

CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE ROCHE FARMA S.A. Y LA FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL, PARA LA INVESTIGACIÓN EN EL ÁREA DE ONCOLOGÍA

C19/016

En Madrid, a 26 de Febrero de 2019

REUNIDOS

De una parte: en calidad de Presidenta, actuando en nombre y representación de la FUNDACION PÚBLICA ANDALUZA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL (FIBAO), domiciliada en Avda. de Madrid, 15, Pabellón de Consultas Externas 2, 2ª Planta C.P.18012 de Granada y con CIF G-18374199 (en adelante denominada "**la Fundación**");

De otra parte: "Roche Farma, S.A." (en lo sucesivo denominada también "**Roche**"), domiciliada en Madrid, calle Ribera del Loira 50 y con CIF A-08023145, representada en este acto por sus apoderados

EXPONEN

- I. Que la Fundación es una entidad sin ánimo de lucro, que incluye entre sus fines fundacionales la colaboración en el desarrollo de la investigación biomédica, y que está desarrollando un proyecto de investigación en el "Papel del NDRG1 como Biomarcador de Agresividad y Diana Terapéutica en Cáncer de Mama Triple Negativa" (en adelante, "el Proyecto"), en el Complejo Hospitalario de Jaén, bajo la coordinación de [redacted] para ello cuenta/contará con la evaluación del Comité correspondiente, quien otorgará, si fuera necesario, la autorización para su realización.

Asimismo, la Gerencia/Dirección Económica del Hospital conoce y está de acuerdo con la realización del proyecto científico/experimental.

Por lo tanto, la Fundación está en disposición de suscribir convenios de colaboración con terceros para la mejor financiación del proyecto de investigación.

- II. Que Roche es un laboratorio farmacéutico interesado en apoyar los avances biomédicos, y en particular el proyecto identificado en el Expositivo I, a fin de facilitar la difusión del conocimiento sobre Oncología.



- III. En relación con lo anterior, se adjunta como Anexo I del presente Convenio la memoria/protocolo del proyecto de investigación, como Anexo II el presupuesto global desglosado que incluye la relación de gastos previstos en relación con el proyecto, y como Anexo III la solicitud de colaboración previa emitida por la Fundación.

Y por ello, reconociéndose capacidad suficiente para formalizar el presente convenio de colaboración, las partes

ACUERDAN

Primero.- Objeto

Roche se compromete a realizar una aportación a la Fundación para el buen desarrollo del proyecto identificado en el Expositivo I. La Fundación destinará esos fondos a financiar el citado proyecto en el centro, poniéndolo a disposición del equipo de investigación, todo ello de conformidad con lo establecido en los Anexos I y II adjuntos al presente Convenio.

La aportación de Roche, que tendrá carácter mayoritario, se concreta en la cantidad CUARENTA MIL EUROS [40.000€], destinados a financiar recursos necesarios para el buen fin del proyecto y tendrá el carácter de irrevocable en la medida en que éste efectivamente se realice con el alcance previsto.

Segundo.- Forma de pago

La cantidad indicada, será facturada a Roche por la Fundación según el siguiente calendario:

- 50% a la firma del contrato
- 50% a la finalización del proyecto, sujeto a la previa entrega de la memoria de actividades.

Roche abonará la factura o documento equivalente para pago en los 60 días siguientes a su fecha de emisión a la siguiente cuenta bancaria IBAN [ES0820383699016000157216], titularidad de la Fundación.

De la aportación total destinada a la actividad, la Fundación detraerá en el momento del cobro el 15% en concepto de costes indirectos (Overhead), según la estipulación Sexta, artículo 1.b del Convenio con fecha 7 de febrero de 2012 entre el Servicio andaluz de Salud y la Red de Fundaciones Gestoras de Investigación del SSPA.

Sin perjuicio de lo anterior, la Fundación se compromete a devolver a Roche la cantidad aportada si finalmente no se llegara a realizar el proyecto, o bien a ajustarla, si se realizase con un alcance inferior al inicialmente previsto.



Roche podrá solicitar a la Fundación un informe justificativo del desarrollo del proyecto, para justificar el buen fin de los fondos, sin que esta información pueda considerarse un beneficio/derecho para Roche.

La Fundación se compromete a destinar los fondos a la realización del proyecto; si la aportación no se empleara íntegramente para la financiación del proyecto, ambas partes acordarán una solución satisfactoria para las dos.

Tercero.- Duración

La duración del presente convenio se establece por el período de un año desde la firma del presente acuerdo. No obstante la anterior, la Fundación deberá entregar la memoria de actividades antes de la finalización de dicho plazo –preferiblemente en el plazo máximo de un año–, para contar con tiempo suficiente para analizar la misma y tramitar el pago final previsto en la Cláusula segunda. Para prórrogas de la colaboración, será necesaria la formalización de la misma por ambas partes.

Cuarto.- Conflicto de interés. Transparencia

Tanto Roche como la Fundación cumplirán en todo momento con la legislación aplicable, sin que conozcan conflicto de interés alguno que pudiera evitar la aceptación y entrega de esta colaboración. Asimismo, serán transparentes en todo momento en relación con la misma.

En ningún caso se entrega ni se recibe esta cantidad para un uso o beneficio personal o para influir en la prescripción, dispensación, venta o recomendación de ningún medicamento ni otro producto de Roche.

La Fundación declara, asimismo, que el importe de esta colaboración, sumada a cualesquiera otras que pueda recibir de Roche a lo largo de este año, no superarán el 30% de sus ingresos o presupuesto para dicho período.

El presente acuerdo en ningún caso significará o justificará la existencia de una relación laboral o de dependencia entre las partes.

Esta aportación será publicada en la web de Roche conforme a lo establecido en el Código de Buenas Prácticas de la Industria Farmacéutica, dado que se trata de una aportación a una entidad considerada como Organización Sanitaria, a los efectos del citado Código.

Quinto.- Confidencialidad. Datos personales

Ambas partes mantendrán la confidencialidad sobre las informaciones y documentos a los que accedan como consecuencia de la colaboración aquí reflejada, salvo que se trate de información de dominio público o cuente con la autorización expresa de la otra parte. Esta obligación de confidencialidad se mantendrá por un período de cinco (5) años. Este compromiso de confidencialidad no será aplicable respecto de aquellas informaciones que las partes ya conocieran y no estuvieran obligados a mantenerlas confidenciales.

En cumplimiento de la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal y del Reglamento UE 2016/679, ambas Partes quedan informadas de forma inequívoca y precisa de que los datos de

carácter personal que se facilitan en el presente Contrato, así como cualesquiera otros que sean facilitados a lo largo de la relación que en el mismo se establece, se integrarán en un fichero de datos informatizado de la responsabilidad, respectivamente, de cada una de las Partes y podrán ser utilizados para la gestión y cumplimiento adecuado de las relaciones que en el presente Contrato se establecen y la gestión de los cobros y pagos consecuencia de los mismos, en caso de haberlos. Únicamente tratarán los datos personales para el cumplimiento de las finalidades descritas anteriormente, respetando en todo caso la legislación vigente.

Los interesados podrán ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación, limitación, portabilidad y oposición, cuando corresponda, mediante carta o escrito dirigido a la dirección de correo: spain.datospersonales@roche.com identificándose mediante nombre, apellidos y fotocopia del DNI. Asimismo, se podrá contactar con la Agencia Española de Protección de Datos.

En todo caso Roche no tendrá acceso a datos de carácter personal relativos al propio proyecto científico que no hayan sido previamente disociados, impidiendo la identificación de individuos concretos.

Sexto.- Farmacovigilancia

Si en el curso de la actividad cubierta por el presente Acuerdo la Fundación tuviera conocimiento de informes de sospecha de Acontecimientos adversos/Situaciones especiales y otros Tipos de Casos*/ Reclamaciones de Producto asociados con el uso de un medicamento de Roche, esto deberá notificarse al Departamento de Farmacovigilancia de Roche en el plazo de un día hábil según se detalla a continuación. Para notificaciones de seguridad a nivel local a Roche Farma:

C/ Ribera del Loira, 50, 28042, Madrid

Tel: 91 324 8183

Fax: 91 324 8198

madrid.drug_safety@roche.com

**Embarazo/Lactancia, Uso en población pediátrica o en ancianos, Falta de eficacia, Sobredosis, Uso indebido, Abuso, Uso fuera de indicación, Error de medicación (incluidos Error de medicación interceptado y Error de medicación potencial), Exposición laboral, Datos relacionados con la sospecha de transmisión de un agente infeccioso por medio de un medicamento, Interacción farmacológica, Medicamentos falsificados (tanto sospechas como falsificaciones confirmadas) y Sospechas de Acontecimientos Adversos derivadas de demandas colectivas*

Séptimo.- Otros pactos

Este acuerdo comprende todos los pactos entre las partes relativos a la colaboración en la financiación del proyecto y sustituye cualquier acuerdo anterior con el mismo objeto, tanto verbal como escrito. Ninguna de las partes estará facultada para ceder este acuerdo o parte de él a un tercero sin la autorización previa por escrito de la otra parte.

La Fundación se compromete a hacer constar y a difundir de forma razonable y adecuada la colaboración de Roche, mediante la mención de Roche, o la exhibición de su logotipo, en las comunicaciones orales o escritas sobre el desarrollo del proyecto. Roche proporcionará, en su caso,



los materiales impresos necesarios al efecto (cartelería, etc.). Dicha mención no se considerará un beneficio para Roche.

El presente convenio se acoge a la regulación prevista en el artículo 25 y concordantes de la Ley 49/2002 de 23 de diciembre, regulándose por lo aquí expresamente pactado y, en lo no previsto, por lo establecido en la citada Ley y en la demás legislación aplicable.

Y en prueba de conformidad lo firman las partes por duplicado y a un solo efecto, en el lugar y la fecha arriba indicados.

Por la **FUNDACIÓN FIBAO**

Por **ROCHE FARMA, S.A**

En señal de conocimiento y aceptación,

VºBº Investigador principal

VºBº Gerencia centro



G

SOLICITUD COLABORACIÓN DE ROCHE PARA PROYECTO

PUEDE SUSTITUIRSE POR SOLICITUD DE LA ENTIDAD QUE INCLUYA AL MENOS ESTOS DATOS

Roche Farma S.A. C/
Ribera del Loira, 50
28042 Madrid

Madrid, a 28 de Enero de 20 19

Asunto:

Colaboración económica para el apoyo de proyecto científico/experimental o formativo/informativo

Proyecto científico (no clínico)

Proyecto formativo/informativo

Otro:

Entidad Solicitante:

FIBAO

Persona de Contacto de la entidad:

Nombre

Correo Electrónico

Teléfono de Contacto 953.008.077

CIF: G-18374199

Objeto de la entidad: i.e: entidad sin ánimo de lucro, de carácter científico y educacional

Sin ánimo de lucro

Fundada en

Número de profesionales sanitarios que integra (No aplica a fundaciones):

- 0-10
 11-50
 más de 50
 n/a

Título del proyecto:

PAPEL DEL NDRG1 COMO BIOMARCADOR DE AGRESIVIDAD Y DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO



SE ADJUNTA: Memoria del Proyecto
Presupuesto global desglosado

Cantidad solicitada: 40.000,00

Mayoritaria (>50%)

Minoritaria (hasta 50%)

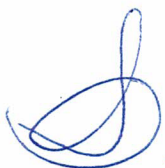
Firma del Solicitante:



Nombre y apellido:

Vinculación: Administrador
 Apoderado
 Colaborador

ATENCIÓN: Para respetar la independencia de las entidades con las que colabora, Roche no financiará más del 30% del presupuesto o ingresos anuales de esa entidad. Si prevé que puede superar ese porcentaje, por favor marque esta casilla



PAPEL DE NDRG1 COMO BIOMARCADOR DE AGRESIVIDAD Y DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

PRINCIPAL

INTRODUCCION

El cáncer de mama es el tipo tumoral más comúnmente diagnosticado en mujeres (23%) y se asocia con una elevada prevalencia, incidencia y tasa de mortalidad. El cáncer de mama se puede clasificar en diferentes tipos, basados en el estado de receptores hormonales de estrógeno (ER), progesterona (PR) y HER2: luminal A/B (ER+, PR+/-, HER2+/-), normal-like (similar al Luminal A), HER2 (ER-, PR-, HER2+), y basal, que incluye el cáncer de mama triple negativo (TNBC) (ER-, PR-, HER2-). El TNBC es una forma muy agresiva de cáncer de mama, con una baja tasa de supervivencia. Se caracteriza por ser muy proliferativo, heterogéneo, metástasis, resistencia a fármacos, e incidencia de recaídas, y está enriquecido en rutas de señalización relacionadas con agresividad como TGF β o mTOR. Sin embargo, hasta la fecha no existen terapias dirigidas aprobadas para su tratamiento. La resistencia al tratamiento y aparición de metástasis se deben a la existencia de una subpoblación de células iniciadoras de tumores o células madre de cáncer (CSCs), que están presentes en el tumor primario heterogéneo y que sirven para reiniciar el crecimiento tumoral y "sembrar" las metástasis tras la respuesta inicial a la quimioterapia. Las rutas de señalización embrionaria (TGF β , Wnt, Notch...) modifican las CSCs epiteliales hacia un fenotipo tipo mesenquimal más agresivo y metastásico a través de la activación de la llamada transición epitelial-mesenquimal (EMT), la cual surge durante los procesos de invasión y metástasis tumoral. La EMT promueve la generación de CSCs con una mayor capacidad de auto-renovación e iniciadora de tumores, menos proliferativas e incrementada resistencia a la apoptosis y quimioterapia. Por tanto, una terapia dirigida en TNBC basada en la inhibición de TGF β representa una aproximación realista para limitar los fenotipos EMT y tipo CSC más que el uso de agentes citotóxicos.

> N-Myc Downstream Regulated 1 (NDRG1) en cáncer. Resultados preliminares. NDRG1 se ha reportado como supresor tumoral y/o regulador negativo de metástasis en varios cánceres, incluyendo cáncer de mama, así como inductor de apoptosis y marcador de diferenciación. En diferentes estudios referidos a varios carcinomas humanos, el gen NDRG1 está desregulado; los cánceres de mama, próstata, colon-recto, esófago, páncreas, o cerebro muestran una baja expresión de NDRG1, y su sobreexpresión inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis. A pesar de su actividad de supresor tumoral/metástasis, la expresión de NDRG1 se correlaciona con un mal pronóstico en cáncer de hígado, pulmón, cuello de útero, o gástrico, lo que sugiere un efecto pleiotrópico y una actividad dependiente del tipo tumoral, tejido, contexto, o variante. En este sentido, en cáncer de mama, la elevada expresión de NDRG1, que además es mayor en tejido tumoral que en epitelio mamario, se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama invasivo comparado con aquellos in situ. Basados en estos estudios, sugerimos que NDRG1 podría tener un papel diferente al de supresor tumoral/metástasis en cáncer de mama invasivo y TNBC comparado con in situ y ER+; apoyando la idea de la hipótesis del pleiotropismo dependiente del tipo tumoral y/o contexto (ej. factores de crecimiento, microambiente, hipoxia...) en cáncer de mama. En este sentido, en nuestras investigaciones previas, y contrario a estudios anteriores, encontramos una fosforilación, en Thr346, incrementada tras el tratamiento con TGF β 1 en tres líneas celulares de TNBC (MDA-MB-231, SUM159PT, BT549). Como se ha indicado, TGF β es un promotor tumoral y de metástasis bien caracterizado, por tanto, es razonable pensar que NDRG1 podría estar implicado en tales efectos. Para confirmar esta hipótesis, silenciamos NDRG1 con TGF β 1 en líneas de TNBC (MDA-MB-231, SUM159PT, BT549, MDA-MB-436, Hs578T) y encontramos una tasa de migración reducida comparada con el control más TGF β 1 en células MDA-MB-231, Hs578T y MDA-MB-436. En términos de migración, estos resultados sugieren un efecto pleiotrópico en función del contexto/estímulo. Por el contrario, no se observó cambio en células SUM159PT y BT549, lo que parece indicar que, dependiendo del tipo celular, NDRG1 ejerce sus efectos pleiotrópicos a otros niveles (ej. proliferación, invasión, o CSCs). Ya que nuestros resultados y estudios previos sugieren que la actividad de NDRG1 en cáncer de mama depende del tipo

tumoral y el contexto, a continuación, nos preguntamos si existen **patrones de expresión de NDRG1 diferenciales y/o variaciones del número de copias (CNV) y un impacto sobre la supervivencia de los pacientes.** Usando la base de datos KM plotter, encontramos que una elevada expresión de NDRG1 (RNA) se correlaciona con una baja supervivencia libre de recaídas (RFS) en 3951 pacientes con cáncer de mama, así como en ER+ (n=2061), ER- (n=801), y TNBC (n=255). Adicionalmente, la elevada expresión de NDRG1 se correlaciona con una menor RFS en los subtipos basal (n=618), luminal A (n=1933) y luminal B (n=1149). En cuanto a los patrones de expresión y CNV diferenciales en pacientes, usamos la base de datos cBioPortal y encontramos que **NDRG1 está amplificado en el 23% de pacientes en cuatro bases de datos de cáncer de mama invasivo/metastásico (total n=3572): METABRIC (n=2173) (28), The Cancer Genome Atlas – TCGA (n=1080), Mutational Profile of Metastatic Breast Cancer (INSERM study, n=216) y The Metastatic Breast Cancer Project (n=103).** Las bases de datos METABRIC y TCGA también indican que la expresión de mRNA de NDRG1 está alterada en un 11% y un 16%, respectivamente. Notablemente, en 2051 pacientes con cáncer de mama invasivo, la amplificación y/o expresión alterada de mRNA se correlaciona con una supervivencia total más corta. Además, NDRG1 está amplificado en el 22.6% de 93 tumores xenógrafos derivados de pacientes (PDX) con cáncer de mama (fuente: EurOPDX consortium. Breast Cancer PDTX Encyclopaedia). **A la luz de estos resultados, si NDRG1 es un supresor tumoral/metástasis, ¿por qué está amplificado y aumentado su mRNA en cáncer de mama invasivo?** Poniendo estos datos en perspectiva, HER2 está amplificado/sobreexpresado en el 18-20% de los tumores mamarios invasivos primarios, **lo que pone de manifiesto el impacto de nuestros hallazgos.** Por otro lado, **la actividad pleiotrópica de NDRG1 también se refleja en las CSCs,** promoviendo e inhibiendo la CSCs en cáncer de pulmón y colon, respectivamente. Sin embargo, no existen investigaciones sobre el efecto de NDRG1 sobre las CSCs mamarias. Estos resultados, junto a estudios anteriores, y dado que TNBC presenta sobreactivación de la señalización de TGFβ, nos lleva a pensar que NDRG1 puede presentar un papel maligno en este subtipo molecular. En conjunto, estudios previos y nuestros hallazgos preliminares, **sugieren que NDRG1 puede estar asociado con la progresión del cáncer de mama invasivo, como el TNBC, y podría depender de vías de señalización malignas como TGFβ.**

HIPOTESIS

Con el objetivo de desenmascarar el “lado oscuro” de NDRG1 en cáncer de mama, **hipotetizamos que NDRG1 puede presentar efectos pleiotrópicos dependientes del tipo tumoral, variante de transcripción y/o estímulos externos. Así pues, la amplificación y/o sobreexpresión de RNA y/o fosforilación de NDRG1 puede relacionarse con el tipo/subtipo tumoral, y estar asociado con la progresión y agresividad tumoral en su interacción con vías inductoras de malignidad. En este sentido, creemos que NDRG1 puede mediar la agresividad (proliferación, metástasis y/o CSCs) inducida por TGFβ, un “triángulo de las Bermudas” como escenario perfecto para promover recidivas, resistencia terapéutica y eventos metastásicos, lo que afecta de forma inherente a la mortalidad de los pacientes.**

OBJETIVOS

Basados en nuestros resultados clínicos (metaanálisis) y experimentales, así como de estudios previos, nos cuestionamos si **la fosforilación/expresión proteica aumentada de NDRG1 podría representar un nuevo biomarcador diagnóstico y/o pronóstico en cáncer de mama, y actuar como oncogén o promotor de metástasis en cáncer de mama avanzado bajo activación de TGFβ.**

Los **objetivos específicos** son:

Objetivo 1. Papel pleiotrópico de NDRG1 dependiente del contexto y subtipo tumoral en líneas celulares de cáncer de mama: efectos del silenciado de NDRG1 sobre la agresividad mediada por TGFβ.

Objetivo 2. Rutas moleculares y variantes transcripcionales alteradas por TGFβ en líneas de TNBC.

METODOLOGÍA/DESCRIPCIÓN

Objetivo 1. Papel pleiotrópico de NDRG1 dependiente del contexto y subtipo tumoral en líneas celulares de cáncer de mama: efectos del silenciado de NDRG1 sobre la agresividad mediada por TGFβ. Justificación e hipótesis. Es conocido que TGFβ induce agresividad en cáncer de mama, especialmente en TNBC, modulando las CSCs, metástasis y proliferación de las células tumorales (3,7,10,11). Hemos visto que el silenciado de NDRG1 en presencia de TGFβ1 produce una reducción de la migración en las líneas MDA-MB-231, Hs578T y MDA-MB-436. Sin embargo, no se sabe nada sobre el impacto que podría tener en la proliferación y CSCs inducidos por TGFβ. Hipotetizamos que TGFβ1 puede incrementar la expresión de NDRG1 para que medie sobre la metástasis, y/o CSCs, y/o proliferación de las células tumorales, especialmente en TNBC. **1.1) Líneas celulares y condiciones de cultivo:** a) *ER+*: MCF7, b) *HER2*: BT474, c) *TNBC*: células de TNBC tipo mesenquimal y mesenquimal stem MDA-MB-231, MDA-MB-436, Hs578T, SUM159 y BT549 (3) crecidas en DMEM + suero al 10% + antibióticos/antimicóticos al 1%. **1.2) Transfección transitoria de NDRG1:** previo a la transfección, trataremos 8h con/sin TGFβ1 y a continuación transfectaremos con siRNA de NDRG1 (100nM) 48h más. En este momento, las células se ensayarán para los experimentos posteriores. **1.3) Ensayos posteriores:** 1-Eficiencia de transfección por Western blot. 2-Migración e invasión celular mediante el ensayo de “wound healing” y cámaras de Boyden cubiertas con basement membrane matrix al 1X, respectivamente. 3-Ensayos de CSCs: a) *Eficiencia en la formación de mamoesferas (MSFE)*: pasado el tiempo de transfección, las células se cultivarán en placas de ultra baja adherencia con medio MammoCult + metilcelulosa al 0.5%. Las mamoesferas primarias se contarán a las 72h, y tras tripsinizarlas y re-cultivarlas, las esferas secundarias se contarán a las 72h. b) *Porcentaje de CSCs*: las poblaciones ALDH+ (ensayo de Aldefluor) se determinarán mediante citometría de flujo. 4-Proliferación mediante ensayo de WST-1. 5-EMT mediante la determinación de marcadores mesenquimales (vimentin, N-cadherin), epiteliales (E-cadherin), y los factores de transcripción Snail, Slug, Zeb1. **1.4) Variables de estudio:** evaluaremos cambios en MSFE y %CSCs, proliferación, índice de migración, e invasión tras el silenciado de NDRG1 con/sin TGFβ1, comparados con el control negativo scrambled. **1.5) Análisis estadístico:** los experimentos se harán por triplicado, pero MSFE necesitará 6 réplicas. Los resultados se presentarán como media±EEM. Emplearemos ANOVA de una vía y post-hoc de Bonferroni para evaluar las diferencias entre los grupos de estudio. El test t de Student será usado cuando sea necesario para comparar entre dos grupos. $P < 0.05$ será considerado significativo.

Objetivo 4. Rutas moleculares y variantes transcripcionales alteradas por TGFβ en líneas de TNBC. Justificación e hipótesis. Hemos detectado la expresión diferencial de NDRG1 entre tejido tumoral de TNBC y su correspondiente tejido adyacente. Hipotetizamos que TGFβ podría promover la expresión de una variante específica de NDRG1 responsable de su posible efecto maligno a través de ciertas vías que necesitan ser conocidas. **RNA-Sequencing** con depleción de RNA ribosómico se hará en células MDA-MB-231 and SUM159, donde el incremento de fosfo-NDRG1 fue más dramático independientemente del efecto en migración (Fig. 1A y B). Trataremos las células con TGFβ1 (10ng/ml) durante 24h y las transfectaremos con siRNA frente a NDRG1 (100nM) durante 48 horas. El RNA total sin RNA ribosómico se someterá a RNA sequencing (NextSeq500 HighOutput, 150bp/50 lecturas). **Variables de estudio:** determinaremos las vías de señalización y las variantes de NDRG1 diferencialmente activadas/inhibidas por NDRG1-siRNA con/sin TGFβ1 comparado con el control scrambled con/sin TGFβ1. **Análisis estadístico:** la normalización de los datos de secuenciación y la obtención de los resultados previstos en “variables de estudio” los realizará un experto bioinformático.

DURACION DEL ESTUDIO

Esta propuesta será llevada a cabo en la UGC de Oncología Médica del Complejo Hospitalario de Jaén. El investigador principal responsable de este estudio es Sergio Granados Principal. La duración prevista del proyecto es de 12 meses.

MEMORIA ECONÓMICA

CONCEPTOS		PRESUPUESTO SOLICITADO (Euros)
Material fungible		40.119
Costes utilización de servicios generales de investigación	Cultivos celulares, citometría de flujo, RNA-Sequencing	21.150
		61.269

A. Material fungible.

1. Material de laboratorio: guantes de nitrilo, material plástico (placas de 96, 24 y 6 pocillos, platos de 6 y 10cm, frascos de 25, 75 y 175ml, cafeteras de filtrado de 50, 200 y 500ml, puntas de pipeta de 10, 100, 300, y 1000ml, pipetas serológicas de aspiración, 5, 10,25 y 50 ml, tubos de 0.5, 1.5, 15 y 50 ml, entre otros), cámaras de Boyden (550€/kit x 5 kits), reactivos adicionales necesarios, tampones,...: **5.000€**.

2. Material de cultivos: medio (15 cajas x 45€/caja), suero (15 u. x 75€/u.), tripsina (10 u. x 42€/u.), HBSS (5cajas x 40€/caja), antibióticos (7u. x 42€/u.), medio de mamoesferas (6kits x 280€/kit), metilcelulosa (3 u. x 90€/u.), hidrocortisona (3viales x 50€/vial), heparina (3viales x 45€/vial), reactivos de viabilidad (7AAD: 3viales x 100€/vial; WST1: 3viales x 190€/vial), tampón de lisis (3viales x 110€/vial). **Total: 6.149€**

3. Factores de crecimiento: TGFβ1 (45viales x 75€/vial). **Total: 3.375€**

4. Anticuerpos (Western blot, kits citometría de flujo): vimentin, N-cadherin, E-cadherin, Snail, Slug, Zeb1 (2viales/ab.) + total NDRG1 total y fosfo-NDRG1 (4viales/ab.) x 400€/ab., kit Aldefluor (3kits x 720€/kit). **Total: 10.160€**

5. Reactivos para Western blot: buffers (TBS: 9 u. x 45€/u., TG: 5 u. x 100€/u., TGS: 5 u. x 100€/u.), geles (15cajas x 125€/caja), reactivos quimioluminiscencia (classic: 3 u. x 250€/u., femto: 4 u. x 400€/u., crescendo: 3 u. x 280€/u.), membranas (150 u. x 7€/u.), ladder (3viales x 160€/vial), inhibidor proteasa/fosfatasa (4 viales x 225€/vial), kit BCA (2kits x 125€/kit), leche (3u. x 25€/u.). **Total: 9.225€**

6. Silenciado génico y reactivos de transfección: siRNAs: NDRG1(5viales x 300€/vial), RNAiMAX (5 viales x 460€/vial). **Total: 3.800€**

7. Kits extracción RNA and cDNA, reactivos para RT-PCR: kit síntesis cDNA (2 kits x 250€/kit), columnas (2bolsas 220€/bolsa), kit extracción RNA (2kits x 400€/kit), SybrGreen master mix (320€/5ml), primers (5 viales x 70€/vial). **Total: 2.410€**

B. Costes utilización de servicios generales de investigación. 1) Unidad cultivos celulares: uso de cabinas (100€/mes x 12meses) + incubador (10€/rack/mes x 12meses) + test micoplasma (30€/línea celular x 7líneas); **2) Unidad citometría de flujo:** FACS Verse (60€/hr x 15hr); **3) RNA-Sequencing** (presupuesto de unidad de genómica, GENYO): librería (normalización, depleción RNA ribosómico) + sequencing (NextSeq500 HighOutput, 150bp/50 reads) + reactivos + análisis bioinformático: 780€/muestra x 24muestras (2líneas celulares x 4tratamientos x triplicado); **Total: 21150€**