

CONVOCATORIA DE AYUDAS DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
MEMORIA DE SOLICITUD

Expediente N°

TITULO: Estudio de la biotensegridad en los tumores neuroblásticos

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: ROSA NOGUERA SALVÁ

TIPO DE PROYECTO: INDIVIDUAL COORDINADO MULTICÉNTRICO

NOMBRE DEL IP COORDINADOR:
(Cumplimentar sólo en caso de proyectos coordinados)

DURACION: 3 AÑOS

RESUMEN (Objetivos y Metodología del Proyecto)

(Máximo 250 palabras)

Basándonos en la ley de la tensegridad, estudiaremos las interacciones físicas entre células tumorales/estromales y la matriz extracelular (MEC) tumoral para incluirlas como dianas terapéuticas en pacientes con neuroblastoma de alto riesgo. Se realizará: a) desarrollo e integración del análisis de la imagen microscópica mediante el uso de algoritmos de segmentación automática y b) la búsqueda y asociación de la frecuencia de variaciones genéticas comunes e inusuales, mediante la técnica de polimorfismo de nucleótido único, el meta-análisis asociado y los datos clínicos relacionados. **Para los estudios de bioimagen microscópica**, utilizaremos la metodología de digitalización, análisis y reconstrucción desarrollados en estudios preliminares (FIS 2010/0015) y recurriremos a la teoría de grafos, para construir diagramas de Voronoi y extraer características topológicas para expresar la mecanotransducción. De este modo, cuantificando y clasificando matemáticamente las imágenes obtenidas tras aplicar las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas a las muestras, obtendremos información sobre la actividad celular, la angiogénesis y la arquitectura tisular. **Para los estudios de genética computacional**, completaremos los perfiles pangenómicos en los tumores con >60% neuroblastos y desarrollaremos y aplicaremos técnicas de filtrado de los análisis genéticos de asociación. Finalmente, la información obtenida a través del análisis de 400 tumores será utilizada para subdividir los pacientes de alto riesgo, ofreciéndonos así oportunidades para representar las redes críticas morfogenéticas de riesgo máximo. Los resultados podrán optimizar el modelo predictivo y apoyar la mecanoterapia en neuroblastoma.

TITLE: Biotensegrity study in neuroblastoma

ABSTRACT (Objectives and Methodology of the project)

Based on the tensegrity law, we will study the physical interactions between tumoral/stromal cells and the tumor extracellular matrix (ECM) to include them as therapeutic targets for patients with high risk neuroblastoma. We will perform: a) the development and integration of the microscopic image analysis, through the use of automated segmentation algorithms and b) the search and the establishment of the frequency of common and rare genetic variations through the single nucleotide polymorphism technique, the associated meta-analysis and the related clinical data. **For the microscopic bioimaging studies**, we will use the digitation, analysis and reconstruction techniques developed in preliminary studies (FIS 2010/0015) and we will draw on the graphs theory to construct Voronoi diagram for the topological features extraction to be able to express mechanotransduction. By mathematical quantification and classification of the histochemical and immunohistochemical images, we will provide information on cell activity, angiogenesis and tissue architecture. **For the computational genetics studies**, we will fill the pangenomic profiles in the tumors with >60% neuroblasts and we will develop and apply filtering techniques of the association genetic analysis. Finally, the information resulting from the 400 tumors analysis will be used to subdivide high risk patients, therefore offering opportunities to represent morphogenetic critical networks of maximum risk. The results may optimize the predictive model in neuroblastoma and support mechanotherapy in neuroblastoma.

Centro Solicitante: FUNDACION HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA

Centro Realizador: INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA INCLIVA

Título: Estudio de la biotensegridad en los tumores neuroblásticos

RESOLUCIÓN PROVISIONAL DE CONCESIÓN

Ayuda susceptible de ser cofinanciada por el FEDER

Estado de Resolución Provisional de Concesión : CONCEDIDO

PRESUPUESTO CONCEDIDO PROVISIONAL				
	1ª ANUALIDAD	2ª ANUALIDAD	3ª ANUALIDAD	TOTAL
BIENES/SRV	60.000,00	10.000,00	30.000,00	100.000,00
PERSONAL	0,00	0,00	0,00	0,00
VIAJES	0,00	500,00	1.000,00	1.500,00
SUBTOTALES	60.000,00	10.500,00	31.000,00	101.500,00
Costes ind. 21,00 %	12.600,00	2.205,00	6.510,00	21.315,00
TOTALES	72.600,00	12.705,00	37.510,00	122.815,00

PERSONAL CONCEDIDO PROVISIONAL CON CARGO AL PROYECTO

Personal con Cargo	Concedido Provisional
Titulado superior	0
Titulado medio	0
Técnico FP	0

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

Nombre	Apellido 1	Apellido 2	Tipo	Ded.
JOSE FERNANDO	BENAVENT	SEGUI	Colaborador	COMPARTIDA
ROSA	NOGUERA	SALVA	IP	UNICA
ANA PILAR	BERBEGALL	BELTRAN	Colaborador	COMPARTIDA
ALEJO MIGUEL	SEMPERE	CRESPO	Colaborador	COMPARTIDA
MARIA TERESA	BLANQUER	MACEIRAS	Colaborador	COMPARTIDA
SAMUEL	NAVARRO	FOS	Colaborador	COMPARTIDA
TOMAS	ALVARO	NARANJO	Colaborador	COMPARTIDA
IRENE	TADEO	CERVERA	Colaborador	COMPARTIDA
ISIDRO	MACHADO	PUERTO	Colaborador	COMPARTIDA
VICTOR	ZUÑIGA	ZARAGOZA	Colaborador	COMPARTIDA
SUSANA	MARTIN	VAÑO	Colaborador	COMPARTIDA
ALEXANDRE DAVID	ARCE	GRILO	Colaborador	COMPARTIDA
JAVIER ENRIQUE	MESEGUER	ANASTASIO	Colaborador	COMPARTIDA

RESOLUCIÓN PROVISIONAL DE CONCESIÓN

El Órgano instructor, visto el informe emitido por la Comisión de Selección, BOE Nº 140 de 10 de junio de 2014, en su reunión de 9 de octubre de 2014 y, de acuerdo con las disponibilidades presupuestarias, propone la financiación de la ayuda solicitada para la realización de su proyecto en los términos económicos indicados anteriormente. El presupuesto solicitado se ha modificado en el proceso de evaluación de acuerdo con la valoración económica de los objetivos propuestos. Su ajuste final ha tenido en cuenta este hecho, la prioridad de su proyecto respecto a otras propuestas y las limitaciones presupuestarias.

RESOLUCIÓN DEFINITIVA DE CONCESIÓN

Ayuda cofinanciada por el FEDER

Estado de Resolución Definitiva de Concesión : CONCEDIDO

PRESUPUESTO CONCEDIDO DEFINITIVO				
	1ª ANUALIDAD	2ª ANUALIDAD	3ª ANUALIDAD	TOTAL
BIENES/SRV	60.000,00	10.000,00	30.000,00	100.000,00
PERSONAL	0,00	0,00	0,00	0,00
VIAJES	0,00	500,00	1.000,00	1.500,00
SUBTOTALES	60.000,00	10.500,00	31.000,00	101.500,00
Costes ind. 21,00 %	12.600,00	2.205,00	6.510,00	21.315,00
TOTALES	72.600,00	12.705,00	37.510,00	122.815,00

PERSONAL CONCEDIDO DEFINITIVO CON CARGO AL PROYECTO

Personal con Cargo	Concedido Definitivo
Titulado superior	0
Titulado medio	0
Técnico FP	0

▲ EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

Nombre	Apellido 1	Apellido 2	Tipo	Ded.
JOSE FERNANDO	BENAVENT	SEGUI	Colaborador	COMPARTIDA
ROSA	NOGUERA	SALVA	IP	UNICA
ANA PILAR	BERBEGALL	BELTRAN	Colaborador	COMPARTIDA
ALEJO MIGUEL	SEMPERE	CRESPO	Colaborador	COMPARTIDA
MARIA TERESA	BLANQUER	MACEIRAS	Colaborador	COMPARTIDA
SAMUEL	NAVARRO	FOS	Colaborador	COMPARTIDA
TOMAS	ALVARO	NARANJO	Colaborador	COMPARTIDA
IRENE	TADEO	CERVERA	Colaborador	COMPARTIDA
ISIDRO	MACHADO	PUERTO	Colaborador	COMPARTIDA
VICTOR	ZUÑIGA	ZARAGOZA	Colaborador	COMPARTIDA
SUSANA	MARTIN	VAÑO	Colaborador	COMPARTIDA
ALEXANDRE DAVID	ARCE	GRILLO	Colaborador	COMPARTIDA
JAVIER ENRIQUE	MESEGUER	ANASTASIO	Colaborador	COMPARTIDA

▲ CAUSAS DEFINITIVAS DE DENEGACIÓN O CONTESTACIÓN A LAS ALEGACIONES

El Órgano instructor, visto el informe emitido por la Comisión de Selección, BOE Nº 140 de 10 de junio de 2014, en su reunión de 9 de octubre de 2014 y, de acuerdo con las disponibilidades presupuestarias, propone la financiación de la ayuda solicitada para la realización de su proyecto en los términos económicos indicados anteriormente. El presupuesto solicitado se ha modificado en el proceso de evaluación de acuerdo con la valoración económica de los objetivos propuestos. Su ajuste final ha tenido en cuenta este hecho, la prioridad de su proyecto respecto a otras propuestas y las limitaciones presupuestarias.



MEMORIA CIENTÍFICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SOBRE CÁNCER INFANTIL

CONVOCATORIA 2015

TÍTULO DEL PROYECTO

Búsqueda de dianas terapéuticas en los puntos de contacto de la célula tumoral en el neuroblastoma infantil con su matriz extracelular.

.....

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Rosa Noguera Salvá

.....

ORGANISMO

Fundación INCLIVA

.....

EQUIPO INVESTIGADOR

Samuel Navarro, Ana P. Berbegall, Irene Tadeo, Victor Zúñiga, Susana Martín, Isidro Machado, Alejo Miguel Sempere, Luis María Escudero, Daniel Sánchez-Gutiérrez, Alberto Pascual, Aurora Sáez, M^a Teresa Blanquer, Inmaculada Noguera.

.....

Es imprescindible limitar el número de páginas de la memoria a 23

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO DEL PROYECTO: **Búsqueda de dianas terapéuticas en los puntos de contacto de la célula tumoral en el neuroblastoma infantil con su matriz extracelular.**

PALABRAS CLAVE: neuroblastoma, adhesiones focales, vitronectina, integrina, matriz extracelular, análisis de imagen microscópico, teoría de grafos, perfil pangénómico.

CLASIFICACIÓN:	Básica	<input checked="" type="checkbox"/>
	Clínica	<input type="checkbox"/>
	Traslacional	<input type="checkbox"/>
	Epidemiológica	<input type="checkbox"/>
	otros (especificar)	<input type="checkbox"/>

NOMBRE DEL CENTRO: Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia

DIRECCIÓN POSTAL: Av. Blasco Ibáñez, 17

TELÉFONO: 963864100 ext. 52467

FAX: 963983226

RESUMEN:

Antecedentes. El Neuroblastoma (NB) es el tumor sólido más común en la primera infancia y a pesar de las grandes mejoras en la tasa de curación de otros tumores pediátricos, la tasa de supervivencia para los pacientes con NB no es completamente satisfactoria. Dada la complejidad biológica de las enfermedades neoplásicas, nuestro grupo ha trabajado en el diseño de tecnologías de imagen y en la implementación de métodos computacionales que permitan la co-localización y separación de marcadores para identificar estructuras de relevancia clínica. Estas técnicas nos están permitiendo obtener información morfológica y molecular cuantitativa, clínicamente relevante, preservando el contexto celular y tisular. En ese sentido nuestro grupo ha desarrollado varios algoritmos robustos para la cuantificación de la MEC y de la vascularización tumoral. Los resultados de nuestras investigaciones, mediante el análisis multiparamétrico de diversos componentes del estroma tumoral, refuerzan el valor de la clasificación patológica internacional e incorporados a análisis matemáticos con datos clínicos y genéticos de conocido valor pronóstico podrían ser la clave para la terapia personalizada en estos tumores. Se ha demostrado que procesos relevantes para el NB, tales como la diferenciación de células madre, la maduración neuronal, la extensión de las neuritas y la agresividad celular se ven influidos por la rigidez de la MEC. Así, en las muestras tumorales con datos de evolución clínica de más de 500 pacientes españoles, hemos demostrado con análisis de imagen digital, que el estroma celular Schwanniano y los neuroblastos no son los únicos elementos básicos en el análisis histopatológico sino que además, determinadas características del andamiaje de la MEC (fibras de reticulina, de colágeno, glucosaminoglucanos), se relacionan con la recaída y progresión tumoral. Las señales de rigidez (fuerzas mecánicas) condicionan numerosas respuestas celulares. El lugar de contacto entre MEC y célula son las adhesiones focales y las integrinas son las moléculas encargadas de llevarlo a cabo. Las integrinas son proteínas transmembrana constituidas por subunidades de tipo α y β que se pueden combinar formando 24 heterodímeros funcionales distintos. Las integrinas transducen señales bidireccionales: señales de tensión desde la MEC que desembocarán en señales químicas o estimularán el remodelado del citoesqueleto y señales desde el interior de la célula que regularán la conformación, y afinidad hacia

el ligando, del dominio extracelular. Entre las diversas glicoproteínas de la MEC ligandos de las integrinas, la vitronectina (VN) al igual que la fibronectina (FN), tiene un interés particular en la biología tumoral, ya que además de su secuencia RGD, que es un sitio de unión para las integrinas ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$), cuenta con receptores para el colágeno y heparansulfato-proteoglicanos, también presenta un dominio de unión N-terminal denominado somatomedina B se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI1), y los estabiliza. Por lo tanto VN además de mediar adhesión y migración celular por sus sitios de unión a integrinas y a los elementos de la MEC, sirve para regular la proteólisis iniciada por la activación del plasminógeno para convertirse en plasmina, que se produce tras la unión del activador del plasminógeno tipo uroquinasa o uroquinasa (uPA) mediante un dominio tipo EGF al receptor activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR), lo cual lleva a la activación de cascada proteolítica, con la consecuente degradación de la MEC, propiciando invasión celular. Conjuntamente, el dominio somatomedina B de la VN interactúa además con el uPAR, y esta interacción ha sido también implicada en la migración celular y la transducción de señales por vía integrinas, puesto que la interacción de uPA a uPAR mejora la afinidad de unión de uPAR a VN. La importancia de uPAR es que su expresión está limitada en condiciones normales, mientras que se eleva en inflamación, remodelación de tejidos o de la MEC y en muchos tumores humanos. Además se ha demostrado que niveles plasmáticos elevados de uPAR se correlaciona con un mal pronóstico para pacientes con cáncer. Una característica de los tumores malignos es su intensa actividad de remodelado de la MEC así como el aumento de su rigidez que confiere una tensión mecánica isométrica recíproca entre fuerzas de tracción celular y elementos de resistencia de la MEC. Nuestros estudios previos en el neuroblastoma infantil sugieren que los cambios cuantitativos y morfológicos observados y relacionados con la tensión integrada de las células y diferentes elementos de la MEC, podrían estar en conexión con el mecanismo por el cual las integrinas perciben las diferencias de tensión en relación con la FN, la VN u otros elementos de anclaje de la MEC. Estudios preliminares en NB describen además una diferenciación celular asociada a la expresión de VN relacionada con su unión a la integrina $\alpha v\beta 5$. Se han descrito dianas terapéuticas, para el tratamiento de diversas neoplasias, que buscan romper la interacción integrina-FN así como modificar las interacciones integrina-VN, uPA-uPAR-VN y/o uPA-uPAR-PAI1-VN.

Hipótesis. Las señales de tensión transferidas desde la MEC a las células del tumor influyen en el crecimiento, diferenciación y migración de los NB. La posibilidad de inhabilitar exclusivamente a las integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ para responder frente a cambios de tensión en la MEC y/o uPA-uPAR para responder a cambios de tracción/compresión permitirá la aplicación de la mecanoterapia en los pacientes con NB. Para explorar nuestra hipótesis contaremos con la especial cepa de ratones deficientes en VN (VN^{-/-}, B6.129S2 (D2)-Vtntm1Dgi/J) de los Laboratorios Jackson (USA) importada por los Laboratorios Charles River (Francia) y los ratones atímicos (nu-nu) que también será suministrada por últimos laboratorios mencionados.

Objetivos específicos. Identificar, cuantificar y caracterizar morfológica y topológicamente la VN presente en los NB humanos y su correlación con las fibras de reticulina, de colágeno y glucosaminoglucanos. Los resultados obtenidos en las muestras de los pacientes, los compararemos con los del material que obtengamos de cada uno de los modelos animales estudiando las distintas etapas de evolución tumoral así como la caracterización de los distintos elementos tensegrales de la MEC.

Material. Estudiaremos tejidos tumorales incluidos previamente en micromatrices con resultados morfométricos previos de elementos de MEC con anticuerpos anti-VN (VN58-1) ab13413 de laboratorios abcam así como el material tumoral obtenido de la experimentación animal.

Métodos. Se cruzará la cepa de ratón VN^{-/-} con: a) una línea de ratones transgénicos utilizada como modelo experimental de NB y b) ratones atímicos utilizados como receptores de trasplante de 1) líneas celulares establecidas y conocidas de NB humano y 2) tumores primarios, estadio 4 y MYCN amplificado. En todo el material tumoral se realizará la caracterización subjetiva y objetiva por análisis de imagen microscópica y diseño de algoritmo específico del estado (distribución, arquitectura y abundancia) de la VN y de su correlación con las fibras de reticulina, colágeno y glucosaminoglucanos

del estroma. Así mismo de determinará la topología y organización de dichos elementos usando el análisis matemático de la Teoría de grafos y análisis estadístico de múltiples características.

Resultados previstos. Esperamos que las respuestas observadas permitan diseñar péptidos que bloqueen funciones críticas de las interacciones integrina-VN, uPA-uPAR-VN y/o uPA-uPAR-PAI1-VN relacionadas con la rigidez de la MEC y la agresividad tumoral, en nuestro modelo de tumores neuroblásticos

OBJETIVOS

Objetivo general:

Las interacciones integrina-VN, uPA-uPAR-VN y/o uPA-uPAR-PAI1-VN son de gran importancia en la organización tisular, desarrollo embrionario, cicatrización de heridas, y remodelado y homeostasis de órganos y tejidos. La identificación de patrones asociados a agresividad de la matriz extracelular en los tumores neuroblásticos infantiles para responder a cambios de tensión, es el trabajo de varios años del grupo de investigación. La integración de una enorme cantidad de datos genéticos e imágenes digitales de muestras tumorales de pacientes españoles posibilita ahora esta búsqueda específica de dianas terapéuticas.

Nuestro proyecto pretende explorar la posibilidad de inhibir exclusivamente los mecanosensores, adhesiones de VN, como diana terapéutica en tumores neuroblásticos con un patrón organizativo asociado a agresividad.

Objetivos específicos:

- Identificar, cuantificar y caracterizar morfológica y topológicamente la vitronectina presente en las muestras tumorales de neuroblastomas humanos.
- Correlacionar los resultados de distribución de la vitronectina con los datos de las fibras de reticulina, de colágeno I y glucosaminoglucanos de estudios previos realizados en las mismas muestras tumorales.
- Caracterizar los distintos elementos tensegrales de la matriz extracelular (vitronectina, reticulina, colágeno I y glucosaminoglucanos) en los cruces de la cepa de ratón VN^{-/-} y:
 - 1) ratones Cre-condicionales de MYCN en células dopamina β -hidroxilasa⁺ (línea de ratones transgénicos utilizada como modelo experimental de neuroblastoma).
 - 2) ratones atímicos utilizados como receptores de trasplante de líneas celulares establecidas de neuroblastoma humano.
 - 3) ratones atímicos utilizados como receptores de trasplante de tumores primarios, estadio 4 y MYCN amplificado.
- Comparar de los resultados obtenidos en las muestras de los pacientes con los del material que obtengamos de cada uno de los modelos experimentales.
- En caso de observar cambios significativos en alguno de los parámetros de los elementos de la matriz extracelular, pasaremos a diseñar y administrar péptidos, con las secuencias de vitronectina mutadas, a ratones silvestres con líneas celulares de neuroblastoma para evaluar su acción bloqueante de la proliferación y agresividad tumoral.

MEMORIA ECONÓMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SOBRE CÁNCER INFANTIL

CONVOCATORIA 2014

TÍTULO DEL PROYECTO

.....

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Rosa Noguera Salvá

.....

ORGANISMO

Instituto INCLIVA

.....

Es imprescindible limitar el número de páginas de la memoria a 5.

MEMORIA ECONÓMICA

	SEP-DIC 2015	2016	2017	ENE-AGO 2018
PERSONAL	1.700	37.000	38.000	30.300
FUNGIBLE	0	11.000	7.500	6.000
INSTALACIONES/EQUIPOS	0	2.000	4.200	2.300
SERV TÉCNICOS	0	2.000	2.000	2.000
VIAJES	200	500	500	300
OTROS	0	500	1.000	1.000
TOTAL	1.900	53.000	53.200	41.900

**Los gastos de viajes, dietas y congresos, no deben superar el 5% del total del proyecto.*

La Fundación aecc concede una ayuda de hasta 150.000 € brutos a tres años, a razón de un máximo de 50.000€ brutos al año. Cabe la posibilidad de presentar un presupuesto creciente, con una variación máxima anual de hasta 10.000€.

Teniendo en cuenta la procedencia de los fondos de la Fundación aecc, la financiación concedida en ningún caso podrá destinarse a costes indirectos