

## MEMORIA CIENTÍFICA

### INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL PROYECTO

---

VIVIAN CAPILLA GONZALEZ

### TÍTULO DEL PROYECTO

---

Proyecto +VIDA: Desarrollo de estrategias para mejorar la calidad de vida en el cáncer infantil

## 1. RESUMEN

---

A pesar de ser una enfermedad rara, el cáncer infantil es la primera causa de muerte por enfermedad hasta los 14 años, siendo los tumores cerebrales el tipo de tumor sólido más común. Afortunadamente, la tasa de supervivencia de esta patología es elevada, pudiendo alcanzar el 80% en algunos casos. Sin embargo, esto ha puesto de manifiesto otro problema asociado al cáncer infantil y son las graves secuelas que los tratamientos del cáncer dejan en los niños que superan la enfermedad. En este contexto, la radioterapia puede jugar un papel importante en el tratamiento de los tumores cerebrales, pero a su vez puede causar deficiencias neurocognitivas que afectan la calidad de vida de los niños. Nuestro programa científico se centra en desarrollar un medicamento celular que permita minimizar las secuelas neurológicas de la radioterapia oncológica. Para ello, usamos modelos preclínicos de cáncer cerebral infantil que nos ayuden a evaluar la seguridad y eficacia de la administración de células madre (SCs) como estrategia neuroprotectora frente a la radiación. Para ello, obtendremos SCs de donantes. Las SCs se administrarán en un modelo murino de cáncer cerebral infantil combinado con radioterapia. Primero, evaluaremos la seguridad de la terapia celular mediante estudios de toxicidad (bienestar animal, bioquímica en plasma, tumorigénesis). Se realizarán resonancias magnéticas (MRI) para descartar la aparición de neoplasias secundarias debidas al trasplante. Segundo, la eficacia de la terapia celular se evaluará examinando la capacidad neurológica de los animales mediante una batería de pruebas de comportamiento (pruebas de aprendizaje y memoria, tareas motoras, pruebas de olfacción, etc). Después de concluir los estudios *in vivo*, los animales se sacrificarán para evaluar el papel neuroprotector y el mecanismo de acción de las SCs mediante análisis moleculares y celulares. Los resultados preclínicos generados proporcionarán la información necesaria para decidir si es razonable proceder con ensayos en humanos orientados a mejorar la calidad de vida de los niños con cáncer cerebral.

## 2. GRUPO DE INVESTIGACIÓN

---

### 2.1. MIEMBROS DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Nombre y apellidos	Titulación	Cargo
Vivian Capilla González	Doctora	Investigadora senior
Yolanda Aguilera García	Doctora	Técnico
Nuria Mellado-Damas	Licenciada	Técnico
Laura Olmedo Moreno	Licenciada	Investigadora joven

## 2.2 EXPERIENCIA DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN SOBRE EL TEMA DEL PROGRAMA PROPUESTO

### Investigador responsable

La Dra. Vivian Capilla-Gonzalez es Investigadora Senior y responsable del Grupo *Stem Cells and Translational Neurology* (SCTN) del Departamento de Regeneración y Terapia Celular en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) (<https://www.cabimer.es/web3/en/vivian-capilla-gonzalez/>). Pertenece al programa Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III, con vinculación a la Fundación Andaluza Progreso y Salud (FPS). La Dra. Capilla-Gonzalez tiene más de 15 años de experiencia en investigación con células madre, ha publicado más de 30 trabajos científicos y ha registrado dos patentes (EP17382607.4 y PCT/EP2018/074962).

Su programa científico propone investigar **TERAPIAS BASADAS EN CÉLULAS MADRE PARA MEJORAR LOS TRATAMIENTOS DEL CÁNCER**, con el objetivo final de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Esta línea de investigación fue iniciada por la Dra. Capilla-Gonzalez, durante su etapa posdoctoral en el Hospital Johns Hopkins (2012-2014), uno de los centros sanitarios más prestigiosos del mundo. Durante esa etapa, estudió el impacto de la radioterapia en el tejido cerebral no cancerígeno (Stem Cells 2012, Stem Cells 2014). Sus trabajos científicos proporcionaron una comprensión más completa de los efectos que la radioterapia presenta en las regiones del cerebro donde residen las células madre neurales. También demostró que la radiación debilita la capacidad regenerativa del cerebro, poniendo de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar estrategias neuroprotectoras. Por esta razón, tras su vuelta a España, la Dra. Capilla-González desarrolló una línea de investigación en CABIMER enfocada en el desarrollo de terapias avanzadas basadas en células para prevenir las secuelas neurológicas de los tratamientos contra el cáncer empleando modelos preclínicos. En esta línea de investigación se enmarca el **proyecto + VIDA**, cuyo objetivo es estudiar esta estrategia neuroprotectora en el cáncer infantil.

El programa científico de la Dra. Capilla-González recibe el apoyo del Instituto de Salud Carlos III, de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía y de la Asociación Española Contra el Cáncer, que proporcionan financiación continuada a través de convocatorias competitivas desde 2015. Además, el proyecto + VIDA fue presentado en 2019 en la plataforma 'Precipita' de la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT), a través de la cual se recaudaron fondos destinados a esta línea de investigación (<https://www.precipita.es/proyectos/Prevencion-de-las-Complicaciones-Neurológicas-del-Tratamiento-del-Cáncer-Infantil>). El proyecto recibió una extraordinaria aceptación social y contó con el apoyo de la 'Fundación Aladina', una de las entidades españolas que presta apoyo integral a los niños y adolescentes enfermos de cáncer. Recientemente, el proyecto +VIDA ha recibido también el apoyo de la **Asociación Pablo Ugarte**, uno de los principales pilares en nuestro país que financia proyectos de investigación sobre cáncer infantil.

### Equipo investigador

Los miembros que constituyen el equipo investigador del proyecto son profesionales altamente cualificados con experiencia contrastada en el campo de las células madre y la investigación translacional. A parte de la investigadora responsable, el equipo está formado por los siguientes miembros:

La Dra. **Yolanda Aguilera** es técnico en el grupo SCTN del Departamento de Regeneración y Terapia Celular de CABIMER, contratada por la FPS. Tiene más de 20 años de experiencia en biomedicina, empezando en el campo de las neurociencias y finalmente asentada en el campo de la terapia celular. Ha participado en 11 trabajos científicos, 12 proyectos, 2 convenios, 2 patentes y varios ensayos clínicos. Ha depositado 3 líneas celulares de células madre embrionarias. La Dra. Aguilera es responsable de los cultivos de líneas celulares humanas (células madre y células tumorales) y da apoyo a la experimentación con animales.

La Sra. **Nuria Mellado-Damas**, licenciada en Biología, es técnico en el grupo SCTN del Departamento de Regeneración y Terapia Celular de CABIMER, contratada por la FPS. Tiene más de 25 años de experiencia en biomedicina. Ha participado en diferentes proyectos centrados en la terapia celular para el tratamiento del cáncer, entre otras patologías. Es responsable de los cultivos de líneas celulares humanas (células madre y células tumorales) y da apoyo a la experimentación *in vitro*.

La Sra. **Laura Olmedo Moreno**, licenciada en Biología, realizó su Trabajo Fin de Máster y las prácticas de investigación en el grupo SCTN del Departamento de Regeneración y Terapia Celular de CABIMER, bajo la dirección de la Dra. Capilla-Gonzalez. Su investigación se enfoca en estudiar el uso de terapias celulares para mejorar los tratamientos del cáncer infantil. Gracias a la **Asociación Pablo Ugarte**, Laura ha iniciado su tesis doctoral bajo la dirección de la Dr. Vivian Capilla-González.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

---

#### 3.1. ANTECEDENTES DEL TEMA DE ESTUDIO Y RESULTADOS PREVIOS

El grupo de la Dra. Vivian Capilla-Gonzalez cuenta con una línea de investigación estable enfocada en **TERAPIAS BASADAS EN CÉLULAS MADRE PARA MEJORAR LOS TRATAMIENTOS DE CÁNCER**. El objetivo final de esta investigación es mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer (<https://www.cabimer.es/web3/en/vivian-capilla-gonzalez/>).

Los tumores cerebrales son el tumor sólido más común en niños y son la causa principal de muerte relacionada con el cáncer pediátrico, considerado enfermedad rara <sup>1</sup>. Debido a las mejoras en los tratamientos contra el cáncer, la tasa de supervivencia general para algunos tipos de tumores cerebrales ha aumentado hasta un 80%. Por esta razón, se está prestando más atención a los efectos secundarios de los tratamientos del cáncer. La radioterapia es uno de los tratamientos oncológicos más comunes. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con cáncer cerebral que reciben radiación sufren problemas neurológicos, incluido déficits en el aprendizaje, la memoria, el lenguaje, la atención, la función ejecutiva y la inteligencia <sup>2</sup>. Las secuelas de la radioterapia comprometen la calidad de vida de los supervivientes de cáncer. Cabe destacar que las secuelas neurocognitivas afectan especialmente a los pacientes pediátricos porque su cerebro en desarrollo es más sensible a la radiación. Por esta razón, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias para prevenir los efectos secundarios de la radioterapia y promover una vida sana libre de cáncer en los niños.

Los daños por radiación tiene una etiología multifactorial que incluye daño vascular <sup>3,4</sup>, desmielinización <sup>5,6</sup>, inflamación <sup>7</sup>, muerte neuronal y disminución de la neurogénesis <sup>8-10</sup>. Anteriormente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la radiación craneal elimina las células madre neurales y los neuroblastos, lo que reduce la capacidad regenerativa del cerebro <sup>8,10</sup>. Los procesos inflamatorios asociados a la radiación han sido propuestos como uno de los principales factores desencadenantes de las complicaciones neurológicas tras la radioterapia. Por ello, se emplean terapias antiinflamatorias para reducir los daños asociados a la radiación. Por ejemplo, la intervención farmacológica con PLX5622 bloqueó la microglia en el cerebro irradiado, mostrando efectos neuroprotectores y una mejora en la función cognitiva <sup>11</sup>. Del mismo modo, la inhibición del proceso inflamatorio con el fármaco indometacina previno la disminución de la neurogénesis después de la radiación craneal <sup>12</sup>. Sin embargo, las terapias antiinflamatorias no son efectivas para restaurar otros tipos de daños relacionados con la radiación que también contribuyen al deterioro neurológico. En este contexto, el uso de medicamentos de terapia avanzada se ha convertido en una alternativa prometedora para atenuar el daño cerebral ocasionado por la radioterapia. Piao et al. demostraron que las inyecciones intracraneales de progenitores de oligodendrocitos (OPC) eran capaces de remielinizar el cerebro irradiado y mejorar la disfunción cognitiva <sup>13</sup>. El grupo de Charles Limoli demostró que el trasplante de células madre neurales (NSC) promueve la generación de nuevas neuronas y la plasticidad neuronal en el hipocampo irradiado <sup>14,15</sup>. También se ha observado que el trasplante de microvesículas derivadas de las NSC reduce el número de células de microglia activadas, preserva la morfología neuronal y mejora la cognición en ratones irradiados <sup>16</sup>. Por lo

tanto, una estrategia que tenga múltiples efectos en el cerebro supondría un enfoque interesante para hacer frente a los efectos secundarios de la radioterapia. Se sabe que las células madre mesenquimales (MSCs) exhiben un efecto paracrino en el tejido dañado al secretar moléculas que ejercen múltiples efectos beneficiosos, incluidos los efectos antiapoptóticos, antiinflamatorios o sinaptogénicos<sup>17-20</sup>. Nuestro grupo ha demostrado que las MSCs presentan un efecto terapéutico sobre los daños cerebrales asociados a la radioterapia<sup>21</sup>. En un artículo reciente con ratones adultos, observamos que las MSCs trasplantadas migran mayoritariamente a los bulbos olfatorios y el córtex frontal del cerebro (Figura 1A-C anexa). Además, después de la radiación craneal, observamos que la administración de MSCs mejora la coordinación motora, la capacidad de discriminación de olores y la cognición, en comparación con los animales no trasplantados (Figura 1D-J anexa). El estudio molecular y celular de los cerebros reveló que las MSCs reducen la neuroinflamación, protegen del estrés oxidativo y previenen la pérdida de células neurales en los ratones irradiados, aunque no se detectaron efectos beneficiosos en la neurogénesis (Figura 1K-U anexa). A nivel mecanístico, desciframos vías moleculares involucradas en la neuroregeneración usando técnicas de transcriptómica y western blots, las cuales indicaron que la administración de MSCs reduce la activación crónica de la vía de señalización de CREB (de sus siglas en inglés “c-AMP responsive element binding protein”) en los cerebros irradiados [21]. Además, nuestro grupo ha demostrado que las MSCs trasplantadas no tienen un impacto negativo en la supervivencia de ratones adultos con glioma, contribuyendo a la controversia sobre si las MSCs pueden promover o bloquear el cáncer<sup>21,22</sup>. Estos resultados representan una estrategia para prevenir las secuelas de la radioterapia mediante una terapia celular no invasiva con gran potencial de ser aplicada con éxito en niños. Sin embargo, antes debemos evaluar su seguridad y eficacia en un modelo preclínico juvenil.

### 3.2. OBJETIVOS

**OBJETIVO 1.** Generar células madre o sus derivados para su uso en Terapia Celular con carácter traslacional.

**OBJETIVO 2.** Evaluar la seguridad de la Terapia Celular en modelos murinos de cáncer cerebral infantil que reciben tratamiento oncológico.

**OBJETIVO 3.** Evaluar la eficacia y el mecanismo de acción de la Terapia Celular para reducir las secuelas del tratamiento oncológico.

**OBJETIVO 4.** Valorar la traslación de las terapias estudiadas a ensayos clínicos futuros.

### 3.3. METODOLOGÍA

#### **OBJETIVO 1. Generar células madre o sus derivados para su uso en Terapia Celular con carácter traslacional.**

**a. Obtención y cultivo de células madre:** se emplearán muestras humanas de donantes sanos para obtener el medicamento celular (i.e., células madre). En todos los casos, las muestras se procesarán en CABIMER, donde se realizará el aislamiento y expansión de las células madre (SCs, de sus siglas en inglés Stem Cells). Brevemente, las muestras serán procesadas siguiendo protocolos estandarizados adaptados al tipo celular en cuestión. Generalmente, emplearemos medio de crecimiento compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies) suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina-estreptomina al 1% cm<sup>2</sup> y se incubarán a 37°C en una atmósfera humidificada con 20% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

**b. Controles de calidad:** el medicamento celular generado estará sujeto a controles de calidad siguiendo los protocolos típicos de la sala GMP (de sus siglas del inglés Good Manufacturing Procedures) para garantizar su seguridad, calidad y eficacia como medicamento final.

**b.1. Viabilidad:** la viabilidad celular se medirá mediante la prueba de exclusión de colorante Azul Trypan (Sigma Aldrich) de acuerdo al procedimiento estándar.

**b.2. Contaminación:** la ausencia de contaminación microbiana se verificará mediante la realización de una prueba de esterilidad (i.e. Thioglycollate Broth Penase para la detección de

organismos facultativos anaerobios y aerobios; Tryptic Soya Broth Penase para los organismos aerobio estricto y fungi). La prueba de detección de micoplasma se realizará con el kit comercial Venor GeM (Minerva Biolabs GmbH). Finalmente, se testará el contenido de endotoxinas mediante el ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (método D, Ph. Eur. 2.6.14).

**b.3.** Estabilidad genómica: realizaremos el cariotipo molecular por Affymetrix Human SNP Array 6.0 y CytoScan HD Array en la unidad de Genómica de CABIMER.

**b.4.** Caracterización y pureza: los productos celulares se caracterizarán empleando los marcadores específicos para cada caso (e.g. mediante kits de diferenciación comerciales o evaluando la expresión de marcadores establecidos mediante citometría de flujo) con el fin de determinar la pureza de nuestro medicamento celular <sup>23</sup>.

## **OBJETIVO 2. Evaluar la seguridad de la Terapia Celular en modelos murinos de cáncer cerebral infantil que reciben tratamiento oncológico.**

**a. Animales y grupos experimentales:** Para la experimentación de este proyecto emplearemos ratones inmunodeprimidos juveniles. Los animales se asignarán aleatoriamente a un grupo experimental específico, incluyendo los controles oportunos.

**b. Modelo de tumor cerebral y radiación:** Para generar el modelo de tumor cerebral, los ratones serán inyectados con  $5 \times 10^5$  células tumorales humanas en el cerebro (coordinada estereotáctica; A 0.5, L 2.0, D 3.5) como se describió anteriormente <sup>24</sup>. Después de la inyección de células tumorales, los animales recibirán radiación craneal (una dosis total de 10 Gy en 2 fracciones) <sup>21,25</sup>.

**c. Trasplante de SCs y biodistribución:** la administración de SCs se iniciará después de la radiación siguiendo el protocolo previamente empleado por nuestro grupo de investigación <sup>21</sup>. Para evaluar la biodistribución, empleamos colorantes fluorescentes para marcar tanto las células tumorales como las SCs (CellTracker Green CMFDA from Thermo Fisher, #C7025 and XenoLight DiR from Perkin Elmer #125964) y visualizamos la distribución in vivo con el equipo In Vivo Imaging System 200 Series (IVIS; Caliper Life Science) de CABIMER <sup>23</sup>.

**d. Estudio de toxicidad y tumorigenesis:** Una cohorte de ratones se empleará para examinar los efectos de toxicidad a corto y largo plazo de la administración de SCs, evaluando el bienestar del ratón de acuerdo con los criterios establecidos por el proyecto Welfare Quality® <sup>26</sup> y realizando análisis bioquímicos en plasma (equipo Integra 400 plus). También se realizarán estudios de resonancia magnética y espectroscopía para evaluar la formación de tumores secundarios (BioSpec 70/30 USR equipment).

**e. Estudio de supervivencia:** Otra cohorte de ratones se empleará para el estudio de supervivencia, la cual se evaluará mediante el método de Kaplan-Meier. Se realizarán necropsias para evaluar si existen efectos tumorigénicos de las SCs.

## **OBJETIVO 3. Evaluar la eficacia y el mecanismo de acción de la Terapia Celular para reducir las secuelas del tratamiento oncológico.**

**a. Test de comportamiento:** Los animales del estudio de toxicidad serán sometidos a una batería de pruebas de comportamiento para evaluar la coordinación motora (e.g. rotarod), la fuerza muscular (e.g. wirehang), la capacidad de discriminación de olores (e.g. prueba de habituación-deshabilitación) y la cognición (e.g. novel object recognition test).

**b. Análisis molecular y celular de los cerebros de los animales:** Después de las pruebas de comportamiento, se estudiará el estado inflamatorio del cerebro y otros indicadores de neuropatología. Para este propósito, emplearemos técnicas de transcriptómica que nos ayuden a dirigir nuestra investigación para encontrar expresiones diferenciales entre los grupos experimentales para proteínas clave que puedan conducir a la neuroprotección. También emplearemos técnicas de western blot, ELISA, histología o inmunofluorescencia.

#### **OBJETIVO 4. Valorar la traslación de las terapias estudiadas a ensayos clínicos futuros.**

a. Análisis de los resultados preclínicos: Después de concluir los estudios preclínicos, nuestro equipo de investigación analizará, junto con profesionales sanitarios (oncólogos y radioterapeutas), si nuestros resultados son favorables para plantear un ensayo clínico en niños con cáncer que sufren las secuelas neurológicas de los tratamientos oncológicos. De ser así, iniciaremos la tramitación de la documentación necesaria para conseguir las autorizaciones pertinentes para proponer un futuro ensayo clínico.

b. Elaboración de un protocolo de ensayo clínico: Elaboraremos un protocolo de ensayo clínico con toda la información necesaria (punto final, hipótesis, objetivos, diseño, descripción de las variables, tamaño muestral, criterios de inclusión y exclusión, aleatorización, intervención, medidas de eficacia y seguridad, y análisis estadístico) para obtener la autorización requerida. Solicitaremos y elaboraremos un medicamento de terapia avanzada para un ensayo clínico en Fase I para evaluar la seguridad y la viabilidad de la administración de SCs autólogas en niños con tumores cerebrales que experimenten cualquier daño neurológico asociado a la radioterapia. La documentación se presentará a los comités de Ética correspondientes para su consideración, asesoramiento y aprobación. Para obtener la autorización requerida, el protocolo del ensayo clínico cumplirá con la legislación española vigente en materia de ensayos clínicos (RD 223/2004), la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA; EU-regulation No 536/2014). También seguiremos las recomendaciones para los ensayos clínicos y la evaluación de productos bajo investigación en humanos, que aparecen en la Declaración de Helsinki, revisada en las sucesivas asambleas mundiales (WMA, 2008). Simultáneamente a la preparación del protocolo del ensayo clínico, solicitaremos la financiación necesaria para realizar el ensayo clínico a través de las convocatorias autonómicas y nacionales existentes.

### **3.4. PLAN DE TRABAJO**

Este proyecto se llevará a cabo en CABIMER, en colaboración con investigadores internos y externos, tanto nacionales como internacionales. Para garantizar el logro de los objetivos propuestos, se realizarán reuniones periódicas para coordinar el desarrollo de las actividades. El plan de trabajo propuesto recoge las siguientes tareas y actividades a desarrollar por los miembros del equipo (ver **Tabla 1**):

#### **Tarea 1. Producir el medicamento celular siguiendo los controles de calidad GMP (Objetivos 1) (meses 1-12).**

- Actividad 1 (meses 1-12). *Obtención de muestras humanas*. **I1** coordinará la obtención de muestras humanas procedentes de donantes (vía comercial o vía hospitalaria). En caso de ser necesario, **I4** se encargarán de recoger las muestras y trasladarlas a CABIMER donde, con el apoyo de **I2** e **I3**, las procesarán y criopreservarán hasta su uso para producir el medicamento celular.
- Actividad 2 (meses 1-12). *Generación de SCs*. **I2**, **I3** e **I4** procesarán las muestras humanas para aislar y amplificar las SCs.
- Actividad 3 (meses 1-12). *Controles de calidad GMP*. Previamente a la infusión, todos los medicamentos celulares generados pasarán por los controles de calidad, siguiendo las indicaciones de la unidad GMP de CABIMER. Esta actividad será llevada a cabo por **I1**, **I3**, **I4**.

#### **Tarea 2. Evaluar la seguridad del medicamento celular en estudios preclínicos (Objetivos 2) (meses 5-28).** Evaluaremos la seguridad del tratamiento en un modelo murino.

- Actividad 1 (meses 5-12). *Modelo de tumor cerebral y radiación*. **I1**, **I2** e **I4** generarán un modelo animal de cáncer cerebral infantil. Para ello, ratones juveniles serán inyectados estereotáxicamente con células tumorales en el cerebro. Transcurridas 24h, los animales recibirán radiación craneal (dosis total de 10 Gy).

- Actividad 2 (meses 5-12). *Trasplantar las SCs en ratón y evaluar la biodistribución.* **I1, I2 e I4** se encargarán de trasplantar las SCs en los ratones.
- Actividad 3 (meses 5-28). *Estudio de toxicidad y tumorigenesis.* **I1, I2 e I4** emplearán un grupo de animales para estudiar si la administración de SCs es segura realizando pruebas de toxicidad (bienestar del ratón, peso corporal, bioquímica plasmática, tumorigénesis y resonancia magnética).
- Actividad 4 (meses 5-28). *Estudio de supervivencia.* **I1, I2 e I4** conducirán un estudio de supervivencia para determinar si la intervención afecta la esperanza de vida de los animales.

**Tarea 3. Evaluar la eficacia y mecanismo de acción del medicamento celular en estudios preclínicos (Objetivo 3) (meses 9-28).** Evaluaremos si el tratamiento es eficaz para prevenir los daños asociados a la radiación.

- Actividad 1 (meses 9-28). *Test de comportamiento.* **I1, I2 e I4** emplearán una batería de tests para evaluar la coordinación motora, fuerza física, aprendizaje/memoria y discriminación de olores en los animales.
- Actividad 2 (meses 9-28). *Análisis molecular y celular.* **I2 e I4** se encargarán de obtener los distintos tejido y muestras de los animales. Posteriormente, **I3 e I4** procesarán el material para su estudio molecular (transcriptómica, western blot, ELISA) y celular (histología e inmunofluorescencia).

**Tarea 4. Escribir el Protocolo de ensayo clínico en base a los resultados preclínicos (Objetivo 4) (meses 25-36).** El objetivo final de este proyecto es escribir una propuesta de estudio clínico que nos permita trasladar los resultados preclínicos a la práctica clínica.

- Actividad 1 (meses 25-32). *Análisis de los resultados preclínicos.* **I1, I2, I3 e I4**, en colaboración con profesionales sanitarios, analizarán los resultados preclínicos para determinar si es factible proceder con un ensayo clínico.
- Actividad 2 (meses 29-36). *Elaboración de un protocolo de ensayo clínico.* **I1, I2, I3 e I4**, en colaboración con profesionales sanitarios y con la Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas, recogerán la información necesaria para redactar el protocolo de ensayo clínico (punto final, hipótesis, objetivos, diseño, descripción de las variables, tamaño muestral, criterios de inclusión y exclusión, aleatorización, intervención, medidas de eficacia y seguridad y análisis estadístico). El protocolo del ensayo clínico cumplirá con la legislación española vigente en materia de ensayos clínicos (RD 223/2004), la AEMPS y la EMA (EU-regulation No 536/2014). También seguirá las recomendaciones para los ensayos clínicos y la evaluación de productos bajo investigación en humanos, que aparecen en la Declaración de Helsinki, revisada en las sucesivas asambleas mundiales (WMA, 2008).
- Actividad 3 (meses 29-36). *Obtención de autorizaciones.* **I1, I2, I3 e I4**, en colaboración con profesionales sanitarios y con la Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas, presentarán la documentación requerida al Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica en Andalucía (CCEIBA) para su consideración, asesoramiento y aprobación.

Tabla 1. Cronograma

TAREA	Año 1			Año 2			Año 3		
	Meses 1-4	Meses 5-8	Meses 9-12	Meses 13-16	Meses 17-20	Meses 21-24	Meses 25-28	Meses 29-32	Meses 33-36
OBJETIVO 1	Obtención de muestras humanas	I1, I2, I3, I4	I1, I2, I3, I4						
	Generación de SCs	I2, I3, I4	I2, I3, I5	I2, I3, I6					
	Controles de calidad GMP	I1, I3, I5	I1, I3, I5	I1, I3, I5					
OBJETIVO 2	Modelo de tumor cerebral y radiación		I1, I2, I4	I1, I2, I4					
	Trasplante SCs y evaluación de biodistribución		I1, I2, I4	I1, I2, I4					
	Estudio de toxicidad y tumorigenesis		I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	
	Estudio de supervivencia		I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	
OBJETIVO 3	Test de comportamiento		I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	
	Análisis molecular y celular		I2, I3, I4	I2, I3, I4	I2, I3, I4	I2, I3, I4	I2, I3, I4	I2, I3, I4	
OBJETIVO 4	Análisis de los resultados preclínicos						I1, I2, I3, I4	I1, I2, I3, I4	
	Elaboración de un protocolo de ensayo clínico							I1, I2, I3, I4	I1, I2, I3, I4

I1: Vivian Capilla González; I2: Yolanda Aguilera; I3: Nuria Mellado-Damas; I4: Laura Olmedo Moreno

### 3.5. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN

El proyecto se llevará a cabo en España, en el cumplimiento de los principios éticos fundamentales establecidos en la Directiva 2010/63 / UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, la Declaración de Helsinki, la Directiva de la UE 2004/23 / CE) de la Ley española 14/2007, de 3 de Julio para la investigación biomédica, el español real Decreto 1716/2011, el real Decreto 1716/2011, la Ley 11/2007 de 26 de noviembre, y la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de protección de datos personales. Los modelos animales y protocolos serán evaluados por el Comité Ético de Experimentación Animal de CABIMER (CEEA-CABIMER) y por la Consejería De Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. El equipo de investigación cuenta con personal en posesión de la capacitación para la realización de la "Función d: Diseño de los proyectos y procedimientos" (antes Categoría C) que permite trabajar con animales de experimentación en España.

En caso de emplear muestras de pacientes se solicitará previamente el consentimiento informado empleando los formularios que la Consejería de Salud y Familias pone a disposición de los profesionales y de la ciudadanía en su catálogo de Formularios de Consentimiento Informado escrito, el cual pretende facilitar el proceso de información al paciente, la solicitud del consentimiento y el desarrollo de la práctica clínica.

En ningún caso, los ensayos propuestos que implican cuestiones éticas se ejecutarán antes de obtener las autorizaciones pertinentes que acreditan el cumplimiento de la legislación vigente en el ámbito de la UE y nacional.



## 4. MEDIOS Y RECURSOS DISPONIBLES PARA REALIZAR EL PLAN DE TRABAJO PROPUESTO

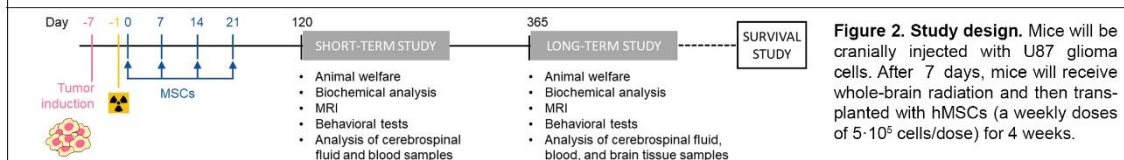
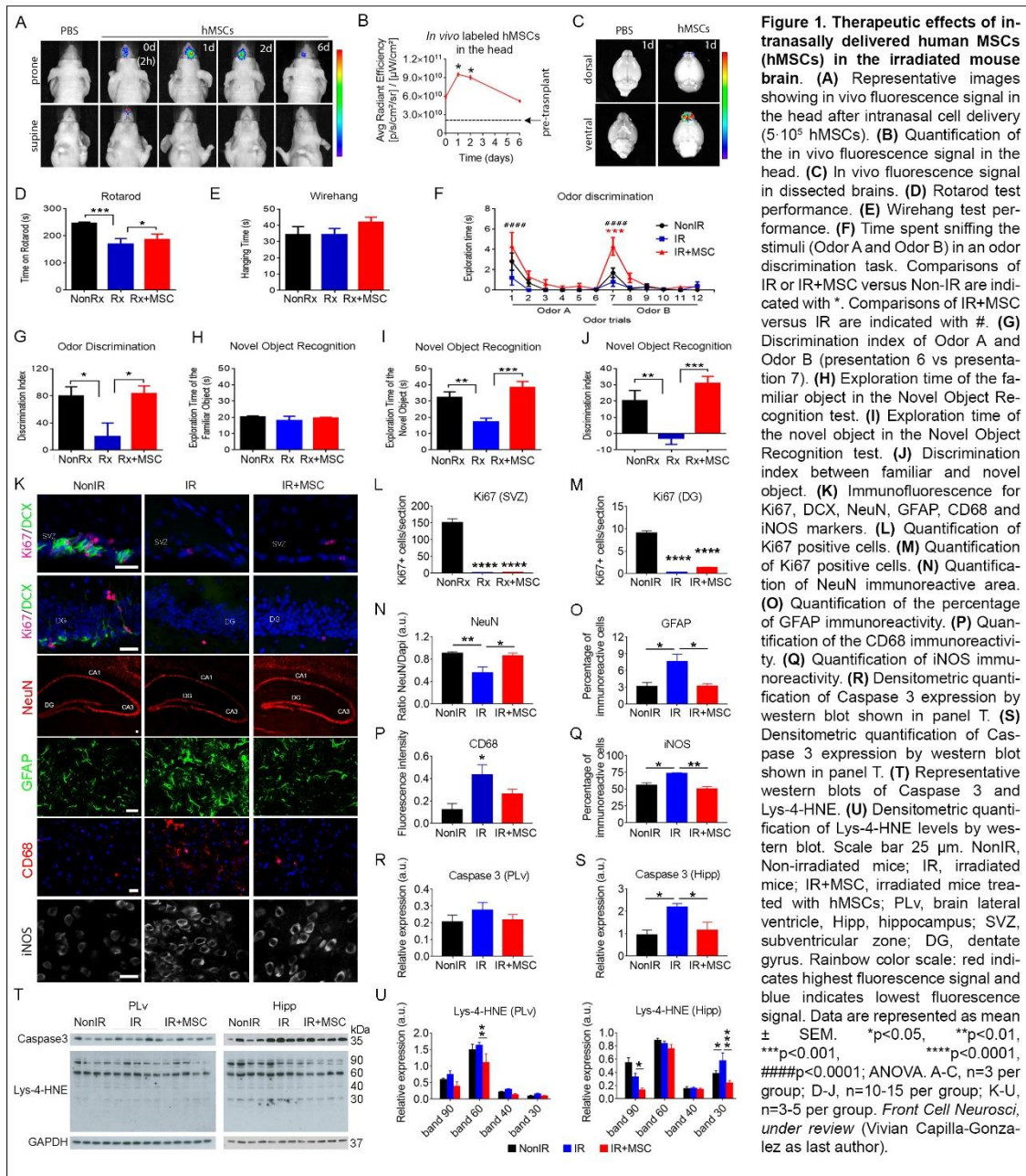
---

El CABIMER es un centro innovador de investigación biomédica multidisciplinar en Sevilla (<https://www.cabimer.es/web3/en/home/>). Este centro es un edificio de 9,000 m<sup>2</sup> que alberga a más de 200 investigadores profesionales. El edificio tiene 20 laboratorios divididos en 3 departamentos (Regeneración y Terapia Celular, Biología del Genoma y Señalización, y Dinámica Celular) que reciben el apoyo de 10 unidades internas, las cuales incluyen Recursos Biológicos, Cultivo Celulares, Sala GMP, Genómica, Histología y Microscopía entre otros (<http://www.cabimer.es/web3/unidades-apoyo/>). En particular, la Sala GMP es de gran interés para nuestro grupo, ya que brinda la posibilidad de producir medicamentos celulares de acuerdo con los estándares de calidad para ensayos clínicos (<http://www.cabimer.es/web3/unidades-apoyo/produccion-celular/>). La unidad GMP de CABIMER fue la primera en Andalucía en obtener la Certificación de la Agencia Española de Medicamentos y Dispositivos Médicos (AEMPS; 2009) para producir MSCs autólogas derivadas de tejido adiposo. Recientemente, esta unidad de GMP pasó la inspección de la AEMPS y obtuvo la acreditación para los próximos años (período 2018-2021). La Unidad GMP de CABIMER otorgará una gran ventaja a nuestro equipo de investigación en el momento de trasladar nuestros resultados a ensayos clínicos.

Los científicos de CABIMER concentran sus esfuerzos en transformar los resultados de su trabajo científico en mejoras directas para la salud y la calidad de vida de los ciudadanos. Son especialistas altamente cualificados en investigación básica y aplicada, comprometidos en promover la carrera de jóvenes investigadores para garantizar su consolidación en nuestro país. Además, los investigadores de este centro han demostrado un gran éxito en la obtención de fondos de convocatorias competitivas de agencias nacionales e internacionales, incluidos el Programa H2020 y ERC. Esto evidencia la relevancia de las investigaciones que tienen lugar en CABIMER.

Desde 2014, la Dra. Capilla-Gonzalez forma parte del departamento de Regeneración y Terapia Celular, cuyas actividades de investigación se centran estudiar nuevos tratamientos para resolver problemas de salud pública de alto impacto, incluidas las enfermedades neurológicas como los tumores cerebrales (<http://www.cabimer.es/web3/grupos-de-investigacion/>). Uno de los principales intereses del departamento es el desarrollo de productos basados en células madre para la medicina regenerativa, siendo pioneros en España en el uso de terapias celulares.

FIGURA ANEXA



## REFERENCIAS

- 1 Kotecha, R. S., Kees, U. R., Cole, C. H. & Gottardo, N. G. Rare childhood cancers--an increasing entity requiring the need for global consensus and collaboration. *Cancer medicine* **4**, 819-824, doi:10.1002/cam4.426 (2015).
- 2 Ali, F. S., Hussain, M. R., Gutierrez, C., Demireva, P., Ballester, L. Y., Zhu, J. J., Blanco, A. & Esquenazi, Y. Cognitive disability in adult patients with brain tumors. *Cancer treatment reviews* **65**, 33-40, doi:10.1016/j.ctrv.2018.02.007 (2018).
- 3 Li, Y. Q., Chen, P., Haimovitz-Friedman, A., Reilly, R. M. & Wong, C. S. Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer research* **63**, 5950-5956 (2003).
- 4 Brown, W. R., Thore, C. R., Moody, D. M., Robbins, M. E. & Wheeler, K. T. Vascular damage after fractionated whole-brain irradiation in rats. *Radiat Res* **164**, 662-668 (2005).
- 5 Panagiotakos, G., Alshamy, G., Chan, B., Abrams, R., Greenberg, E., Saxena, A., Bradbury, M., Edgar, M., Gutin, P. & Tabar, V. Long-term impact of radiation on the stem cell and oligodendrocyte precursors in the brain. *PLoS One* **2**, e588, doi:10.1371/journal.pone.0000588 (2007).
- 6 Gazdzinski, L. M., Cormier, K., Lu, F. G., Lerch, J. P., Wong, C. S. & Nieman, B. J. Radiation-induced alterations in mouse brain development characterized by magnetic resonance imaging. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **84**, e631-638, doi:10.1016/j.ijrobp.2012.06.053 (2012).
- 7 Hwang, S. Y., Jung, J. S., Kim, T. H., Lim, S. J., Oh, E. S., Kim, J. Y., Ji, K. A., Joe, E. H., Cho, K. H. & Han, I. O. Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation. *Neurobiol Dis* **21**, 457-467, doi:10.1016/j.nbd.2005.08.006 (2006).
- 8 Capilla-Gonzalez, V., Guerrero-Cazares, H., Bonsu, J. M., Gonzalez-Perez, O., Achanta, P., Wong, J., Garcia-Verdugo, J. M. & Quinones-Hinojosa, A. The subventricular zone is able to respond to a demyelinating lesion after localized radiation. *Stem Cells* **32**, 59-69, doi:10.1002/stem.1519 (2014).
- 9 Capilla-Gonzalez, V., Bonsu, J. M., Redmond, K. J., Garcia-Verdugo, J. M. & Quinones-Hinojosa, A. Implications of irradiating the subventricular zone stem cell niche. *Stem Cell Res* **16**, 387-396, doi:10.1016/j.scr.2016.02.031 (2016).
- 10 Achanta, P., Capilla-Gonzalez, V., Purger, D., Reyes, J., Sailor, K., Song, H., Garcia-Verdugo, J. M., Gonzalez-Perez, O., Ford, E. & Quinones-Hinojosa, A. Subventricular zone localized irradiation affects the generation of proliferating neural precursor cells and the migration of neuroblasts. *Stem Cells* **30**, 2548-2560, doi:10.1002/stem.1214 (2012).
- 11 Acharya, M. M., Green, K. N., Allen, B. D., Najafi, A. R., Syage, A., Minasyan, H., Le, M. T., Kawashita, T., Giedzinski, E., Parihar, V. K., West, B. L., Baulch, J. E. & Limoli, C. L. Elimination of microglia improves cognitive function following cranial irradiation. *Sci Rep* **6**, 31545, doi:10.1038/srep31545 (2016).
- 12 Monje, M. L., Toda, H. & Palmer, T. D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* **302**, 1760-1765, doi:10.1126/science.1088417 (2003).
- 13 Piao, J., Major, T., Auyeung, G., Policarpio, E., Menon, J., Droms, L., Gutin, P., Uryu, K., Tchieu, J., Soulet, D. & Tabar, V. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors remyelinate the brain and rescue behavioral deficits following radiation. *Cell Stem Cell* **16**, 198-210, doi:10.1016/j.stem.2015.01.004 (2015).
- 14 Acharya, M. M., Christie, L. A., Hazel, T. G., Johe, K. K. & Limoli, C. L. Transplantation of human fetal-derived neural stem cells improves cognitive function following cranial irradiation. *Cell Transplant* **23**, 1255-1266, doi:10.3727/096368913X670200 (2014).
- 15 Acharya, M. M., Rosi, S., Jopson, T. & Limoli, C. L. Human neural stem cell transplantation provides long-term restoration of neuronal plasticity in the irradiated hippocampus. *Cell Transplant* **24**, 691-702, doi:10.3727/096368914X684600 (2015).
- 16 Baulch, J. E., Acharya, M. M., Allen, B. D., Ru, N., Chmielewski, N. N., Martirosian, V. & Limoli, C. L. Cranial grafting of stem cell-derived microvesicles improves cognition and reduces neuropathology in the irradiated brain. *PNAS* **113**, 4836-4841 (2016).
- 17 Maltman, D. J., Hardy, S. A. & Przyborski, S. A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochemistry international* **59**, 347-356, doi:10.1016/j.neuint.2011.06.008 (2011).

- 18 Meirelles Lda, S., Fontes, A. M., Covas, D. T. & Caplan, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews* **20**, 419-427, doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.002 (2009).
- 19 Caplan, A. I. & Dennis, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* **98**, 1076-1084, doi:10.1002/jcb.20886 (2006).
- 20 Escacena, N., Quesada-Hernandez, E., Capilla-Gonzalez, V., Soria, B. & Hmadcha, A. Bottlenecks in the Efficient Use of Advanced Therapy Medicinal Products Based on Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int* **2015**, 895714, doi:10.1155/2015/895714 (2015).
- 21 Soria, B., Martin-Montalvo, A., Aguilera, Y., Mellado-Damas, N., Lopez-Beas, J., Herrera-Herrera, I., Lopez, E., Barcia, J. A., Alvarez-Dolado, M., Hmadcha, A. & Capilla-Gonzalez, V. Human Mesenchymal Stem Cells Prevent Neurological Complications of Radiotherapy. *Front Cell Neurosci* **13**, 204, doi:10.3389/fncel.2019.00204 (2019).
- 22 Hmadcha, A., Martin-Montalvo, A., Gauthier, B., Soria, B. & Capilla-Gonzalez, V. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (2020).
- 23 Capilla-Gonzalez, V., Lopez-Beas, J., Escacena, N., Aguilera, Y., de la Cuesta, A., Ruiz-Salmeron, R., Martin, F., Hmadcha, A. & Soria, B. PDGF Restores the Defective Phenotype of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Diabetic Patients. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **26**, 2696-2709, doi:10.1016/j.ymthe.2018.08.011 (2018).
- 24 Kondapalli, K. C., Llongueras, J. P., Capilla-Gonzalez, V., Prasad, H., Hack, A., Smith, C., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A. & Rao, R. A leak pathway for luminal protons in endosomes drives oncogenic signalling in glioblastoma. *Nature communications* **6**, 6289, doi:10.1038/ncomms7289 (2015).
- 25 Suárez-Pereira, I. & Carrión, Á. M. Updating stored memory requires adult hippocampal neurogenesis. *Scientific Reports* **5**, Scientific Reports (2015).
- 26 Spangenberg, E. M. & Keeling, L. J. Assessing the welfare of laboratory mice in their home environment using animal-based measures--a benchmarking tool. *Laboratory animals* **50**, 30-38, doi:10.1177/0023677215577298 (2016).