de muy alto impacto. Para ello, hemos diseñado dos nuevos modelos de ratón en los cuales verificar la hipótesis *in vivo*, además de obtener los datos de seguimiento clínico de la cohorte de pacientes con cáncer colorectal que estamos analizando. Estimamos que la obtención de estos nuevos datos se culminará a finales de este año, momento en el que comenzaremos a preparar el/los manuscrito(s). Se agradecerá a la Fundación Domingo Martínez su financiación en todas las publicaciones derivadas de estos resultados.