

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 pruebas de imagen 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*, se evaluará el papel neuroprotector y el mecanismo de acción de las SCs mediante análisis moleculares y celulares de los tejidos de los animales. Los resultados preclínicos generados proporcionarán la información necesaria para optimizar la terapia celular y poder aplicarla en un futuro con el fin de 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 (I1)	Doctora	Jefa de Grupo
Jesús María Sierra Párraga (I2)	Doctor	Investigador Postdoctoral
Laura Perez Alós (I3)	Doctora	Investigador Postdoctoral
Concepción Panadero Morón (I4)	Licenciada	Investigadora Predoctoral

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

La Dra. **Vivian Capilla-González** es Jefa del Grupo de [Células Madre y Neurología Traslacional](#) y Supervisora Científica de la [Unidad de Citometría](#) del CABIMER. La Dra. Capilla-González es Investigadora Ramón y Cajal con certificación R3. Tiene más de 15 años de experiencia contrastada en el campo de las Células Madre. Después de completar su doctorado en neurogénesis, realizó una estancia postdoctoral en la prestigiosa Universidad Johns Hopkins (USA), donde contribuyó a identificar las **secuelas neurológicas de la radioterapia**. En 2014, regresó a España y se incorporó al CABIMER, donde puedo iniciarse en el campo de las **Terapias Avanzadas**. Actualmente, lidera su propia línea de investigación centrada en el desarrollo de terapias basadas en células para enfermedades del sistema nervioso central, con especial interés en los **tumores cerebrales pediátricos**. Desde 2016, recibe financiación competitiva solapante de diferentes entidades, siendo investigadora principal de 10 proyectos (6 nacionales y 4 regionales) y 18 contratos/becas (3 internacional, 11 nacionales, 4 regionales). Además, tiene un acuerdo de colaboración con la Asociación Pablo Ugarte, la cual apoya su investigación sobre el cáncer infantil. Hasta la fecha, ha generado 43 publicaciones (índice h 22; 1474 citas) y ha registrado 6 patentes. La Dra. Vivian Capilla-González ha formado y supervisado a numerosos estudiantes de máster e investigadores, tanto predoctorales como posdoctorales, de todo el mundo. Algunos de ellos desarrollan actualmente su carrera en instituciones prestigiosas como el Instituto Max Planck y la Universidad de Carolina del Norte, mientras que otros se incorporaron a su grupo desde el extranjero, incluidos posdoctorales procedentes de la Universidad Erasmus de Róterdam y la Universidad de Copenhague, lo que refleja el impacto internacional de su investigación. Es profesora en programas de máster y miembro de la antigua Red TerCel (RD16/0011/0034), de CorEuStem (COST Action CA20140) y de ASEICA. Además, participa como evaluadora de proyectos para el Instituto de Salud Carlos III, la Agencia Estatal de Investigación, la Consejería de Salud (Junta de Andalucía) y la Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer (ASEICA), y actúa como editora y revisora en revistas científicas (p. ej., Molecular Therapy, Stem Cells Translational Medicine, Leukemia, Scientific Reports). También está activamente involucrada en actividades de divulgación, incluida la coordinación del evento anual CONÓCELAS, y ha sido reconocida en repetidas ocasiones con el Premio a la Promoción de las Vocaciones Científicas de la Fundación Merck Salud-ASEICA. Dra. Vivian Capilla-González coordinará y supervisará todas las actividades asociadas al proyecto.

El Dr. **Jesús M. Sierra-Párraga** es investigador postdoctoral especializado en el campo de la terapia celular en el grupo [Células Madre y Neurología Traslacional](#) y forma parte del programa **Sara Borrell** del Instituto de Salud Carlos III (2024-2027). Tiene un Grado en Biotecnología por la Universitat Politècnica de València y un Máster en Investigación Biomédica Traslacional por la Universidad de Córdoba. Durante su **programa de doble doctorado internacional** por la Universidad de Rotterdam, Países Bajos y la Universidad de Aarhus, Dinamarca (2016-2020), el Dr. Sierra-Párraga obtuvo experiencia dentro del consorcio internacional *Mesenchymal stem cells in normothermic ex-vivo PERfusion in Pigs: The MePEP Project*. Durante esta etapa, centró su investigación en el uso de **terapia celular** en el campo de la nefrología. Su trabajo comprendía el estudio y optimización de las **propiedades antiinflamatorias de las MSC** y su uso en la reparación del daño tisular en riñones disponibles para trasplante. Principalmente, su trabajo estaba enfocado en la determinación de los mecanismos moleculares de acción de las MSC con un enfoque traslacional, teniendo como objetivo la optimización de los procesos de obtención y preservación de MSC para la mejora de la efectividad de esta terapia. Tras doctorarse, consiguió financiación competitiva para continuar desarrollando su carrera investigadora (Margarita Salas 2021, Ayuda para la contratación de personal investigador doctor - PAIDI 2020, Sara Borrell 2023), lo que le ha permitido consolidarse en el campo de las MSC. Durante su carrera, ha descrito los mecanismos de acción de la MSC, incluyendo procesos de interacción con otros tipos celulares, y ha desarrollado protocolos de optimización para la **generación de productos celulares de terapia avanzada** para su uso preclínico. Desde su incorporación al CABIMER (2022), el Dr. Sierra-Párraga desarrolla una línea de investigación centrada en el estudio de estrategias de **radiosensibilización** de células de meduloblastoma mediante terapias

avanzadas, combinando así sus nuevos conocimientos con su experiencia previa en terapia celular. Para ello, emplea técnicas de vanguardia como la tecnología de las iPSC y los organoides. Su participación en 7 proyectos de investigación ha resultado en la publicación de 13 artículos en revistas científicas indexadas en el Journal Citation Report (Índice *h* 8) y su presentación en 25 ponencias y posters en conferencias de ámbito nacional e internacional, teniendo como resultado la obtención de varios premios y becas (Aarhus University Research Fellowship 2016, Premio Mentor-Mentee otorgado por “The Transplantation Society” 2018 y Novartis Transplantation Award 2019, entre otros). Su experiencia en terapia celular y radiación será clave en este proyecto.

La Dra. **Laura Pérez Alós** es beneficiaria de una ayuda MSCA y de un contrato posdoctoral Juan de la Cierva. Posee una sólida formación interdisciplinar en farmacia, inmunología e inflamación, con amplia experiencia en el descubrimiento de biomarcadores, el perfilado inmunológico y la investigación traslacional. Durante su carrera internacional en Copenhague, ha liderado proyectos centrados en la identificación de nuevos biomarcadores y en el papel del sistema del complemento en enfermedades inmunomediadas, incluyendo aportaciones relevantes en COVID-19 tras la pandemia. Sus contribuciones científicas incluyen 40 publicaciones (índice *h*: 14; 617 citas), la mayoría en revistas Q1 de alto impacto, con artículos relevantes publicados en Nature Communications como autor principal. Ha sido invitada como ponente en reuniones científicas, y su trabajo ha sido reconocido con el Laboratory Virology Award 2024 de la International Immunocompromised Host Society. Mantiene colaboraciones activas con instituciones de primer nivel como Stanford University, Karolinska Institutet y Yale University, así como con la industria farmacéutica. El proyecto a desarrollar en el grupo de [Células Madre y Neurología Traslacional](#) está asociado a entender el papel del complemento en la neuroinflamación inducida por la radioterapia. Su demostrada capacidad de liderazgo en la gestión de la investigación, la supervisión de estudiantes, y su experiencia en inflamación y modulación inmunitaria serán fundamentales para el desarrollo de la terapia basada en MSCs propuesta para abordar la neuroinflamación inducida por radiación.

Dña. **Concepción Panadero Morón** obtuvo su Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide (2020) y su Máster en Investigación Biomédica en la Universidad de Sevilla (2021). Se incorporó al grupo de [Células Madre y Neurología Traslacional](#) en 2020, durante su Máster en Investigación Biomédica, con un proyecto centrado en evaluar estrategias que mejoren el potencial terapéutico de las MSC en cáncer cerebral. En 2021 consiguió una beca competitiva de Formación en Investigación Jae Intro del CSIC que le permitió seguir desarrollando su carrera como investigadora en CABIMER, con el posterior apoyo de la Asociación Pablo Ugarte. En 2022, Concepción inició su doctorado bajo la supervisión de la Dr. Capilla-González con un proyecto centrado en entender cómo las MSC interactúan con las células de microglía y los astrocitos para modular la neuroinflamación en modelos de ratón y cultivos primarios. Actualmente, disfruta de un contrato FPU para realizar su investigación. Ha publicado 6 artículos científicos y ha participado en 3 proyectos de investigación competitivos y en 14 congresos nacionales e internacionales (p. ej. IBRO, SY-Stem, SED). Además, ha realizado 4 estancias nacionales e internacionales en otros centros de investigación, como la Università degli Studi di Trieste en Italia o el DZNE en Alemania. Su experiencia en la realización de experimentación in vitro, ex vivo e in vivo será fundamental para alcanzar los objetivos propuestos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

3.1. ANTECEDENTES DEL TEMA DE ESTUDIO Y RESULTADOS PREVIOS

El grupo de Células Madre y Neurología Traslacional que lidera 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 oncológicos, especialmente los niños (<https://www.cabimer.es/en/research-groups/stem-cells-and-translational-neurology/>).

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 ¹. 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 ². 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 ^{3,4}, desmielinización ^{5,6}, inflamación ⁷, muerte neuronal y disminución de la neurogénesis ⁸⁻¹⁰. 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 ^{8,10}. 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 ¹¹. Del mismo modo, la inhibición del proceso inflamatorio con el fármaco indometacina previno la disminución de la neurogénesis después de la radiación craneal ¹². 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 ¹³. 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 ^{14,15}. 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 ¹⁶. 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 ¹⁷⁻²⁰. Nuestro grupo ha demostrado que las MSCs presentan un efecto terapéutico sobre los daños cerebrales asociados a la radioterapia ²¹. 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 ^{21,22}. Más recientemente, demostraron que las MSCs también pueden ejercer acciones anti-tumorales en el Glioblastoma, mediante la remodelación intra y extracelular ²⁷. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las MSCs pueden ser una estrategia con gran potencial para prevenir las secuelas de la radioterapia mediante una terapia celular no invasiva en niños. Sin embargo, antes debemos evaluar su seguridad y eficacia en un modelo preclínico juvenil, así como conocer su mecanismo de acción.

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 y eficacia de la Terapia Celular para reducir las secuelas de la radioterapia en modelos preclínicos de cáncer infantil.

OBJETIVO 3. Evaluar el mecanismo de acción de la Terapia Celular.

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-estreptomicina al 1% cm² y se incubarán a 37°C en una atmósfera humidificada con 20% de O₂ y 5% de CO₂.

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 ²³.

b.5. Se estudiarán también estrategias que ayuden a potenciar el efecto terapéutico de las SCs en los modelos experimentales a estudiar.

OBJETIVO 2. Evaluar la seguridad y eficacia de la Terapia Celular para reducir las secuelas de la radioterapia en modelos preclínicos de cáncer infantil.

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 preclínico de cáncer infantil: Para generar el modelo de tumor cerebral, los ratones serán inyectados con 5×10^5 células tumorales humanas en el cerebro (coordenada estereotáctica; A 0.5, L 2.0, D 3.5) como se describió anteriormente ²⁴. Después de la inyección de células tumorales, los animales recibirán radiación craneal (una dosis total de 10 Gy en 2 fracciones) ^{21,25}.

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 ²¹. 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 ²³.

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® ²⁶ 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. 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).

f. Análisis neuropatológico: Después de las pruebas de comportamiento, parte de los cerebros se emplearán para estudiar el estado inflamatorio del cerebro y otros indicadores de neuropatología, empleando distintas técnicas, como western blot, ELISA, histología o inmunofluorescencia.

g. 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 el mecanismo de acción de la Terapia Celular.

a. Análisis molecular de los cerebros de los animales: Después de las pruebas de comportamiento, otra parte de los cerebros se emplearán para estudiar el perfil transcriptómico con el fin de conocer rutas y moléculas implicadas en las acciones terapéuticas de las SCs, tanto en la zona tumoral como no tumoral.

b. Mecanismos de interacción celular: Para estudiar los procesos de interacción celular tras la radiación, emplearemos modelos in vitro 2D y 3D con SCs, células neurales y células de tumor. Para ello, se emplearán técnicas de vanguardia en la investigación oncológica, que nos permitan evaluar la supervivencia celular, invasión, proliferación, fusión, diferenciación y la expresión de marcadores específicos de cada tipo celular.

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, **I2** e **I3** se encargarán de recoger las muestras y trasladarlas a CABIMER donde, 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 **I2, I3, I4**.

Tarea 2. Evaluar la seguridad y eficacia del medicamento celular en estudios preclínicos (Objetivos 2) (meses 5-28).

- 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 9-24). *Test de comportamiento*. **I2, I3 e I4** emplearán una batería de tests para evaluar la coordinación motora, fuerza física, aprendizaje/memoria y discriminación de olores en los animales.
- Actividad 5 (meses 21-32). *Análisis neuropatológico*. **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 (western blot, ELISA, histología e inmunofluorescencia).
- Actividad 6 (meses 5-24). *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 el mecanismo de acción del medicamento celular en estudios preclínicos (Objetivo 3) (meses 9-28).

- Actividad 1 (meses 21-36). *Análisis molecular in vivo*. **I2, I3 e I4** realizarán el estudio transcriptómico de las muestras.
- Actividad 2 (meses 1-36). *Mecanismos de interacción celular in vitro*. **I2 e I4** se encargarán de realizar los cultivos 2D y 3D y los distintos ensayos celulares.

Tarea 4. Escribir el Protocolo de ensayo clínico en base a los resultados preclínicos (Objetivo 4) (meses 25-36).

- Actividad 1 (meses 5-36). *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 Avanzada, 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). Además, en paralelo, presentaremos la

documentación requerida al Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica en Andalucía (CCEIBA) para su consideración, asesoramiento y aprobación.

Tabla 1. Cronograma

ACTIVIDAD		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,	I1, I2, I3,							
	Generación de SCs	I2, I3, I4,	I2, I3, I4,	I2, I3, I4,						
	Controles de calidad GMP	I2, I3, I4,	I2, I3, I4,	I2, I3, I4,						
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			
	Test de comportamiento			I2, I3, I4	I2, I3, I4	I2, I3, I4	I2, I3, I4			
	Análisis neuropatológico						I2, I3, I4	I2, I3, I4	I2, I3, I4	
	Estudio de supervivencia		I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4	I1, I2, I4			
OBJETIVO 3	Análisis molecular in vivo						I2, I3, I4	I2, I3, I4	I2, I3, I4	I2, I3, I4
	Mecanismos de interacción celular in vitro	I2, I4	I2, I4	I2, I4	I2, I4	I2, I4	I2, I4	I2, I4	I2, I4	I2, I4
OBJETIVO 4	Análisis de los resultados preclínicos		I1, I2, I3, I4,	I1, I2, I3, I4	I1, I2, I3, I4	I1, I2, I3, I4, I5	I1, I2, I3, I4	I1, I2, I3, I4	I1, I2, I3, I4	I1, I2, I3, I4
	Elaboración de un protocolo de ensayo clínico								I1, I2, I3, I4	I1, I2, I3, I4

Vivian Capilla González (I1); Jesús María Sierra Párraga (I2); Laura Pérez Alós (I3); Concepción Panadero Morón (I4).

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 m² que alberga a más de 200 investigadores profesionales. El edificio tiene 28 laboratorios divididos en 3 departamentos (Fisiopatología Integrativa y Terapias, 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/>).

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.

El grupo que lidera la Dra. Capilla-Gonzalez forma parte del departamento de Departamento de Fisiopatología integrativa y terapia (<https://www.cabimer.es/en/research-groups/stem-cells-and-translational-neurology/>). Las actividades de investigación del departamento se centran estudiar nuevos tratamientos para resolver problemas de salud pública de alto impacto, incluidas las enfermedades neurológicas como los tumores cerebrales. En este contexto, CABIMER es un centro pioneros en España en el desarrollo de productos basados en células madre para la medicina regenerativa.

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).
- 27 Olmedo-Moreno L, Panadero-Morón C, Sierra-Párraga JM, Bueno-Fernández R, Norton ES, Aguilera Y, Mellado-Damas N, García-Tárraga P, Morales-Gallel R, Antequera-Martínez M, Durán RV, Ferrer-Lozano J, Escames G, García-Verdugo JM, Martin-Montalvo A, Guerrero-Cázares H, Capilla-González V. Glioblastoma progression is hindered by melatonin-primed mesenchymal stromal cells through dynamic intracellular and extracellular reorganizations. *Theranostics*. 2025. 10;15(7):3076-3097. doi: 10.7150/thno.

FIGURA ANEXA

