

Convenio15CC056

Ref C 15/025

CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE ROCHE FARMA, S.A Y LA FUNDACION PÚBLICA ANDALUZA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA EN ANDALUCIA ORIENTAL – ALEJANDRO OTERO.

En Granada a 24 de Marzo de 2015

REUNIDOS

De una parte [redacted]
en calidad de Director Gerente de la Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria en Andalucía Oriental – Alejandro Otero (en adelante "FIBAO"), referenciada con C.I.F. G-18374199 y domicilio en Calle Doctor Azpitarte, 4-4ª Planta, 18012 Granada, con facultades suficientes para la suscripción del presente,

De otra parte [redacted]
en calidad de representante de ROCHE FÁRMA S.A. (en adelante ROCHE), referenciada con C.I.F. A-08023145, y domicilio social en C/ Eucalipto Nº 33, 28016 de Madrid y con facultades suficientes para la suscripción del presente convenio.

Las Partes, manifiestan tener y se reconocen, mutua y recíprocamente, la capacidad legal necesaria para otorgar el presente documento, a cuyos efectos

MANIFIESTAN

Primero.- Que FIBAO es un fundación del entorno público de la Junta de Andalucía, inscrita en el Registro de Fundaciones Andaluzas con el nº GR 546, siendo su objeto fundacional promover y llevar a término la investigación biosanitaria en su ámbito de actuación, así como la promoción y el desarrollo de innovaciones en las tecnologías sanitarias, y potenciar la promoción profesional y la docencia de los profesionales de la salud.

Que FIBAO actúa como Entidad Gestora del Centro y del Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada -ibs.GRANADA-. Dicho Instituto esta constituido en el seno de FIBAO que ostenta su titularidad jurídica, se configura como un espacio de investigación multidisciplinar con la participación de los Hospitales Universitarios Virgen de las Nieves y San Cecilio de Granada junto con la Universidad de Granada. La misión del ibs.GRANADA es la de desarrollar y potenciar un espacio científico multidisciplinar en biomedicina donde se

desarrollen proyectos de investigación que integren a grupos básicos con otros cuyos objetivos trascienden hacia una investigación traslacional."

Segundo.- Que ROCHE tiene voluntad e interés firme de apoyar proyectos de investigación con organismos públicos y privados relacionados con sus competencias.

Tercero.- Que ambas partes están interesadas en suscribir un Convenio que proporcione un marco adecuado para lograr el vínculo necesario para el establecimiento de una colaboración que garantice la consecución de los objetivos comunes pretendidos.

En virtud de lo cual,

ACUERDAN

Primero.- Que el objeto del presente convenio de colaboración es la creación de las bases jurídico-administrativas de referencia necesarias para el establecimiento de cuantas acciones de colaboración entre FIBAO y ROCHE que sean legalmente posibles.

Segundo.- Que dichas acciones de colaboración hacen referencia a la participación conjunta en Proyectos de investigación, desarrollo e innovación en las áreas o líneas de investigación siguientes:

"VARIACIÓN INTRATUMORAL DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE JAGGED-1 Y DEL DOMINIO INTRACELULAR DE NOTCH EN CANCER COLORRECTAL METASTÁSICO".

Tercero.- Que en el presente convenio de colaboración participarán de forma abierta las siguientes instituciones, centros y grupos participantes:

- Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (HUVN).
- Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA).
- Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa de la Universidad de Granada (IBIMER).

Cuarto.- El objeto del presente Proyecto es determinar si la expresión del ligando soluble jagged-1, secretado por las células endoteliales podría ser un marcador de la activación de la vía de señalización Notch, implicada en la formación de nuevos vasos en el tumor y de la generación de células madre tumorales de fácil diseminación que se encuentran localizadas en nichos perivasculares junto a las células de cáncer colorrectal.

1
Job
A

Quinto.- No obstante lo anterior, cualquier otro ámbito de actuación y colaboración no específicamente recogido en este convenio de cooperación podrá ser suscrito a él sin más que las partes manifiesten documentalmente su mutuo interés e intención, en cuyo caso dicha documentación deberá ser expresamente añadida a este convenio, como anexo al mismo.

Sexto.- Comisión de seguimiento.

Se establece una "Comisión de seguimiento" del presente convenio de colaboración, la cual estará constituida por los siguientes miembros:

Por parte de FIBAO:

Por parte del Centro de realización:

La Comisión de Seguimiento se reunirá al menos una vez al año o a petición de un tercio de sus miembros. La Comisión tendrá carácter paritario, con un solo voto por cada una de las partes.

El coordinador del presente Proyecto será: [REDACTED]

Los Investigadores Principales serán: [REDACTED]

Los Investigadores colaboradores serán:

[REDACTED]

Séptimo.- Entrada en Vigor y Duración del Convenio.

El presente Convenio entrará en vigor el día de su firma y finalizará en un periodo de 12 meses. En el caso de que por mutuo acuerdo se decida la prórroga, dicha decisión deberá contar previamente con un informe en el que se ponga de manifiesto los beneficios de dicha prórroga en relación con el desarrollo del convenio.

Octavo.- Posibilidad de Cancelación.

Tanto FIBAO como ROCHE previa reunión de la Comisión de seguimiento a la que se refiere la Cláusula quinta, podrá interrumpir en cualquier momento

A
dol
E
A

cualquier proyecto o estudio amparado por el presente Convenio; ello, si se valorara que el desarrollo de la investigación no es satisfactorio en el modo o manera, así como podrá tomar la decisión en cualquier momento de dar por finalizado el Convenio por considerar que no es necesaria su continuación.

Noveno.- Relación laboral entre las partes.

La colaboración no implica relación laboral alguna con cualquiera de las partes que firman este convenio, y se basa en los principios de buena fe y de eficacia para que la labor investigadora pueda ser realizada con éxito.

Décimo.- Propiedad de los Resultados, Confidencialidad de la información y publicación de los datos.

La propiedad intelectual/industrial de los resultados que se obtengan como consecuencia de la ejecución de los trabajos realizados al amparo del presente convenio corresponderá a las instituciones a las que estén vinculados contractualmente los Investigadores/inventores. Los porcentajes de invención se repartirán en función de las aportaciones y trabajos realizados por cada uno de los investigadores que participen en el resultado final susceptible de algún tipo de protección Industrial/Intelectual, según la legislación actual.

Los resultados susceptibles de algún tipo protección que puedan surgir del proyecto de investigación, deberán ser evaluados previo a su publicación, pudiéndose publicar previo acuerdo expreso de las partes.

Toda publicación que recoja datos obtenidos a partir de los proyectos de investigación contemplados en el presente convenio, hará constar, en los agradecimientos, la colaboración entre TODAS las partes. Cuando dichos datos, resultados, descubrimientos, invenciones, métodos e información se presenten en reuniones científicas o se publiquen en revistas profesionales se hará mención del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA) e Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa de la Universidad de Granada (IBIMER) como centros en el que se ha realizado el proyecto.

Si durante la realización del convenio fuese necesario el tratamiento de datos de carácter personal, ambas partes se comprometen a observar en todo momento, y bajo su responsabilidad, las exigencias de la legislación vigente en España en materia de protección de datos de carácter personal y especialmente en relación con el deber de información al afectado, los derechos de acceso, rectificación y cancelación de sus datos y la obtención de su consentimiento para el tratamiento de sus datos de carácter personal.

En todo caso, ROCHE no tendrá acceso a datos de carácter personal que no hayan sido previamente disociados, impidiendo la identificación de individuos concretos.

[Handwritten signatures and initials in blue ink on the right margin]

Decimoprimer.- Precio y forma de pago

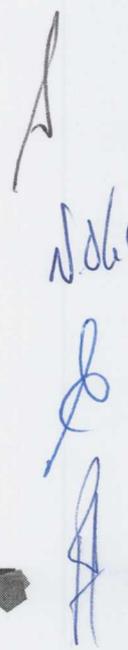
Se acuerda realizar por ROCHE una aportación de 29.900 € (se incluye el 15% de costes indirectos de la Fundación), destinados a recursos necesarios para el buen fin del proyecto y tendrá el carácter de irrevocable en la medida en que éste efectivamente se realice con el alcance previsto. Asimismo, ROCHE podrá solicitar a FIBAO un informe justificativo del desarrollo del proyecto, para justificar el buen fin de los fondos.

La citada cantidad, a la que no resultará de aplicación el IVA de acuerdo con la legislación vigente al ser la Fundación una entidad de las beneficiarias de mecenazgo, será facturada a ROCHE por la Fundación según el siguiente calendario:

14.950 € a la firma del contrato

14.950 € a la entrega de la memoria de actividades, que se estima que tendrá lugar a lo largo del 2016

ROCHE abonará las facturas en los 60 días siguientes a su recepción, sin asumir más obligación o responsabilidad que la de aportar la cantidad aquí fijada . al nº de cuenta de la que es titular la *Fundación FIBAO BMN-Caja Granada: IBAN: ES87 0487.3295.21.2000019694 SWIFT: GBMNESMMXXX*



Esta aportación será publicada a partir de 2016 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 Organización Sanitaria.

El presente Convenio podrá ser modificado mediante acuerdo entre las partes.

Y en prueba de conformidad, firman los intervinientes a un solo efecto y por duplicado ejemplar en lugar y fecha indicados en el encabezamiento.

Por FIBAO



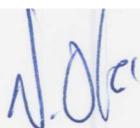
Por ROCHE



El coordinador y representante de los Investigadores Principales

VºBº y Conforme del Gerente del Centro

Vº. Bº y Conforme Director Científico ibs-GRANADA



VARIACIÓN INTERTUMORAL DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE JAGGED-1 Y DEL DOMINIO INTRACELULAR DE NOTCH EN CANCER COLORRECTAL METASTÁSICO

1. Introducción

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común tanto en hombres como en mujeres. Se estima la aparición de 101.340 casos de cáncer de colon y 39.870 de cáncer de recto en el año 2011. Las tasas de incidencia del cáncer colorrectal han ido disminuyendo durante la mayor parte de las últimas dos décadas (de 66,3 casos por cada 100.000 habitantes en 1985 a 45,3 en 2007). Este declive acelerado desde 1998 hasta 2007 (2,9% por año en hombres y 2,2% por año en las mujeres), ha sido en gran parte atribuible a la mejoría en las técnicas de detección precoz. A pesar de ello, se estiman unas 49.000 muertes por cáncer colorrectal en el año 2011, lo que representa aproximadamente el 9% de las muertes por cáncer (American Cancer Society, 2011).

El 20% de los pacientes diagnosticados con CCR presentan metástasis en el momento del diagnóstico y adicionalmente un 25 a 50% presentarán metástasis a lo largo de la evolución de la enfermedad. Entre los pacientes con enfermedad metastásica, el 50% van a presentar enfermedad limitada al hígado. La historia natural del cáncer colorrectal avanzado o metastásico (CCRm) ha cambiado enormemente en los años más recientes gracias a la introducción de la moderna quimioterapia. Antes del año 2000, cuando el tratamiento estándar consistía en el uso del 5-Fluorouracilo en monoterapia, la tasa de respuestas eran tan solo del 20%, el tiempo a la progresión menor de 6 meses y la supervivencia global de 12 meses. Hoy con la introducción de los fármacos irinotecán y oxaliplatino, y más recientemente con los basados en dianas moleculares (bevacizumab, cetuximab y panitumumab), la tasa de respuestas ha aumentado por encima del 50%, la supervivencia libre de progresión (SLP) a los 12 meses y la supervivencia global (SG) por encima de los 2 años. Adicionalmente sabemos que los pacientes que obtienen más beneficio son los que reciben un mayor número de fármacos: 10-15 meses de supervivencia si reciben dos, 15-20 meses si reciben tres y entre 20-25 meses si reciben más de tres.

En los últimos años, diferentes autores han demostrado la existencia de células madre tumorales en CCR (Barker y cols., 2009; Du y cols., 2008; Huang y cols., 2009) que, además de iniciar y mantener el crecimiento del tumor, median en el proceso de quimioresistencia (Al-Hajj, 2007; Wicha y cols., 2006). La ubicación de estas células no ha sido determinada en CCR, pero si en otros tipos de tumores sólidos en los que se han localizado en los nichos

11.06.

perivasculares del tumor (Krishnamurthy y cols., 2010), lo que ha llegado a sugerir que sean las células endoteliales las que promueven el fenotipo de las células madre tumorales. Recientemente, Lu y cols., (2013) han demostrado en CCR la existencia de células madre tumorales cercanas a las células endoteliales. Éstas se caracterizan por presentar una alta expresión de CD133 y por tener activada la ruta de señalización Notch. La señalización de Notch, es iniciada por la interacción entre el receptor Notch de la superficie de una célula y su ligando (Jagged-1 o DII4) situado en la membrana de una célula adyacente (Kume y cols., 2009). Esta interacción provoca la ruptura de Notch lo que lleva a su dominio intracelular a formar complejos de interacción transcripcional que alteran el fenotipo celular. En concreto, en CCR se ha demostrado que las células endoteliales de los vasos sanguíneos secretan una forma soluble del ligando de Notch (jagged-1) que es responsable de la activación paracrina de la ruta de señalización Notch en las células tumorales próximas (Lu y cols., 2013).

Como sabemos, bevacizumab, posee una demostrada actividad antiangiogénica bloqueando el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que se comporta como un mediador clave de la formación de neovasos en los tumores y por tanto en su crecimiento. VEGF está también implicado en la ruta de señalización de Notch, a través de la inducción de la expresión en células endoteliales de otro de los ligandos del receptor Notch, DII4, que activa la vía Notch y la formación de nuevos vasos en el tumor (Kume y cols., 2009). A diferencia de la expresión de la forma soluble de jagged-1, que es superior en las células endoteliales del parénquima vascular, la expresión de DII4 es similar en las células tumorales y en las endoteliales (Lu y cols., 2013).

2. Justificación.

Nuestro proyecto pretende determinar si la expresión del ligando soluble jagged-1, secretado por las células endoteliales podría ser un marcador de la activación de la vía de señalización Notch, implicada en la formación de nuevos vasos en el tumor y de la generación de células madre tumorales de fácil diseminación que se encuentran localizadas en nichos perivasculares junto a las células de cáncer colorrectal. Para la determinación de estos factores moleculares en tejido y en sangre periférica será necesario realizar Western-Blot con anticuerpos específicos para el dominio intracelular de Notch y la forma soluble de jagged y Kit de extracción PAXgene Kit RNA Blood para obtener RNA a partir del cual se realizará la transcripción reversa utilizando el Kit de Transcripción reversa (AppliedBiosystems) y PCR cuantitativa mediante TaqMan®Gene de AppliedBiosystems. Solicitamos a Roche Farma S.A. la colaboración en el presente proyecto para la financiación de los reactivos necesarios

Handwritten signature and initials in blue ink, including a large 'A' and 'JOL'.

para llevar a cabo los estudios anteriormente mencionados y de esta forma poder continuar con la investigación ya iniciada.

3. Objetivos:

- Identificar el nivel de expresión de la forma soluble de Jagged-1 y de Notch activado en muestras tumorales de CCR metastático.
- Determinar la presencia de células madre tumorales en el tejido tumoral y sangre periférica.
- Determinar si la sobreexpresión de la forma soluble de jagged-1, secretada por las células endoteliales está asociado a la activación de Notch y a un incremento de células madre tumorales.

4. Metodología/Descripción

4.1 - Muestras a valorar

Las muestras del estudio que se someten a análisis proceden de todos los pacientes con cáncer colorrectal metastásico remitidos al Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada que inicien tratamiento oncológico específico en dicho Servicio previa firma de Consentimiento informado.

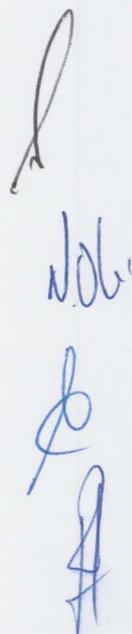
Este proyecto ha obtenido la autorización del CEIC de Granada con fecha 24 de junio de 2013

4.2 - Tamaño muestral y procedimiento de muestreo

Basándose en estudios previos (J. Gao et al. / PathologieBiologie 59, 2011. 298–302) en los que se obtuvieron diferencias en la expresión de los marcadores Notch1 y Jagged1 en pacientes con adenocarcinoma de colón, estimamos que en nuestro estudio podrían encontrarse resultados similares. Bajo esta asunción, sería necesario incluir un tamaño mínimo de 108 muestras.

4.3 - Variables del estudio

1. Presencia de niveles de expresión elevados de jagged-1 en las muestras de tumor: cualitativa (alto/bajo).
2. Presencia de niveles de expresión elevados de Notch en las muestras de tumor: cualitativa (alto/bajo).



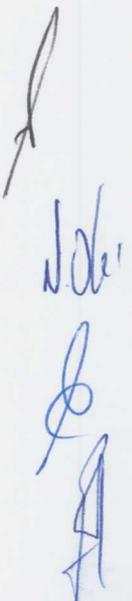
3. Presencia de células madre tumorales en las muestras de tumor : cuantitativa continua.
4. Presencia de células madre tumorales en sangre periférica de los pacientes de los pacientes: cuantitativa continua.

4.4 - Métodos a utilizar:

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NOTCH Y JAGGED-1

A partir de las secciones de los tumores en parafina, se procederá en primer lugar a un proceso de desparafinación que consistió en la eliminación del máximo de parafina posible mediante el uso de un escalpelo. A continuación se sumergirá la muestra preprocesada en 1 ml de xileno e incubará durante 45 minutos a 37°C, vorteadando cada 5-10 minutos. Este paso favorece la interacción parafina-xileno en la muestra favoreciendo el proceso de desparafinado. La muestra será centrifugada a máxima velocidad durante 5 minutos eliminando el sobrenadante (xileno). El precipitado será resuspendido en 1 ml de etanol 100% y tras 1 minuto se centrifugará a máxima velocidad durante 5 minutos. Este proceso será repetido con concentraciones decrecientes de etanol al 90% y 70%. Finalmente se añadirán 200 microlitros de Tween 20 al 0,5% y la muestra será incubada durante 10 minutos a 90°C y 1 minuto a 65°C. Centrifugaremos a máxima velocidad durante 5 minutos para eliminar tween 20 y la muestra estará preparada para la extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas totales, las muestras serán homogenizadas en frío con Tris-HCl, pH 7,4 y sacarosa y posteriormente centrifugadas a 14000g a 4°C durante 10 minutos para obtener el sobrenadante en el que se encuentran dichas proteínas que serán cuantificadas mediante colorimetría (Bradford). Para ello, se utilizarán placas de 96 pocillos de fondo plano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en las que se depositan 5 μ l de muestra y se añadirán 280 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.). Se dejará incubar 10 minutos en oscuridad y los resultados se leerán en un colorímetro (Multiskan Ex ThermoElectron Corporation, Usa) a una longitud de onda de 570 nm. Después de la electroforesis en gel de poliacrilamida (12% geles de separación PAGE) de las proteínas totales, en presencia de SDS, los geles se transfieren a membranas de nitrocelulosa (BioRad Laboratories, Richmond, CA) funcionando a 30 V en 25 mM Tris HCl (pH 8,3), glicina 192 mM y 20% (v / v) de metanol. Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta será sometida al bloqueo de los sitios inespecíficos mediante una solución de bloqueo rica en proteínas (PBS 1X, 0,1% Tween 20, 5% leche desnatada en



polvo) durante una hora en agitación y temperatura ambiente. A continuación, se retirará la solución de bloqueo, procediéndose a lavar la membrana con PBS-Tween-20 al 0,1% por tres veces durante 5 min en agitación, añadiendo el anticuerpo primario, a la dilución apropiada, en la solución de bloqueo 1/10 (PBS-Tween-20 0,1% 9ml, 1ml solución de bloqueo con leche desnatada) e Incubando a 4°C overnight en agitación suave. Previamente a la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana será sometida a 3 lavados durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente ambiente, con PBS-Tween-20 al 0,1%, tras lo cual se adicionará el anticuerpo secundario, a una dilución 1:2500 en solución de bloqueo 1/10, incubando durante 1h a temperatura ambiente en agitación suave. La detección de la señal se lleva a cabo por quimioluminiscencia (ECL-Plus, GE Healthcare) en el equipo LAS-4000 mini. Los posteriores análisis, así como el tratamiento de la imagen y las cuantificaciones de las bandas, se realizarán con el programa ImageQuant Las-4000.

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS MADRE TUMORALES EN EL TEJIDO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

A partir de las secciones de tejido incluidos en parafina se confeccionarán núcleos con diámetro de 0.6 mm que serán separados por 0.8 mm usando el *Manual Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). Los bloques resultantes se cortarán con un grosor de 5 µm mediante micrótopo y se transferirán al portaobjetos. Los procesos de desparafinación, rehidratación, recuperación del epítipo y marcaje se llevarán a cabo mediante el *Dako Autostainer EnVision™ FLEX kit* (Agilent Technologies, Dako, España).

A partir de las secciones anteriores de los tumores se realizará una inmunotinción mediante el sistema *Dako Autostainer kitEnVision™ FLEX System* aplicando los anticuerpos primarios específicos para CD133 y el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y la 3.3'-diaminobenzidina (DAB), lo que permitirá la visualización del producto de reacción mediante un precipitado color marrón. Para marcar los núcleos se utilizará una contratinción mediante hematoxilina (azul). Los procesos de deshidratación (alcohol 95°, alcohol 100° y Xilol) y montaje con DPX se realizarán manualmente. Todo esto nos permitirá valorar la presencia o ausencia de células madre tumorales en las muestras analizadas.

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS MADRE TUMORALES CIRCULANTES EN SANGRE PERIFÉRICA

Las muestras de sangre periférica (12 ml) de los pacientes (todos los de la Virgen delas Nieves Hospital Universitario) se recogerán en tubos de sangre de extracción de RNA

Handwritten signature and initials in blue ink, including a checkmark and the letters 'NOV', 'S', and 'A'.

(PreAnalytix) para lograr la estabilización inmediata y persistente de la ARN. Las muestras se almacenarán a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente utilizando el Kit de extracción PAXgene Kit RNA Blood se aislará el ARN según las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN purificado fue evaluada determinando la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific), y la calidad se evaluará utilizando el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Por último, 200 ng de ARN serán utilizados para la obtención de cDNA con el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies)* con RNAsa de *Applied Biosystems*. A la muestra de ARN, en un volumen de 10 µl, se añadirán 5 µl de la *Master mix* con la composición que se muestra a continuación:

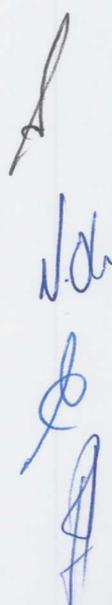
10×RT Buffer 1.0 µl
25×dNTP Mix (100 mM) 0.4 µl
10×RT Random Primers 1.0 µl
Multi Scribe™ Reverse Transcriptase 0.5 µl
RNase Inhibitor 0.5 µl
Nuclease-free H2O 1.6 µl
5 µl finales

A este volumen se le añadieron 10 µl de agua libre de RNAsas, obteniendo un volumen final de 25 µl. Finalmente, se le aplicará el siguiente programa de temperaturas: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos y 85°C durante 5 minutos en el termociclador conservando el ADNc a -20°C.

La PCR en tiempo real (qPCR) se llevó a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos utilizando PCR 7500 Fast-tiempo real (AppliedBiosystems). En cada pocillo se introducirán 20 ng de cDNA en 20 µl de TaqMan, PCR Universal Mastermix (AppliedBiosystems). La expresión de CD133 se analizó utilizando TaqMan®Gene (AppliedBiosystems) Referencia: Hs01009250_m1). El análisis de expresión de GADPH fue utilizado como control (número de catálogo: 4333764F).

5. Plan de Trabajo: Duración del proyecto de 2 años

1. Primer y segundo semestre: Recolección del 50% de las muestras de sangre periférica previstas. Recolección de las muestras de tejido. Extracción del ARN total de la sangre y proteínas totales del tejido.



2. Tercer y cuarto semestre: Recolección del último 50% de las muestras previstas Igual que en el año anterior, al mismo tiempo se procederá a la extracción del ARN total de dichas muestras. Análisis completo de la determinación de proteínas en cortes de tejidos mediante inmunohistoquímica y western blot. Conclusiones

6. Plan de difusión

Esperamos que los resultados del Proyecto se difundan en revistas en las que hemos publicado previamente como Br J Dermatology FI 3.33; 2/39; Exp Dermatol FI 2.9; 4/41; J Mol Med FI 4.82; 9/81 y 2), etc. Todas las revistas están en el primer cuartil de su categoría. Además, se difundirán en los Congresos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO).

Presupuesto: TOTAL: 26.000 Euros. Se solicita a Roche esta cantidad para llevar a cabo el proyecto.

| CONCEPTO | GASTO |
|---|---------|
| 1.-INVENTARIABLE | 0 € |
| 2. -KIT EXTRACCIÓN RNA | 3.800 € |
| 3.-REACTIVOS EXTRACCIÓN PROTEÍNAS | 2.100 € |
| 4.-PAXGENE BLOOD RNA KIT | 4.620 € |
| 5.-TAQMAN FAS UNIVERSAL PCR MASTER | 3.972 € |
| 6.-PLACAS DE PCR | 1.700 € |
| 7.- ANTICUERPOS MONOCLONALES PRIMARIOS Y SECUNDARIOS | 3.100 € |
| 8.-REACTIVOS WESTERN BLOT | 2.887 € |
| 9.-KIT REVELADO WESTERN BLOT | 1.825 € |
| 10.-PUNTAS, PIPETAS, GUANTES..... | 2.000 € |

7. Bibliografía

1. Al-Hajj, M. (2007). Cancer stem cells and oncology therapeutics. Curr. Opin. Oncol. 19, 61–64, 2007.

2. Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611, 2009.
3. Cartwright T.H. Treatment decisions after diagnosis of metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 11(3):155-66, 2012
4. Davies, J.M., and Goldberg, R.M. (2011). Treatment of metastatic colorectal cancer. *Semin. Oncol.* 38, 552–560, 2011.
5. Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., Jin, H., Cahuzac, N., Mehrpour, M., Lu, Y., and Chen, Q.. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin. Cancer Res.* 14, 6751–6760, 2008.
6. Huang, E.H., Hynes, M.J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J.Z., Wicha, M.S., and Boman, B.M. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 3382–3389, 2009.
7. Krishnamurthy, S., Dong, Z., Vodopyanov, D., Imai, A., Helman, J.I., Prince, M.E., Wicha, M.S., and No" r, J.E.. Endothelial cell-initiated signalling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 70, 9969–9978, 2010.
8. Kume, T. Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *Journal of Angiogenesis Research*, 1:8, 2009.
9. Lu, J., Ye, X., Fan, F., Xia, L., Bhattacharya, R., Bellister, S., Tozzi, F., Sceusi, E., Zhou, Y., Tachibana, I., Maru, D.M., Hawke, D.H., Rak, J., Zweidler-McKay, P., and Ellis, L.M. Endothelial Cells Promote the Colorectal Cancer Stem Cell Phenotype through a Soluble Form of Jagged-1. *Cancer Cell* 23, 171–185, 2013.
10. Saltz, L.B., Clarke, S., Di'az-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T.S., Rivera, F., et al. (2008). Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J. Clin. Oncol.* 26, 2013–2019, 2008.
11. Wicha, M.S., Liu, S., and Dontu, G. Cancer stem cells: an old idea—a *Cancer Res.* 66, 1883–1890, discussion 1895–1886, 2006.

