

IMPORTANCIA DE MYCN EN LA SENSIBILIDAD EN CÉLULAS MADRE DE NEUROBLASTOMA A INHIBIDORES DE MTH1 (NEUROBLASTOMA-MTH1)

Director de tesis: Manuel Luis Orta Vázquez

Directora de tesis: Nuria M^a Pastor Carrillo

PROPUESTA CIENTÍFICA

■ Resumen de la propuesta.

Tras el tratamiento de niños con Neuroblastoma (NB) de alto riesgo, menos de la mitad logran sobrevivir. En estos casos es muy frecuente la amplificación del gen codificante para el factor de transcripción N-MYC. Este factor se encarga de mantener, tanto la potencialidad de los neuroblastos, como su proliferación y su expresión disminuye con la diferenciación celular, un factor deseable clínicamente en estos casos. Tras muchos intentos fallidos por encontrar fármacos contra este factor, se hace necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos y dianas en este tipo de NB. Por otra parte, MTH1 es una proteína que elimina nucleótidos oxidados evitando su incorporación en el ADN, algo que si ocurre de forma masiva, puede ocasionar la muerte celular. Los inhibidores de MTH1 eliminan selectivamente células cancerosas, ya que éstas poseen niveles superiores de estrés oxidativo y dependen de niveles elevados de MTH1 para poder vivir. Nuestros datos preliminares muestran, por una parte, como células de NB de alto riesgo disminuyen sus niveles de N-MYC y se diferencian tras un tratamiento con inhibidores de MTH1. Por la otra, mostramos como células de NB con N-MYC amplificado mueren preferencialmente tras tratamientos con inhibidores de MTH1. Todo esto nos lleva a pensar que MTH1 podría ser potencialmente una buena diana en el tratamiento de NB de alto riesgo, lo cual hace este proyecto especialmente relevante. Las células madre del NB han sido descritas como responsables de la tumorigenicidad y las recidivas. A pesar de su importancia en la respuesta a tratamiento, su comportamiento no ha sido estudiado en profundidad. Por ello en el presente proyecto, se pretende conocer en profundidad su respuesta a inhibidores de MTH1. Nuestros datos preliminares muestran que la amplificación de N-MYC sensibiliza a las células madre del NB a inhibidores de MTH1, con lo cual remarcamos la importancia de la propuesta. Los objetivos concretos son: 1) Evaluar la importancia de MTH1 para la supervivencia de las células madre de neuroblastoma. 2) Obtener terapias efectivas para eliminar células madre de neuroblastoma de alto riesgo.

■ Antecedentes del proyecto.

1.1 Características y tratamiento actual del Neuroblastoma .

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia [1]. Los pacientes se clasifican en grupos de riesgo que según la clasificación de la INSS (International Neuroblastoma Staging System) son: 1, 2A, 2B, 3, 4S y 4, con recomendaciones terapéuticas diferentes para cada uno de ellos [2]. Los NB de alto

riesgo, incluyen los niños mayores de 1 año de edad con enfermedad diseminada, INSS estadio 4, (40-50 % de todos los NB) con o sin amplificación del oncogén *N-MYC* y los estadios 2, 3 y 4S, con amplificación de dicho oncogén. Se ha constatado que la amplificación de *N-MYC*, un factor de transcripción abundante en el sistema nervioso que promueve el crecimiento y la supervivencia celular, es el primer marcador biológico del pronóstico del NB ampliamente aceptado. Tal amplificación ocurre en el 30-40% de los pacientes con enfermedad avanzada y esta característica biológica ha demostrado estar claramente asociada a un mayor riesgo de recaída y muerte por progresión de la enfermedad [3]. Los niños con NB estadio 4 representan el subgrupo más grande del NB, y su pronóstico en la mayoría de los casos es deficiente, así como la habilidad de predecir el curso clínico y los resultados de cada paciente. Los tratamientos actuales incluyen una fase de inducción donde se administran ciclos de dosis intensivas de cis-Pt y etopósido alternando con vincristina, ciclofosfamida y doxorubicina. En pacientes con recaídas, se añade topotecán a este régimen. Tras la resección del tumor primario en la fase de consolidación, se administran carboplatino, etopósido y melfalán o busulfano y melfalán. En la fase de mantenimiento, se utilizan agentes diferenciadores como la isotretinoína. Por último se procede a la inmunoterapia. En relación a los tratamientos radioterápicos del NB de alto riesgo han variado extensamente a lo largo del tiempo, empleándose técnicas desde la irradiación corporal total (ICT) a formas de hiperfraccionamiento con dos sesiones de 1.5 Gy diarias.

Actualmente la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica, Protocolo HR- NBL-1/ESIOP, recomienda la irradiación local del volumen preoperatorio del tumor primario tras el trasplante, incluso habiéndose logrado extirpar la totalidad del tumor. La dosis recomendada es 21 Gy en 14 fracciones de 1.5 Gy/día. A pesar de los tratamientos multidisciplinarios usados en la actualidad, como estrategia para mejorar los resultados, la supervivencia libre de eventos a 5 años no es superior al 30% [4,5], siendo necesario la búsqueda de tratamientos que puedan optimizar el control de la enfermedad y por tanto la supervivencia de estos pacientes.

1.2 Células madre de Neuroblastoma.

Los tumores infantiles de tipo Neuroblastoma parecen depender de la presencia de células progenitoras transformadas, también llamadas células madre cancerosas (CSCs). La biología de estas células, incluyendo su comportamiento proliferativo y de diferenciación, parece determinar la evolución del tumor, su resistencia al tratamiento, y la aparición de recidivas [6]. Concretamente, las CSCs, por homología con sus células de origen, las células madre del sistema nervioso, parecen resultar especialmente resistentes a los tratamientos clásicos del cáncer, como la quimioterapia o la radioterapia [7,8]. Este fenotipo puede deberse a múltiples factores, como un nivel incrementado de transportadores de membrana de resistencia a multidrogas, niveles incrementados de enzimas antioxidantes y ventajas en los sistemas de reparación del ADN. Existe un amplísimo interés en el campo por conocer mejor las características de estas CSCs, incluida la sensibilidad a distintas formas de radio- quimioterapia. En nuestro grupo de investigación, somos capaces de aislar y purificar estas células a partir de muestras de pacientes de NB. En el presente proyecto se evaluará la capacidad de los inhibidores de MTH1 de eliminar CSCs. Estos resultados ayudarán sin duda a mejorar la efectividad de la terapia para eliminar a estas células, contribuyendo así a una mejor prognosis en los pacientes.

1.3 Daño-reparación en el ADN y puntos de control de ciclo celular en neuroblastoma.

Los agentes que dañan el ADN, como los agentes quimioterapéuticos que se utilizan actualmente en el tratamiento de neuroblastoma, constituyen una herramienta fundamental para el tratamiento de tumores sólidos, aunque a veces no se logre la

eficacia deseada. Estudios recientes sugieren que diferencias en la fortaleza de los sistemas de reparación del daño en el ADN de tumores tratados con quimio-radioterapia sería una de las causas principales de su pobre respuesta frente a dichos tratamientos [9,10,11]. Por ello, desde nuestro punto de vista, se hace necesario una mejor caracterización para un tumor en particular, en nuestro caso neuroblastoma, de las características de sus sistemas de reparación celular con el propósito de descubrir posibles blancos terapéuticos que nos permitan sensibilizar dichos tumores frente a tratamientos que dañan el ADN.

La respuesta celular al daño en el ADN dependerá entre otros factores de la naturaleza del agente utilizado, la severidad del daño provocado, la adecuada funcionalidad de los puntos de control del ciclo celular y de los sistemas de reparación celular. Una de las lesiones más peligrosas que puede sufrir la molécula de DNA son las roturas de doble cadena en el ADN (DSBs). Los mecanismos principales de reparación de DSBs en células de mamíferos son la recombinación homóloga (HR) y la reparación por reunión de extremos no homólogos (NHEJ). El sistema HR repara las DSBs mediante recombinación entre la cromátida dañada y la misma región de la cromátida hermana que es utilizada como molde [12]. Se trata de un sistema de reparación clásicamente considerado como libre de errores, predominante que tiene lugar en las fases S tardía y G2-M del ciclo celular que requiere la participación, entre otras, de las proteínas RAD51, que cataliza la reacción de intercambio de cadena en el ADN [13], y de las proteínas de susceptibilidad en el cáncer de mama BRCA1 y BRCA2. Por otra parte, la vía NHEJ requiere la participación de las proteínas quinasas dependientes de ADN (DNA-PK), que incluye la subunidad catalítica DNA-PKcs, la endonucleasa Artemis, y el heterodímero KU70/KU80. Las proteínas XRCC4 y ADN ligasa IV catalizan la unión de extremos rotos. Este sistema de reparación es activo durante todo el ciclo celular, predomina en las fases G1 y S temprano y puede generar deleciones, inserciones o translocaciones.

Tal y como se ha dicho anteriormente, el neuroblastoma de alto riesgo presenta un elevado grado de inestabilidad genética que incluye la amplificación del oncogén *N-MYC*. Aunque los mecanismos moleculares no están claros, el origen de dicha inestabilidad podría residir en fallos en el mecanismo de reparación NHEJ [14]. Los estudios de Shulte y col. [15] indican que líneas de neuroblastoma genéticamente estables presentan mayor capacidad de reparación de DSBs y mayor expresión de XRCC4, que las líneas genéticamente más inestables, por lo que una mayor capacidad de reparación de DSBs estaría relacionada con menor agresividad en neuroblastoma. En relación con esto, una reciente contribución ha demostrado que en las líneas de neuroblastoma de alto riesgo, hay un marcado decremento de elementos clásicos de la vía NHEJ (en adelante vía canónica, cNHEJ) y por el contrario una más que notable abundancia de elementos de la vía alternativa de NHEJ (aNHEJ), como la ligasa III y PARP [16]. La vía aNHEJ ha sido relacionada en numerosos artículos con el incremento en la inestabilidad genética [17] y según algunos autores es la responsable de las translocaciones que caracterizan a las células de neuroblastoma de alto riesgo (estadio IV) como son las deleciones en *1p,3p 4p 11q* o ganancias de *17q 1q* y *2p*. Sin embargo, no tenemos conocimiento según nuestras búsquedas bibliográficas de cómo reparan las células madre cancerosas de estas líneas de alto riesgo. Es decir, si son más proclives a la reparación utilizando cNHEJ o si por el contrario poseen de la misma forma una marcada tendencia a la reparación utilizando aNHEJ. Estudios recientes realizados en células madre de glioblastoma indican que el mecanismo de reparación homóloga es el posible responsable de la supervivencia celular tras la radiación ionizante [18], sin embargo todavía queda pendiente caracterizar mejor los sistemas de reparación en las células madre de neuroblastoma.

Las proteínas p53 y pRB son supresoras de tumores y son fundamentales para establecer el punto de control en G1, de tal forma que son esenciales para evitar la

replicación si el DNA está dañado. La eficacia de las terapias que involucran daño en el DNA está directamente relacionada con el estatus de ambas proteínas en el tumor, de forma que mutaciones en cualquiera de ellas otorgará resistencia a la terapia, ya que las células cancerosas se saltarán el punto de control y escaparán de la apoptosis.

En condiciones normales, tras producirse daño en el DNA, la proteína p53 se induce y de esta forma inicia la activación transcripcional de un gran número de genes incluyendo a BAX y a p21. P21 se une a CDK2 inhibiéndola y causando el paro en G1. BAX por su parte inducirá apoptosis cuando el daño no pueda ser reparado. Por otra parte, pRB necesita estar funcional para que el paro en G1 se dé tras la inducción de daño. La pérdida de pRB no interfiere con la inducción de p21 o la inhibición de CDK2, ello sugiere que pRB actúa aguas debajo de p21. Por otra parte, MDM2 es una ubiquitina ligasa que reconoce el dominio N-terminal de p53 actuando como un regulador negativo de la misma. Las mutaciones en p53 son comunes en la mayoría de los cánceres, sin embargo sólo ocurren en un 2% de los neuroblastomas primarios. Tras la quimioterapia de neuroblastoma, las recidivas pueden presentar amplificación de MDM2 y pérdida de p14, lo cual resulta en la inhibición de la ruta p53. Dentro de los casos de neuroblastoma inalterados para p53, la respuesta al daño en el DNA parece estar mediada por los niveles de expresión de MYCN. N-MYC regula muchos componentes dentro del eje p53-p21, por ejemplo N-MYC regula transcripcionalmente tanto a p53 como a su inhibidor MDM2 y suprime la transcripción de p21. Sin embargo p53 permanece transcripcionalmente activo, e induce p21 tras el daño en el DNA en células con amplificación N-MYC. A pesar de esto, las células con esta amplificación fallan a la hora de inducir paro en G1, lo cual sugiere que debe de existir una alteración aguas abajo de p21 que evite que se establezca el bloqueo.

Según trabajos recientes, no solo la sobreexpresión de N-MYC, sino también la de CDK4 pueden jugar un importante papel en neuroblastoma. Niveles altos de CDK4, habitualmente son encontrados en neuroblastomas con amplificación en *N-MYC* y pueden debilitar al punto de control de G1. Estos datos sugieren que la inhibición conjunta de CDK4 junto con el agente quimioterapéutico inductor de daño en el DNA, podría ser una estrategia interesante en el tratamiento de tumores con amplificación *N-MYC* [19]. Sin embargo, el principal problema en neuroblastoma y en el cáncer en general son las recidivas que se han vuelto resistentes a terapia. En este caso, aparte de la amplificación en *N-MYC*, estas células han desarrollado mutaciones extra en la vía p53 o pRB. Un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares que operan en estas células, mejoraría sin duda los tratamientos en las recaídas.

1.4 MTH1 como nueva diana de tratamiento del cáncer.

Recientemente se ha descubierto una nueva estrategia para tratar el cáncer. Esta estrategia está basada en la conversión de nucleótidos oxidados, altamente abundantes en células cancerosas, en lesiones en el DNA altamente tóxicas. MTH1, es una proteína también conocida como NUDT1, que pertenece a la familia de las pirofosfatasa nudex, las cuales convierten los nucleótidos trifosfatos oxidados, como la 8-oxo-deoxi-guanina (8-oxoGTP) y la 2-hidroxi-deoxiadenosina (2-OH-ATP) a sus correspondientes formas monofosfato, evitándose de esta forma la incorporación de ambos por las polimerasas en el material genético. La incorporación de ambos nucleótidos en el DNA es tóxica, ya que son sustrato de los sistemas de reparación por escisión de bases (BER) y de reparación de emparejamientos erróneos (MMR), los cuales en su mecanismo de acción generan roturas de cadena simple y gaps que pueden ser convertidos en roturas de cadena doble por la horquilla de replicación o la de transcripción. Tanto las roturas de cadena simple, como los gaps ocurren de forma transitoria durante el proceso de reparación. Sin embargo, cuando hay muchas lesiones reparándose, este proceso se satura y los intermediarios quedan abiertos

durante mucho más tiempo, interfiriendo con el correcto metabolismo del ADN. Por otra parte, hay otro mecanismo de acción que determina la toxicidad de estos nucleótidos oxidados: la 8-oxo-dG puede emparejar con timina y por lo tanto puede ser mutagénica tras la replicación [20] (Figura 1).

Uno de los datos mejor contrastados en el cáncer es que las células cancerosas poseen niveles incrementados de estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno afectan al material genético, proteínas, lípidos y también a pequeñas moléculas como los nucleótidos. Este desequilibrio redox ha sido recientemente utilizado por miembros de nuestro grupo de investigación como método para erradicar células cancerosas [21]. Las células cancerosas poseen de forma natural, niveles incrementados de MTH1 para poder sobrevivir con el gran estrés oxidativo que presentan, cosa que no ocurre en células normales. La inhibición selectiva de MTH1 es capaz de ocasionar la muerte de un gran número de células cancerosas de distinto origen, sin embargo esta inhibición no afecta a células no transformadas. La muerte celular de las células cancerosas va acompañada de una incorporación masiva de nucleótidos oxidados en el ADN y de un fuerte daño en el mismo [21]. Con estos experimentos se demuestra la habilidad de inhibidores de MTH1 para erradicar selectivamente las células cancerosas.

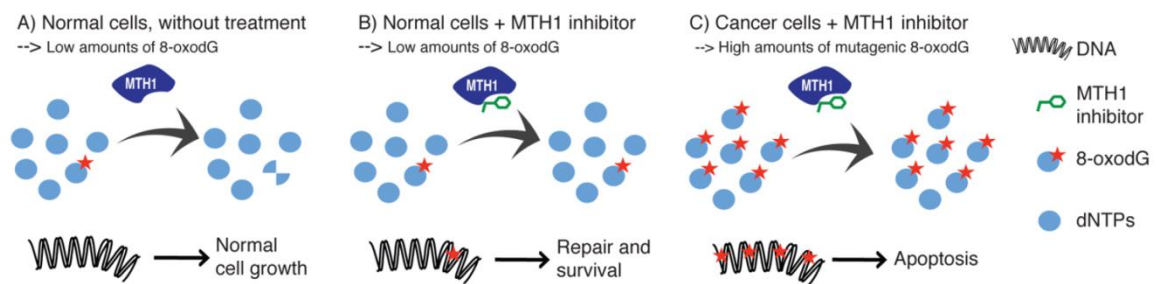


Figura 1. Modelo de muerte celular inducida en células cancerosas por inhibidores de MTH1.

■ Objetivos del proyecto.

Un elevado porcentaje de los neuroblastoma de mal pronóstico tienen amplificación de *N-MYC*. Dada la poca eficacia terapéutica de los tratamientos que actualmente se emplean en oncología clínica, en estos casos se hace necesario el estudio y desarrollo de nuevas terapias. Puesto que se ha descrito que células con *N-MYC* amplificado presentan elevados niveles de estrés oxidativo y replicativo, podría ser posible que su supervivencia dependiera de niveles altos de la enzima MTH1. Por tanto **nuestra hipótesis** es que MTH1 podría ser una nueva diana farmacológica en el tratamiento de neuroblastoma de alto riesgo.

Para establecer dicha hipótesis nos basamos en datos preliminares (ver ANEXO). Estos datos muestran que un tratamiento con inhibidores de MTH1 induce tanto diferenciación, como muerte preferencial de células de neuroblastoma que presentan amplificación de *N-MYC* con respecto a células sin amplificación, creciendo tanto en condiciones "de adherencia" (normal) como neuroesferas (enriquecidas en células madre del cáncer).

Los objetivos que se plantean para este proyecto son los siguientes:

1. Evaluar la importancia de MTH1 para la supervivencia de las células madre de

neuroblastoma.

Esto se conseguirá mediante la cuantificación de niveles de estrés oxidativo y de enzima MTH1 en células de neuroblastoma con diversos genotipos. Los cuales incluyen amplificación o no de N-MYC y defectos en la ruta p53/Rb. Por otra parte en este mismo panel se monitorizarán los efectos celulares tras la inhibición de MTH1.

2. Obtener terapias efectivas para eliminar células madre de neuroblastoma de alto riesgo.

Tras la base obtenida tras la ejecución del objetivo 1, se realizará una búsqueda de posibles sinergias entre los inhibidores de MTH1 e inhibidores de PARP/CDK4 o bien radiación. Primero *in vitro* y posteriormente las combinaciones más interesantes pasarán a ser evaluadas *in vivo*.

En el desarrollo de ambos objetivos se trabajará con células madre de neuroblastoma, responsables de las resistencias y las recidivas, con lo que los datos positivos generados serían tremendamente significativos de cara a la terapia de estos niños.

■ Metodología y plan de trabajo. Cronograma.

Para cumplir dichos objetivos, se han diseñado una serie de tareas que se distribuyen siguiendo el siguiente esquema (Figura 2):

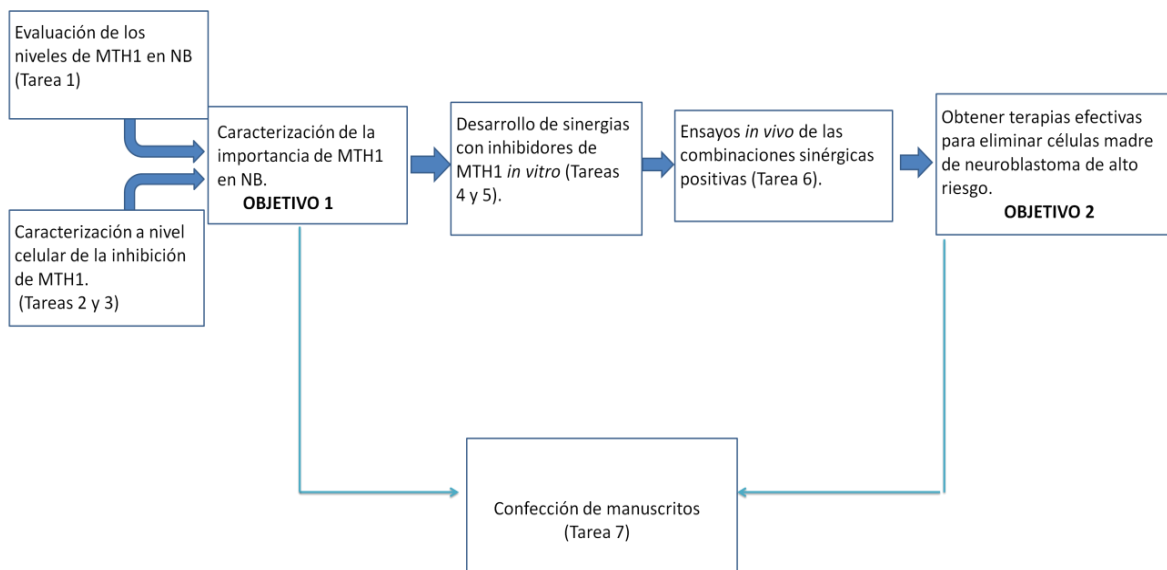


Figura 2. Tareas propuestas en el proyecto para cumplir los objetivos fijados.

Líneas celulares propuestas:

El desarrollo de estrategias eficaces para el tratamiento de neuroblastoma requiere a nuestro juicio, la utilización de modelos celulares cuyo comportamiento sea lo más parecido a los tumores de origen. En el presente trabajo se utilizarán tanto líneas celulares comerciales portadoras de diferentes alteraciones genéticas, así como líneas primarias de neuroblastoma. Estas líneas primarias se han obtenido mediante la

disgregación enzimática de biopsias de tumores y han sido cedidas por el grupo liderado por el Dr. Ricardo Pardal (IBiS).

En el presente trabajo, se van a desarrollar experimentos en los que las células de neuroblastoma crecerán tanto “en adherencia” como “en suspensión”. En este último caso, las células se cultivarán en sustratos no adherentes en presencia de factores de crecimiento para células madre de la cresta neural como EGF o FGF, enriqueciéndose de esta manera el cultivo en células madre del cáncer (CSCs). En el sustrato no adherente, las células madre de NB crecen formando colonias esféricas llamadas neuroesferas, compuestas por cientos o miles de progenitores indiferenciados crecidos a partir de una sola célula madre [22]. Estas esferas pueden disociarse con acutasa® (Sigma) [23] y las células cultivarse en sustrato adherente, donde suele darse mayor diferenciación hacia neuronas y otros tipos celulares.

Los resultados más significativos que involucren a experimentos hechos utilizando neuroesferas, se verificarán disgregando las mismas y pasando la suspensión celular resultante por “cell sorter” utilizando anticuerpos contra los marcadores de superficie CD114 o CD133 [24], siendo este paso necesario para confirmar que los resultados obtenidos se corresponden con células madre del cáncer.

Se van a usar líneas primarias y comerciales con diferentes características genéticas como la amplificación de *N-MYC* y/o alteraciones en componentes de la vía p53/pRB. También se usará un xenograft derivado de paciente (PDX) que contiene muchos de los tipos celulares del tumor original y que se ha mantenido en ratones inmunodeprimidos, por lo que ha estado continuamente expuesto a condiciones *in vivo*. Los resultados en PDX pueden ser por tanto más representativos de una situación real del tumor. A continuación se detallan las características de las líneas:

Tabla 1. Líneas celulares que serán utilizadas en el proyecto.

Línea celular	<i>N-MYC</i>	vía p53-pRB	Notas/Otras alteraciones	NOTAS
SK-N-SH	norma 	normal	del 14 gain 17q	comercial
NB14t	norma 	normal	(primaria)	Primaria. Cedida grupo R. Pardal
SK-N-MC	norma 	mutante	EWS-FLi1 fusión	comercial
IMR32	amplif	normal	del 1p 11q gain 17q	comercial
SMS-KCNR	amplif	normal		comercial
SK-N-BE (2)	amplif	alterada	del 1p gain 17q	comercial
NMB	amplif	alterada		comercial

En las **tareas 1, 2, 4 y 5** los experimentos se desarrollarán tanto “en adherente” como “en suspensión”, utilizando tanto las líneas primarias como las comerciales.

Objetivo 1. Evaluar la importancia de MTH1 para la supervivencia de las células madre de neuroblastoma.

Obj 1. Tarea 1: Análisis del nivel de estrés oxidativo y de los niveles de enzima MTH1 en líneas celulares de neuroblastoma.

Miembros de nuestro grupo de investigación (profesor Thomas Helleday) ha propuesto en publicaciones recientes a MTH1 como una nueva diana en el tratamiento contra el cáncer [25,26]. De hecho, el inhibidor de MTH1 Karonudib (TH1579), que será utilizado en este estudio, está siendo testado en ensayos clínicos FASE I (MASTIFF, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03036228>).

Esta proteína se encuentra sobreexpresada en un gran número de células cancerosas y funciona evitando que nucleótidos oxidados lleguen a incorporarse en el ADN, lo cual si ocurre de forma masiva, puede llegar a matar a la célula. Las células cancerosas, poseen un nivel superior de estrés oxidativo en comparación con células no transformadas, y por lo tanto el pool de nucleótidos oxidados es superior en ellas. En esta situación, MTH1 les resulta esencial para poder vivir y consecuentemente su inhibición se traduce en una muerte selectiva de estas células sin apenas afectarse las no transformadas. Recientemente el mismo grupo ha publicado en Cancer Research un trabajo en el que se demuestra que el ambiente rédox es esencial para determinar la eficacia de los inhibidores de la enzima MTH1 [26]. En esta tarea, se pretende evaluar las posibles diferencias existentes de los niveles de la enzima MTH1 en las diferentes variantes de neuroblastoma. Asimismo, estudiaremos posibles correlaciones entre los niveles de esta enzima y el estrés oxidativo cuantificado en cada una de ellas.

El estrés oxidativo se analizará mediante el ensayo fluorimétrico de la 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCHF). Este fluorocromo, es una molécula no fluorescente permeable a la membrana plasmática de las células. Cuando entra en la célula se des-esterifica y se vuelve intensamente fluorescente como resultado de los procesos oxidativos que transcurren en su interior. Se trata de un método sensible y rápido para medir especies reactivas de oxígeno en respuesta a un metabolismo celular oxidativo. Las células serán tratadas con DCHF y la señal será medida en un lector de fluorescencia de multipocillos.

Los niveles de la enzima MTH1 serán cuantificados mediante western-blot. Se realizarán extracciones de proteína de células de neuroblastoma, electroforesis en acrilamida y transferencias a membranas de nitrocelulosa donde se procederá a la detección de MTH1 mediante anticuerpos frente a la misma (Novus Biologicals).

Una vez cumplimentada esta parte, podremos establecer posibles relaciones entre los parámetros estrés oxidativo-niveles de MTH1-amplificación de *N-MYC*.

Obj 1. Tarea 2: Estudio de la inhibición de la enzima MTH1 en células de neuroblastoma.

El grupo de Helleday ha desarrollado inhibidores altamente específicos contra la enzima MTH1: TH588 y TH1579 (Karonudib). Estos inhibidores serán evaluados por primera vez en neuroblastoma. Estudios previos sugieren que la sobreexpresión de MYC parece estar correlacionada con altos niveles de estrés oxidativo [27]. Dado que los inhibidores de MTH1 son más efectivos en células que presentan un mayor estrés oxidativo, podríamos pensar que células que presenten amplificación en *N-MYC* resultarían más sensibles a estos inhibidores. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran como diferentes clones que sobreexpresan *c-MYC* resultan marcadamente más sensibles a TH588 y TH1579 en comparación con células que sobreexpresan GFP (datos no mostrados).

Por otra parte, hemos obtenido resultados que muestran como líneas de neuroblastoma con amplificación en *N-MYC* presentan un número mayor de células en

fase S, lo cual está en línea con datos publicados que sugieren que altos niveles de MYC pueden inducir estrés replicativo [28]. Ya que los inhibidores de MTH1 dependen de la incorporación de 8-oxoG en el ADN, un número mayor de células en S implicaría una mayor sensibilidad a los mismos. Esta última reflexión, junto con el hecho de tener niveles incrementados de estrés oxidativo, podrían explicar por qué células con amplificación de *N-MYC* resultan más sensibles a los inhibidores de MTH1 creciendo tanto en adherente como en neuroesferas (Anexo resultados Fig 1).

Por otra parte, se ha descrito que los casos de neuroblastoma con peor pronóstico y que presentaban una mayor resistencia a tratamientos y recidivas, son aquellos que portaban mutaciones tanto en la ruta de p53/pRB como amplificación en *N-MYC* [19]. Células que sobreexpresan *N-MYC* normalmente fallan en establecer el checkpoint de G1 y logran la resistencia escapando a la apoptosis. Por todo ello, nos parece sumamente interesante investigar la respuesta de células de neuroblastoma a estos inhibidores.

Se llevarán a cabo diferentes ensayos para valorar la supervivencia, daño en el ADN, análisis del ciclo y muerte celular en células no transformadas y en un panel de células de NB que presentan alteraciones en *N-MYC* y/o en proteínas de la ruta p53/pRB con diferentes concentraciones de TH588 y TH1579.

2.1 Supervivencia celular: Este parámetro será evaluado mediante el empleo de ensayos clonogénicos. Para las líneas control no transformadas el ensayo se efectuará de la forma habitual [29]. En cuanto a las líneas de neuroblastoma, muchas de ellas presentan defectos en la adherencia, posiblemente como resultado de la amplificación de *N-MYC*, por lo que los ensayos de supervivencia en este caso se realizarán en soft-agar [30]. La supervivencia celular tras los tratamientos con inhibidores de MTH1 se comparará con aquellas obtenidas al silenciar mediante siRNA MTH1 en nuestras líneas de Neuroblastoma.

2.2 Ensayo de viabilidad celular MTT: De forma alternativa a los ensayos clonogénicos, se evaluará la viabilidad celular utilizando en ensayo MTT [31]. Las líneas celulares de neuroblastoma serán sembradas en placas multipocillos y tratadas con dosis crecientes de los inhibidores de MTH1. Pasadas 72 horas la viabilidad celular se evaluará utilizando ensayo MTT.

2.3 Análisis de los parámetros del ciclo y apoptosis: Como hemos comentado anteriormente la efectividad de terapias que tienen como finalidad dañar el ADN dependen de la habilidad de las células de detenerse en el checkpoint de G1. En este estudio se ensayarán diferentes dosis de los inhibidores de MTH1, así como distintos tiempos con el propósito de poder elegir posteriormente aquellas dosis y tiempos más efectivos. Analizaremos en porcentaje de células en cada fase del ciclo celular mediante citometría de flujo. Con ello, pretendemos conocer la capacidad de los diferentes genotipos de establecer los respectivos puntos de control y la manera que tienen de resolverlos induciendo o no apoptosis. La muerte celular será también evaluada utilizando en ensayo de Anexina V-yoduro de propidio mediante citometría de flujo.

Además se procederá al análisis mediante western blot de diferentes marcadores apoptóticos y necroptóticos [32]. Para ello estudiaremos la activación de parámetros bioquímicos específicos a la ruta intrínseca de apoptosis, los cuales incluyen; la liberación de citocromo c de la mitocondria en el citoplasma de la célula, la activación enzimática de caspasa-2, caspasa-3 y caspasa-9, el corte de poli-ADP ribosa polimerasa (PARP). Como marcador de necroptosis analizaremos RIPK1.

2.4 Detección de lesiones oxidativas: Como hemos comentado anteriormente en los antecedentes, la inhibición de MTH1 en células con niveles altos de estrés oxidativo se traduce en una incorporación masiva de 8-oxoG en el ADN. Dichas bases anómalas una vez incorporadas generan diferentes tipos de lesiones en el ADN, que pueden desencadenar la muerte celular. En el presente proyecto, vamos a utilizar el ensayo cometa en condiciones alcalinas acoplado a la glicosilasa OGG1 para cuantificar los niveles de incorporación de 8-oxoG en el ADN. Las células serán incluidas en agarosa de bajo punto de fusión, lisadas e incubadas con la glicosilasa OGG1, que reconoce la 8-oxoG incorporada. Dicha enzima generará un corte de cadena simple tras el reconocimiento de la base oxidada. Estas roturas producidas en el ADN, migrarán al realizar posteriormente la electroforesis y producirán una cola que será tanto mayor cuanto más cortes sean inducidos por la enzima. Tanto el porcentaje de ADN en la cola como el momento de la cola serán analizados utilizando el software Comet Score. Es de esperar que niveles mayores de incorporación de 8-oxoG como consecuencia de la inhibición de MTH1, se correspondan con niveles superiores de migración de roturas en el ADN después de la incubación con OGG1 [33].

2.5 Detección de daño en el DNA: El ensayo cometa se realizará también de forma convencional para la detección y cuantificación de daño general tras la inhibición de MTH1. Además se efectuarán ensayos inmunocitoquímicos para la detección de foci de reparación [29] de la forma fosforilada de la histona H2AX (anti- γ -H2AX, Millipore), un marcador de daño general, 53BP1, marcador de roturas de doble cadena y RAD51, marcador de reparación por recombinación homóloga (anti-53BP1 y anti RAD51, Santa Cruz). La evaluación de los foci de reparación resultantes se realiza mediante el recuento de los mismos mediante la toma de imágenes en microscopía de fluorescencia confocal y análisis de las mismas utilizando el software Image J (NIH).

Obj 1. Tarea 3 Determinación de los índices de selectividad de los inhibidores de MTH1, agentes quimioterapéuticos usados actualmente y radioterapia.

Puesto que tanto las células cancerosas como las no cancerosas se exponen a los agentes terapéuticos durante los tratamientos, es fundamental determinar el índice de selectividad para los agentes usados con el objetivo de disminuir el daño en células no cancerosas. Se incluirán en el estudio **agentes quimioterapéuticos, radioterapia, inhibidores de MTH1**. Para ello se expondrán células no cancerosas y células de neuroblastoma con *N-MYC* amplificado a diferentes dosis de los diferentes agentes, y se analizará el efecto mediante ensayos clonogénicos y de viabilidad con MTT. Se calculará el índice de selectividad como la relación entre la muerte producida en células cancerosas y la producida en células no cancerosas.

Objetivo 2. Obtener terapias efectivas para eliminar células madre de neuroblastoma de alto riesgo.

Obj 2. Tarea 4. Estudio de posibles sinergias utilizando inhibidores de MTH1 en combinación con inhibidores de PARP/CDK4 y radiación ionizante.

Con esta tarea pretendemos potenciar la muerte celular provocada por los inhibidores de MTH1, lo cual resulta especialmente interesante en aquellos genotipos que presenten mayor resistencia.

Los inhibidores de PARP son utilizados frecuentemente en la terapia del cáncer [34]. Estos inhibidores funcionan bloqueando los intermediarios de reparación que se generan durante la excisión de bases anómalas, dejando las roturas generadas abiertas. Estas roturas de cadena simple interfieren con las maquinarias de replicación y transcripción generando roturas de cadena doble que resultan más difíciles de reparar. Ya que un tratamiento con inhibidores de MTH1 desencadena la incorporación

de una gran cantidad de bases oxidadas en el ADN, estas células comenzarán muchos eventos de reparación y se generarán muchos intermediarios de reparación que podrán ser bloqueados con los inhibidores de PARP, desencadenando roturas de cadena doble y muerte celular. Por otra parte, las roturas de cadena doble generadas podrían ser el sustrato de la vía **aNHEJ** en células con predominancia de esta vía, como aquellas con amplificación de *N-MYC* [16], vía que recordemos necesita PARP.

También se ha descrito que células que tienen amplificación de *N-MYC* no establecen el checkpoint de G1, debido a niveles incrementados de CDK4. Si se utiliza un inhibidor químico de esta quinasa se reestablece el checkpoint y se desencadena la muerte celular inducida por doxorubicina [19]. En el presente proyecto pretendemos combinar TH588 y TH1579 con inhibidores de PARP (olaparib, Santacruz) o de CDK4 (RO50512, Pfizer).

Se ha descrito recientemente la posible implicación de MTH1 en respuesta a radiación ionizante [35, 36]. De hecho el estrés oxidativo inducido por radiación ionizante incrementa los niveles de nucleótidos oxidados que potencialmente son un sustrato para MTH1, la cual evitaría que se incorporaran en el ADN. En el presente proyecto pretendemos comprobar si los inhibidores de MTH1 podrían tener una potencial utilizad como adyuvantes de la radioterapia. Se pretende combinar TH588 y TH1579 junto con radiación ionizante administrada de forma aguda o fraccionada en células de neuroblastoma.

Para ello se realizarán los mismos ensayos descritos en las tareas 2.1, 2.2, 2.3 y 2.5.

Obj 2. Tarea 5. Estudios de diferenciación celular de células de neuroblastoma tratadas con inhibidores de MTH1 y combinaciones con radiación ionizante.

Una estrategia ampliamente utilizada en el tratamiento de Neuroblastoma son los tratamientos con agentes diferenciadores como el ácido retinoico [37]. Una vez diferenciadas, las células de neuroblastoma ven mermada su capacidad proliferativa. Recientemente en nuestro grupo de investigación hemos descubierto como células primarias de neuroblastoma (línea NB14t) al irradiarse se diferencian en células de músculo liso (Anexo Fig 2). Estas células primarias son especialmente interesantes ya que el grupo de investigación liderado por el profesor Ricardo Pardal ha descrito que como a pesar de su incapacidad de inducir tumores, estas líneas contribuyen al incremento en la tasa de crecimiento de tumores inducidos por otras células de neuroblastoma cuando se inyectan juntas en animales [38].

Entre nuestros datos preliminares también presentamos la diferenciación que se lleva a cabo cuando líneas celulares con amplificación en *N-MYC* se cultivan durante varios días en presencia de inhibidores de MTH1 (Anexo Fig 2). En este caso la diferenciación aparentemente se da hacia neurona. Esta diferenciación se ve acompañada de una disminución en los niveles de N-MYC monitorizados mediante western blot. Esta disminución de N-MYC es bastante interesante ya que este factor de transcripción está relacionado con la expansión de células progenitoras y la inhibición de la diferenciación [39].

Se pretende describir el proceso de diferenciación que se lleva a cabo en líneas de neuroblastoma tras el tratamiento con inhibidores de MTH1 o la exposición a radiación ionizante. De la misma forma se combinará la irradiación junto con inhibidores de MTH1 para estudiar posibles sinergias en esta diferenciación, como las descritas cuando se cotrata con ácido retinoico e inhibidores de la histona deacetilasa 8 [40]. Para ello, se analizará la morfología celular así como la expresión de marcadores de diferenciación mediante inmunofluorescencia. Como indicador de músculo liso se utilizarán anticuerpos contra la isoforma de alfa-actina de músculo liso (anti- α -Sm-1,

SIGMA). Como indicador de diferenciación a neurona productoras de catecolaminas se utilizarán anticuerpos contra la dopa decarboxilasa (DDC, Millipore). De la misma forma se analizarán los niveles de N-MYC tras los tratamientos y la posible inducción de senescencia celular (ensayo de beta galactosidasa).

Obj 2. Tarea 6. Experimentos *in vivo*: En el grupo de investigación del profesor Thomas Helleday se ha demostrado que los inhibidores de MTH1 tienen una potencial aplicación en muchos tipos de cáncer debido a su fuerte selectividad hacia células cancerosas [21]. En el anexo se incluyen datos que muestran como estos inhibidores son capaces de eliminar a células de neuroblastoma *in vivo* (Anexo Fig 3) en un modelo de pez cebra.

Animales: Se utilizarán ratones sanos C57BL/6J (Charles Rivers) de entre 6 a 8 semanas, que serán mantenidos en jaulas al menos una semana antes de la experimentación para facilitarles la aclimatación a las condiciones de laboratorio. Tendrán acceso *ad libitum* a alimentos (Chow diet) y agua durante todo el ensayo. Con el fin mantener el número experimental de ratones tan bajo como sea posible, se utilizará solo un género. Siguiendo los protocolos previos publicados por nuestro equipo investigador [21], la experimentación se llevará a cabo en ratones hembras. Tanto la estabulación, experimentación, como el sacrificio de los animales se realizará en el animalario de la Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla [Antonio Ayala (aayala@us.es), Oscar Pintado (oscarintado@us.es)]. Todos los ensayos con animales deberán ser autorizados por el Comité Ético de la Universidad de Sevilla

Cálculo del tamaño de la muestra: De acuerdo con la literatura y estudios previos anteriores de nuestro equipo de investigación [21], esperamos rechazar la hipótesis nula por diferencias de al menos 30% ($\delta = 30$) entre el control y los grupos experimentales. Utilizando un coeficiente de variación de $\sigma = 31.09\%$ y la fórmula de Sachs: $N = 2 \cdot \frac{z\alpha}{2} \cdot \frac{z\pi}{2} \cdot \frac{2}{(\sigma / \delta)^2}$ o $N = F \cdot \frac{2}{(\sigma / \delta)^2}$, donde F puede obtenerse a partir de tablas de distribución. Si el 80% de confianza, $F = 15,7$. Esto resulta en un $N = 15,7 \cdot \frac{2}{(31,09 / 30)^2} = 16,87$ o 17 ratones por grupo. Por lo tanto, se pretende utilizar como mucho 17 animales x 15 grupos = 255 animales.

Eutanasia: Los animales serán sacrificados al final del estudio por sobredosis de pentobarbital (dilución 1:10 en NaCl, 150 mg / kg ~ 200 μ l) por vía intraperitoneal. Durante todo el ensayo se llevará la observación diaria del bienestar de los animales. Esta observación contempla la pérdida de actividad, peso, alimentación y consumo de agua. Se pondrá especial atención en la aparición de posibles signos de toxicidad: temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma. Si durante este período, algún animal enferma antes del término de la experimentación, se sacrificará inmediatamente de forma compasiva siguiendo los criterios de punto final para aquellos animales que presenten signos de dolor o daño severo. Se retirarán los animales que puedan aparecer muertos, anotando el dato de la fecha y tiempo del suceso.

Procedimiento experimental: Para confirmar la aplicabilidad de los resultados obtenidos en el proyecto en un modelo más cercano a la realidad, **aquellos resultados positivos obtenidos de las combinaciones** anteriormente descritas serán evaluadas *in vivo* en ratones inmunocompetentes [41]. En nuestros laboratorios utilizaremos células procedentes del modelo de ratón TH-MYCN para inducir tumores en nuestros ratones de experimentación (cepa C57BL/6J). Los ratones transgénicos TH-MYCN recapitulan muchas características clínicas de neuroblastomas agresivos en humanos y son un poderoso modelo para estudios preclínicos en neuroblastoma. Células de neuroblastoma agresivo procedentes de tumores de estos ratones, los cuales expresan altas cantidades de N-MYC humano, serán cedidas por el grupo de investigación del Dr. Ricardo Pardal [42].

Las células (10^6) serán inoculadas subcutáneamente en el flanco posterior. Mediante palpación, se examinará el crecimiento del tumor, el cual se medirá con un calibre de tal forma que cuando llegue a 5 mm (aprox.10 días post-inoculación) se comenzarán con los tratamientos. El grupo de ratones que va a ser sometidos a radiación ionizante se le suministrará dos dosis de irradiación de 2 Gy separados por un periodo de tiempo de 24 horas. Se espera que estos ratones no tengan ningún tipo de inmunodeficiencia.

Tratamientos

1. Grupo 1 control (vehículo) 3x
2. Grupo 2 inhibidor de MTH1 3x
3. Grupo 3 inhibidor de PARP (1x), CDK4 (1x), Radiación ionizante (1x).
4. Grupo 4 combo 3x
5. Grupo 5 control positivo (DOXORUBICINA).

Las combinaciones de inhibidores de MTH1 y los fármacos descritos en el objetivo 2, así como controles positivos serán administrados intravenosamente a través de la vena lateral de la cola. Utilizaremos como controles positivos los fármacos utilizados de forma regular en el tratamiento de neuroblastoma como la doxorubicina, para poder comparar la eficacia de nuestras combinaciones con la terapia vigente. Los ratones serán sacrificados cuando el diámetro del tumor supere los 17 mm, día que será tomado como tiempo de supervivencia.

Al final del período de experimentación, se procederá al sacrificio del animal, según procedimientos legales anteriormente descrito, y se analizará un estudio anatómico-patológico del tumor mediante análisis inmuno-histoquímicos.

Brevemente, una vez sacrificados se analizará del volumen del tumor por un investigador a doble ciego, tanto de los grupos experimentales como de los grupos controles. Una vez pesados, los tumores se fijarán con PFA al 4% e incluirán en parafina hasta su análisis histológico. Secciones transversales de parafina en serie se teñirán con hematoxilina y eosina o tricómico de Masson (Kit Accustain) para su observación morfológica. Para determinar el posible efecto terapéutico de los inhibidores de MTH1 y los fármacos utilizados, se analizarán las muestras histológicas mediante técnicas que abarcan desde la exploración de marcadores de viabilidad celular hasta el infiltrado leucocitario en los diferentes tumores [TUNEL, γ -H2AX (marcador de daño ADN), Ki64 (proliferación), contenido en macrófagos (Mac3/LY6C), Linfocitos T (CD4, CD8, CD25), contenido en neutrófilos (LY6G), células plasmáticas (B220/CD138)].

Tarea 7. Evaluación de resultados y confección de manuscritos.

ANEXO: Resultados preliminares INHIBICIÓN DE MTH1 EN NEUROBLASTOMA.

Figura 1: Los tratamientos con el inhibidor de MTH1 TH588 afectan más a células que sobreexpresan *N-MYC*. Ensayo de neuroferas de las líneas SKNSH (sin amplificación) e IMR32 (amplificación en *N-MYC*) en presencia de TH588. Las células se sembraron en medio de la cresta neural en condiciones de no adherencia, se trataron con TH588 y las neuroferas fueron fotografiadas a los 7 días.

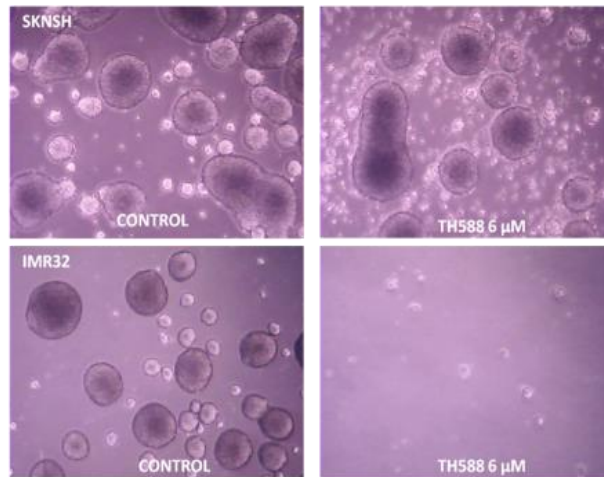
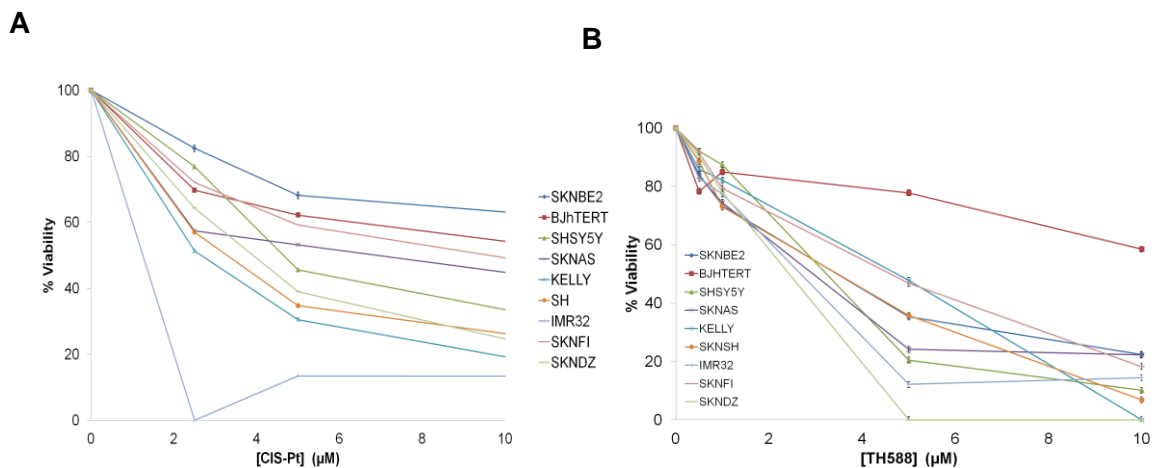


Figura 2: Los tratamientos con inhibidores de MTH1 son más selectivos que tratamientos convencionales, como el Cis-Platino e inducen selectivamente degradación de *N-MYC*. A-B Ensayos de viabilidad en un panel de líneas de Neuroblastoma en presencia de Cis-Platino o con el inhibidor de MTH1 TH588. Se muestra además la respuesta de la línea no cancerosa BJhTERT. C-Western Blot que muestra los niveles de MTH1, *N-MYC* y cleaved-PARP (indicador de apoptosis) en la línea no cancerosa BJhTERT y en la línea de neuroblastoma de alto riesgo SKNBE (2). Puede apreciarse como los niveles de MTH1 junto con los de *N-MYC* se encuentran elevados en la línea cancerosa. Tras el tratamiento con los inhibidores de MTH1 se puede observar un descenso en los niveles de *N-MYC* junto con un aumento en los niveles de cleaved-PARP, caso que no ocurre cuando las células son tratadas con Cis-Platino.



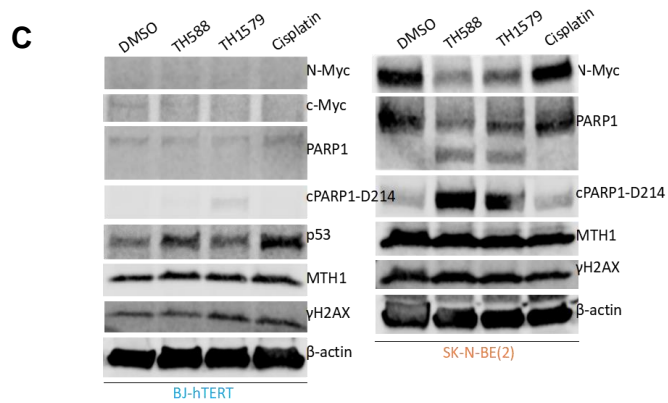
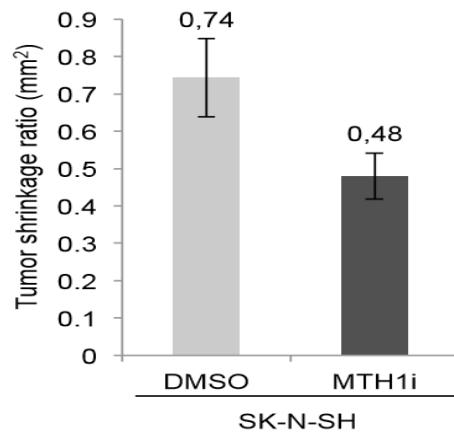


Figura 3: La inhibición de MTH1 con TH588 elimina células de neuroblastoma *in vivo*. 500 células de la línea SH-N-SH fueron inyectadas en embriones de pez cebra (n = 8-10) y al día siguiente expuestas a 10 μM MTH1 (TH588). Cuatro días más tarde el tamaño del tumor fue determinado.



IMPACTO ESPERADO DE LOS RESULTADOS

A pesar de los tratamientos multidisciplinarios usados en la actualidad contra el Neuroblastoma de alto riesgo, la supervivencia libre de eventos a 5 años no es superior al 30%. Estos tratamientos actuales incluyen, entre otros, ciclos de dosis intensivas con diversos agentes quimioterapéuticos, y radioterapia, los cuales provocan alta toxicidad en los pacientes que se agrava por la edad que tienen. Puesto que las células cancerosas son más sensibles a inhibidores de MTH1, es de esperar que un posible tratamiento basado en estos inhibidores afecte menos a las células normales y disminuyan los efectos secundarios en pacientes con respecto a los tratamientos quimio y radioterapéuticos actuales.

El proyecto es de gran interés para el sistema sanitario público por la repercusión que pueden tener nuestros resultados en los posibles tratamientos a los pacientes pediátricos afectados de Neuroblastoma. Además, abren una nueva ventana terapéutica para el desarrollo de nuevos tratamientos que mejoren sustancialmente la respuesta biológica frente a este tipo de tumores. La selectividad de los inhibidores de MTH1 nos permitiría incrementar los valores de muerte celular en NB sin afectar de manera significativa a los tejidos sanos.

En relación con esto, el profesor Thomas Helleday (Torsten and Ragnar Söderberg Professor in Translational Medicine, Strategic Professor in Chemical Biology, Department of Medical Chemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Solna, Sweden) con quien venimos colaborando desde hace algunos años, ha sido el primero en proponer a MTH1 como diana terapéutica contra el cáncer y en diseñar inhibidores con probada actividad *in vivo* (Gad et al Nature 2014). Prueba de ello es el ensayo clínico que se está llevando a cabo utilizando inhibidores de MTH1 (KARONUDIB, ensayo Mastiff, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03036228>).

Estimamos dos posibles argumentos que de resultar positivos se constituyen en factores que pueden ayudar a mejorar la gestión de recursos y los servicios sanitarios: a) Distinguir que genotipo de neuroblastoma puede tener una mejor respuesta a inhibidores de MTH1, b) Realizar una valoración comparativa entre los tratamientos clásicos y aquellos que utilizan inhibidores de MTH1 de tal forma que pueda elegirse aquel tratamiento óptimo en relación al genotipo del tumor.

De esta forma, tras la ejecución del proyecto, se espera que podamos responder a las siguientes cuestiones:

-¿Cuales son las células de NB que presentan una mayor toxicidad a inhibidores de MTH1? Lo cual puede ser especialmente útil para la clasificación de los tratamientos dependiendo del tipo de NB del paciente.

-¿Son los inhibidores de MTH1 una mejor opción que las terapias habituales contra el NB?

-¿Pueden combinarse los inhibidores de MTH1 con otros agentes para lograr incrementar la toxicidad en células de NB de forma específica sin afectar a tejidos sanos?

Desde nuestro punto de vista, existe un gran interés clínico y social en dar respuesta a estas preguntas, debido a la poca eficacia de los tratamientos para NB de alto riesgo, por ello resaltamos la importancia de nuestro proyecto.

Dicho esto, los resultados que se generarán son muy aptos de ser publicables. La difusión de los resultados se realizará mediante las vías normales: publicación en revistas científicas y asistencia a congresos nacionales e internacionales. Consideramos que los resultados esperados de la investigación son susceptibles de publicación en revistas de alto impacto como en las que venimos publicando recientemente (Nucleid Acids Research IF:10,2) ya que actualmente no existen estudios sobre el comportamiento de líneas de neuroblastoma primarias y células madre procedentes estos tumores frente a la exposición con inhibidores de MTH1.

Por otra parte, las combinaciones propuestas en el presente proyecto entre inhibidores de MTH1 junto con inhibidores de PARP, CDK4 o radiación en el caso de ser positivas podrían ser objeto de patente.

Dentro del área relacionada con cáncer y Neuroblastoma, cabe decir que el investigador principal es responsable de dos contratos de investigación (no competitivos, entre el instituto Karolinska y la Universidad de Sevilla). El primero trata sobre los mecanismos moleculares de reparación del ADN en respuesta a decitabine. El segundo sobre la caracterización de los mecanismos de reparación presentes en células madre de neuroblastoma en respuesta a inhibidores de MTH1. En este último caso, se han generado datos preliminares importantes para el desarrollo de la presente propuesta, algunos de los cuales los adjuntamos dentro del ANEXO. Además, el IP es responsable de un proyecto de investigación financiado por la Fundación Progreso y Salud (convocatoria competitiva) de la Junta de Andalucía cuya temática también sirve de base al proyecto que se presenta en esta convocatoria. El proyecto se titula "Eficacia biológica de nuevas modalidades radioterápicas en células madre tumorales de neuroblastoma. Modulación por inhibidores de reparación del ADN (PI-0073-2014).

Actualmente el IP se encuentra dirigiendo una tesis doctoral relacionada con la respuesta celular del neuroblastoma a radioterapia (doctorando Carlos Huertas Castaño). Estas aportaciones reflejan la experiencia del IP en temas como el daño y reparación del ADN en respuesta a radio y a quimioterapia.

Por todo ello consideramos que el proyecto que presentamos cuenta con unas más que razonables garantías de éxito.