

# TRABAJO FIN DE GRADO



# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Grado en Medicina

## **Estudio de la expresión de NG2/CSPG4 y CD19 en glioma infantil**

Autor/a: Elena Rodríguez Montero

Director/es:

Dr. Pascual Martínez Ortiz  
Dr. Salvador Martínez Pérez

Murcia, Mayo de 2025







# TRABAJO FIN DE GRADO



# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Grado en Medicina

## **Estudio de la expresión de NG2/CSPG4 y CD19 en glioma infantil**

Autor/a: Elena Rodríguez Montero

Director/es:

Dr. Pascual Martínez Ortiz  
Dr. Salvador Martínez Pérez

Murcia, Mayo de 2025





**UCAM**  
UNIVERSIDAD CATÓLICA  
SAN ANTONIO

## DEFENSA TRABAJO FIN DE GRADO

DATOS DEL ALUMNO	
Apellidos: Rodríguez Montero	Nombre: Elena
DNI: 49307963B	Grado: Medicina
Facultad de Ciencias de la Salud	
Título del trabajo: Estudio de la expresión de NG2/CSPG4 y CD19 en glioma infantil	

El Dr. Pascual Martínez Ortiz, Tutor del trabajo reseñado arriba, acredito su idoneidad y otorgo el V, B,<sup>o</sup> a su contenido para ir a Tribunal de Trabajo fin de Grado.

En Murcia, a 20 de Mayo de 2025.

Fdo.:



## AGRADECIMIENTOS

---

Me gustaría expresar mi más sentido agradecimiento a la Universidad Católica San Antonio de Murcia por brindarme la posibilidad de cumplir con esta vocación; a mis tutores, el Dr. Pascual Martínez Ortiz y el Dr. Salvador Martínez Pérez, por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo y guiarme; y a Francisca Almagro García por su inestimable ayuda a lo largo del proceso.

Especial reconocimiento merecen las familias que tomaron la decisión altruista de donar los cerebros, ya que con ese gran legado de sus hijos contribuyen de manera significativa al avance de la ciencia en beneficio de otros pacientes.

Por último, querría también agradecer a mis padres, inspiración y modelos a seguir de los que heredo la vocación; a mi hermana, compañera y apoyo incondicional; y a mi amiga María García López, luz y recordatorio constante de enfrentar los retos con alegría y pasión.

---

## ABREVIATURAS

---

- DIPG: glioma pontino intrínseco difuso.
- GDM: glioma difuso de línea media.
- GDI: glioma difuso infantil.
- GMB: glioblastoma multiforme.
- SNC: sistema nervioso central.
- TME: microambiente tumoral.



## ÍNDICE

---

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>9</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>11</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>15</b>
Palabras clave.....	15
<b>Abstract</b> .....	<b>17</b>
Key words .....	17
<b>Introducción</b> .....	<b>19</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>23</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>27</b>
Expresión de la subunidad alfa 2 del receptor de la IL13 (IL13R $\alpha$ 2).....	27
Expresión de NG2/CSPG4.....	27
Malformación vascular e interacción células tumorales-pericitos.....	27
Expresión de CD19 .....	28
<b>Discusión</b> .....	<b>29</b>
Expresión de la subunidad alfa 2 del receptor de la IL13 (IL13R $\alpha$ 2).....	29
Expresión de NG2/CSPG4.....	30
Malformación vascular e interacción células tumorales-pericitos.....	31
Expresión de CD19 .....	32
Ventajas y limitaciones.....	32
<b>Conclusiones</b> .....	<b>35</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>37</b>
Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital General Universitario de Elche. ....	38
Acuerdo de cesión de muestras biológicas humanas y/o datos clínicos asociados para investigación biomédica.....	40
<b>Bibliografía</b> .....	<b>47</b>
<b>Tablas, gráficos y figuras</b> .....	<b>51</b>



## RESUMEN

---

### **Introducción:**

Los tumores cerebrales y otros tipos de tumores del sistema nervioso central (SNC) son el tipo de tumor sólido más frecuente en la infancia. Dentro de estas neoplasias el glioma difuso infantil es un tumor altamente invasivo y letal con un pronóstico infausto. Actualmente, no existe un tratamiento capaz de aumentar la supervivencia, por lo que es necesario realizar estudios para conocer su comportamiento.

### **Material y métodos:**

El estudio se basa en el análisis celular y molecular del tumor en la zona de infiltración. Para el análisis inmunohistoquímico se emplearon un total de 92 muestras de glioma difuso infantil (GDI) obtenidas de 4 pacientes y procesadas para microscopía óptica con diaminobencidina y para inmunofluorescencia con marcadores fluorescentes a fin de analizar la expresión de IL13Ra2, NG2/CSPG4 y CD19.

### **Resultados:**

El análisis de muestras histológicas evidencia la expresión de IL13Ra2 en las células tumorales del GDI, así como de NG2/CSPG4 y CD19 en los pericitos condicionados por ellas. De igual modo, se corrobora la existencia de un contacto directo entre células tumorales y pericitos clave para la angiogénesis anormal así como para la generación de inmunotolerancia.

### **Conclusiones:**

Este trabajo muestra la relevancia de estudiar las interacciones celulares y moleculares en la zona de infiltración del glioma difuso infantil como puntos clave para comprender los mecanismos invasivos y el condicionamiento inmunológico que permiten la progresión tumoral.

### **PALABRAS CLAVES/DESCRIPTORES**

Glioma infantil, pericitos cerebrales, NG2/CSPG4, CD19, inmunotolerancia glioma



## ABSTRACT

---

### **Background:**

Brain tumors and other types of central nervous system (CNS) tumors are the most common type of solid tumors in childhood. Among these neoplasms, pediatric diffuse glioma is a highly invasive and lethal tumor with a poor prognosis. Currently, there is no treatment capable of increasing survival, making it necessary to conduct studies to better understand its behavior.

### **Material and methods:**

The study is based on the cellular and molecular analysis of the tumor in the infiltration zone. For the immunohistochemical analysis, a total of 92 infantile diffuse glioma (IDG) samples obtained from 4 patients were used and processed for light microscopy with diaminobenzidine, as well as for immunofluorescence using fluorescent markers to analyze the expression of IL13Ra2, NG2/CSPG4, and CD19.

### **Results:**

The analysis of histological samples reveals the expression of IL13Ra2 in tumor cells of infantile diffuse glioma (IDG), as well as the expression of NG2/CSPG4 and CD19 in pericytes influenced by them. Likewise, the existence of direct contact between tumor cells and pericytes is confirmed, which is key to abnormal angiogenesis and the development of immunotolerance.

### **Conclusion:**

This study highlights the importance of investigating the cellular and molecular interactions in the infiltration zone of infantile diffuse glioma as key factors in understanding the invasive mechanisms and immunological conditioning that enable tumor progression.

### **KEY WORDS**

Childhood glioma, brain pericytes, NG2/CSPG4, CD19, glioma immunotolerance



## 1. INTRODUCCIÓN

---

Los tumores cerebrales y otros tipos de tumores del sistema nervioso central (SNC) son el tipo de tumor sólido más frecuente en la infancia y la principal causa de muerte asociada al cáncer en pacientes entre los 0 y los 19 años (1).

Dentro de este tipo de neoplasias, el glioma pontino intrínseco difuso (DIPG) es un tipo de tumor cerebral derivado de las células de la glía, altamente invasivo y letal, que afecta predominantemente a niños y adolescentes (1,2). El DIPG ha sido recientemente renombrado por la Organización Mundial de la Salud (OMS-clasificación CNS5 de 2021) como el glioma difuso de línea media (GDM), que reconoce la importancia de la clasificación molecular en detrimento de la histológica (3,4). En la infancia un quinto de los tumores cerebrales infantiles y cuatro de cada cinco tumores de tronco encefálico pueden clasificarse como GDM, suponiendo hasta un 15% de la mortalidad infantil debida a tumores cerebrales (2). Nuestro trabajo se centrará en el glioma difuso infantil (GDI).

El GDI tiene distintas presentaciones clínicas en función de la localización del tumor, con síntomas que incluyen déficits neurológicos focales como disartria y disfagia, alteraciones del equilibrio (2), hipertensión intracraneal y signos piramidales (5).

Para su diagnóstico la Resonancia Magnética sigue siendo el gold estándar. En ella se observa una señal hipointensa o isointensa en T1 e hiperintensa en T2 sin realce de contraste (2,5). El diagnóstico definitivo se consigue con la toma de biopsias o la resección quirúrgica, lo que permite un estudio anatomopatológico, molecular e inmunohistoquímico (2).

En el examen histológico del GDI se describe una neoplasia maligna glial de celularidad muy aumentada, compuesta por células pobremente diferenciadas con atipias y múltiples mitosis. Característicamente se observan regiones necróticas rodeadas de vasos sanguíneos hiperplásicos e infiltración difusa del parénquima cerebral (6).

Con respecto a la fisiopatología, para aproximadamente el 80% de los GDI están descritas mutaciones en las histonas H3.3 y H3.1, siendo la más frecuente H3K27M. De igual modo, se han observado mutaciones en TP53, ATRX y PDGFRA, entre otras (1,2,4,6).

Aunque es necesaria mayor investigación en el origen de las neoplasias gliales, se ha propuesto que la expresión por parte de las células tumorales de la subunidad alfa 2 del receptor de IL13 (IL13R $\alpha$ 2) junto con la expresión en los pericitos (PC) de NG2/CSPG4 (antígeno presente en células precursoras de oligodendrocitos y pericitos) podría estar asociada a la patogénesis de los gliomas y posteriormente jugar un rol clave en la proliferación vascular de estos (7). Un posible mecanismo subyacente a la progresión tumoral es la cooptación vascular, fenómeno descrito en el Glioblastoma Multiforme (GBM). Este proceso se define como el uso por parte del tumor de las estructuras vasculares preexistentes para la migración tumoral (8,9). Así, las células tumorales invaden siguiendo los espacios perivasculares, interactuando con los PC, células que intervienen en la angiogénesis, en la barrera hematoencefálica y en la regulación inmunológica de SNC (8,10). Como resultado de esta interacción, los PC modifican la morfología de los vasos ya existentes e inducen la angiogénesis de nuevos vasos, facilitando el crecimiento tumoral (8,9). Si bien es cierto que estos procesos han sido descritos previamente con relación al GBM en adultos (8,9), actualmente se desconoce su participación en el GDI.

Además, el GDI tiene un microambiente tumoral (TME por sus siglas en inglés) inmunológico único caracterizado por un fenotipo inmunosupresor similar al descrito en GBM (2,11). Se desconoce si el angiotropismo e inmunorregulación descrito en el GBM está implicado también en la inmunotolerancia generada por el GDI, actuando mediante el condicionamiento de los PC tras la cooptación vascular.

Por otro lado, un estudio realizado por *Parker et al.* demostró que CD19 (un miembro específico de las células B perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (12)) se expresa de manera específica en los PC cerebrales

(13), lo que sugiere que podría ser una diana terapéutica atractiva para dirigirse a los PC del microambiente del GDI, como se ha propuesto para GBM (14).

En cuanto al tratamiento, la localización de la masa tumoral y su naturaleza infiltrativa suelen comprometer la cirugía (1,4), por lo que la práctica clínica habitual se basa en la radioterapia, si bien la supervivencia global apenas se ve afectada, situándose en torno a los 11 meses después del diagnóstico, con un 5% de supervivencia a los dos años (1,2). Por otro lado, la barrera hematoencefálica (BHE) compromete la efectividad de las distintas pautas quimioterápicas, que tampoco han demostrado aumentar la supervivencia global (4). De este modo, la alta tasa de mortalidad unida a la falta de opciones terapéuticas eficaces hace del GDI un desafío en el ámbito de la neurooncología pediátrica (2).

Como se ha planteado anteriormente, el análisis molecular de células tumorales y el estudio de alteraciones patogénicas en PC abre las puertas al uso de nuevos tratamientos dirigidos a células tumorales y al TME, tales como fármacos específicos contra la metilación y acetilación de histonas y la inmunoterapia con células CAR-T contra antígenos específicos de células tumorales/peritumorales y linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) (2). Por ello se considera que la determinación de la presencia específica de NG2/CSPG4 y CD19 en el tumor y/o el TME del GDI puede contribuir a arrojar luz en materia terapéutica.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Se plantea que mediante el estudio de la interacción entre las células tumorales del GDI y los PC del frente de infiltración se pueden identificar proteínas implicadas en la agresividad tumoral y revelar nuevas dianas terapéuticas.

Por lo tanto, como objetivos del presente estudio se establecen:

O1 - Estudiar la expresión de la subunidad alfa 2 del receptor de IL13 (marcador de células gliales malignas) en GDI.

O2 - Analizar la presencia de NG2/CSPG4 en el microambiente tumoral del GDI.

O3 - Describir histológicamente la malformación vascular característica del GDI y estudiar la presencia de una interacción física entre las células tumorales y los PC que explique la existencia de un nicho inmunosupresor como el propuesto en GBM.

O4 - Analizar la presencia de CD19 en el microambiente tumoral del GDI.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 3.1. Tipo de estudio

Este trabajo consiste en un análisis descriptivo histopatológico de regiones cerebrales de 4 casos diagnosticados de GDI, 3 obtenidas por necropsia y 1 mediante biopsia.

### 3.2. Muestras y técnicas utilizadas

Para la realización del estudio se analizaron las muestras de 4 pacientes diagnosticados de GDI, 3 obtenidas mediante necropsia y una muestra obtenida mediante biopsia. Las muestras fueron obtenidas del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB-Arrixaca) con la aprobación del comité Ético de Experimentación del Instituto de Neurociencias UMH-CSIC y cumplen con los requisitos de consentimiento informado, aleatorización de datos y adecuada calidad de la muestra.

Del primer paciente (GDI 18) se obtuvieron muestras del tálamo y mesencéfalo (tumor) e hipocampo (no tumor); del segundo (GDI 19) del puente y bulbo (tumor) y del hipocampo e hipotálamo (no tumor); y del tercero (GDI 76) del bulbo y protuberancia (tumor) y de hipocampo (no tumor). De cada una de estas muestras (n=9) se realizaron secciones de parafina de 7 micras de espesor, y se seleccionaron diez portas de cada muestra, siendo procesadas para Hematoxilina-Eosina (H&E) una de ellas y siete para inmunohistoquímica/inmunofluorescencia (IHQ/F), dos portaobjetos se guardaron como reserva, lo que supone 88 secciones procesadas de las necropsias. La muestra de biopsia fue obtenida por una consulta para determinar la expresión de IL3R $\alpha$ 2, recibiendo cuatro secciones histológicas (B1). Lo que hace un total de 92 secciones procesadas.

Se utilizaron IHQ/IF simple y doble para conocer la expresión de las proteínas de interés y para visualizar la relación entre las células del GDI y los PC, usando marcadores fluorescentes, en las que se efectuó un marcaje de los

PC con anticuerpos frente a NG2 (color rojo) y PDGR $\beta$  (verde), así como un marcaje de la célula tumoral con anticuerpos frente la subunidad alfa 2 del receptor de IL13 (IL13R $\alpha$ 2) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en fluorescencia verde. Todos los antígenos específicos de cada una de estas células, lo que permite analizar un posible contacto entre ellas.

Finalmente, se analizó la expresión CD19 con anticuerpo específico en IF.

### **3.3. Procesamiento de las muestras y visualización al microscopio**

#### Materiales

Además de los compuestos habituales, se emplearon PBS (tampón fosfato en solución salina isotónica pH 7, 0.1M), Tritón (detergente permeabilizador de membrana), Citrato sódico (solución desenmascaradora de antígenos), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (catalizador de la reacción de precipitado de DAB), BSA (albúmina sérica bovina), DAKO (diluyente de anticuerpos), Diaminobencidina (sustrato de la peroxidasa marcador de antígenos), DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol), Eukitt (para el montaje en microscopia convencional), Mowiol (para el montaje en microscopía de fluorescencia) y anticuerpos primarios y secundarios (Tabla 1).

#### Inmunohistoquímica convencional con luz visible

Tras realizar los cortes de las muestras incluidas en parafina, se deben calentar en estufa y rehidratar a temperatura ambiente con baños progresivos en Xilol y etanol. Se sigue con lavados con PBS y Tritón al 0.2% (PBS-T) y se procede a desenmascarar con tampón citrato sódico (pH 6.0, 0.01M), a fin de exponer los antígenos que hayan podido quedar ocultos con los procedimientos anteriores. Así, se hierven las muestras cuatro veces en tampón citrato sódico. Se continúa con tres lavados con PBS-T y se realiza el bloqueo de la peroxidasa endógena incubando la muestra con PBS-T y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% para evitar falsos positivos generados por esta enzima. Acto seguido se repiten los lavados con PBS-T y se realiza el bloqueo con BSA, buscando evitar la formación de uniones entre anticuerpos y antígenos inespecíficos. Finalmente, se diluyen los anticuerpos primarios comerciales en solución ABCAM y se dejan incubar sobre los portaobjetos durante dos noches, en oscuridad y a temperatura ambiente.

Transcurridos los dos días se reinicia con lavados de PBS-T en las muestras con anticuerpos anti-NG2 y anti-ILR3 $\alpha$ 2 y con PBS en aquellas con anticuerpos anti-CD19 y anti-PGDFR $\beta$ , para mantener la membrana libre del detergente Tritón en el segundo caso. Se continúa con la preparación e incubación del anticuerpo secundario conjugado con biotina diluido en PBS-T (anti-NG2 y anti-ILR3 $\alpha$ 2) y PBS (anti-CD19 y anti-PGDFR $\beta$ ). Pasada una hora, se repiten los lavados de PBS-T y PBS y se aplica el complejo ABC (avidina-biotina-peroxidasa), que se une al anticuerpo secundario de manera específica. Tras otra hora se repiten los lavados, primero con PBS-T y PBS y posteriormente con PBS y se procede al revelado con DAB (diaminobencidina). Para el revelado se introducen las preparaciones en un medio con PBS, 1% DAB y 0,002% de H2O2, donde la diaminobencidina reacciona con la enzima peroxidasa del complejo ABC, resultando un producto de color marrón. Finalmente, se detiene la reacción introduciendo los portaobjetos en PBS, se deshidratan las muestras y se montan en Eukitt.

### Inmunofluorescencia

El protocolo es inicialmente igual a la inmunohistoquímica visible. Sin embargo, tras la incubación del anticuerpo secundario, que está conjugado a un fluorocromo, las muestras deben mantenerse en oscuridad. Finalizada la incubación, se realizan lavados en PBT o PBS y seguidamente en PBS. Para finalizar se aplica el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), marcador fluorescente que se une a adenina y timina del ADN, permitiendo marcar el núcleo celular. Tras ello se vuelven a realizar lavados con PBS y se monta con Mowiol.

### Visualización y análisis al microscopio

Finalizado el protocolo, se procedió a la visualización de las muestras al microscopio, se analizó la calidad y especificidad del marcaje y se pasó a la obtención de las imágenes y su interpretación.



### 3. RESULTADOS

---

#### 3.1. Expresión de la subunidad alfa 2 del receptor de la IL13 (IL13R $\alpha$ 2)

En las regiones infiltradas por células tumorales se puede observar zona de avance tumoral por la gran celularidad del tumor con relación al tejido sano (Fig. 1 A, D; G). La expresión de IL13R $\alpha$ 2 en las células tumorales se ha detectado por IHQ revelada con DAB (Fig. 1 B, E, H), e inmunofluorescencia (IF; Fig. 1 C, F, I). Mientras que las secciones de las necropsias 1 y 5 de los casos GDI 18 y 19, respectivamente, muestran en intensa expresión de IL13R $\alpha$ 2, la necropsia 6 del caso GDI 78 muestra escasa expresión de esta proteína.

En muestras con doble IF (Fig. 1 I) se objetiva que las regiones perivasculares en el borde tumoral, en contacto con las células que expresan IL13R $\alpha$ 2 (verde) expresan NG2/CSPG4 (rojo), y que son compatibles con ser PC. Cabe plantear si esta IF verde se debe a la expresión de IL13R $\alpha$ 2 exclusiva de las células tumorales.

#### 3.2. Expresión de NG2/CSPG4

Agrupaciones de vasos, con apariencia sinuosa y glomeruloide, son detectables en la proximidad del borde de avance tumoral en contacto con células de GDI que expresan IL13R $\alpha$ 2 (Fig. 2 A, B, G-I, L, V, X). Los PC de estos vasos expresan NG2 (Fig. 2 C, D, J, K, P, R, S, Y2, Y3). Se puede apreciar también que las zonas de tejido sano no expresan IL13R $\alpha$ 2 ni se detecta la expresión de NG2 en sus zonas vasculares (Fig. 2 E, F, T, U, Z1, Z2).

#### 3.3. Malformación vascular, microambiente tumoral e interacción células tumorales-pericitos

Se ha estudiado la malformación vascular en la zona de interacción entre las células del GDI y el tejido sano, utilizando la expresión de NG2/CSPG4 como marcador de PC condicionados por el tumor. En las zonas de contacto e infiltración del GDI se puede apreciar la presencia de vasos sinuosos y abundantes, con aspecto glomeruloide, lo que sugiere la presencia de cooptación vascular por las células tumorales (Fig. 2C, D, I, K, L, R, S). Estos vasos contorneados con PC NG2/CSPG4 positivos, están mayoritariamente cooptados por células de GDI que expresan IL13R $\alpha$ 2 (Fig. 2 D, K, P, S, Y3).

La expresión de IL13R $\alpha$ 2 marca con claridad la masa tumoral y la presencia de células tumorales que infiltran de forma aislada y dispersa el parénquima cerebral vecino (Fig. 3 A). La expresión de NG2/CSPG4 por los PC permite observar la malformación y proliferación celular de los vasos cooptados en el GDI (Fig. 3 B, C). La expresión de NG2/CSPG4 en PC se demuestra por la co-localización de la expresión de NG2/CSPG4 y PDGR $\beta$  que es un marcador específico de PC (Fig. 3 B, insert). A grandes aumentos se aprecian los perfiles celulares de las células IL13R $\alpha$ 2 positivas con prolongaciones hacia los PC, alrededor de los vasos deformados (Fig. 3 E-G), que son más evidentes y claras cuando las células de GDI son marcadas con GFAP (Fig. 3 H), mostrando el sustrato celular de la cooptación vascular por el tumor. En algunos casos se pueden ver NG2/CSPG4 positivos migrando de forma libre desde la pared de los vasos malformados (Fig. 3 G)

### **3.4. Expresión de CD19**

Como se ha descrito anteriormente, los PC de los vasos tumorales presentan una intensa expresión de NG2/CSPG4 (Fig. 4 A). En la IF con anti-CD19 se detecta la presencia de inmunopositividad en la membrana de las células del glioma, de forma dispersa (Fig. 4 B), así como en la membrana de los PC (Fig. 4). La expresión en los PC es de menor intensidad que en las células tumorales. Esto demuestra que los PC en el GDI también expresan de forma selectiva CD19, y esta no está presente en regiones no infiltradas por el glioma (Fig. 4 D-F).

## 4. DISCUSIÓN

---

### 4.1. Expresión de la subunidad alfa 2 del receptor de la IL13 (IL13RA2)

El manejo actual del GDI supone un reto terapéutico, con un pronóstico infausto a pesar del tratamiento con radioterapia (1,2). Así, ante la escasa efectividad de los protocolos actuales la inmunoterapia emerge como una alternativa prometedora con distintos enfoques terapéuticos como son el uso de células CAR-T e inmunotoxinas recombinantes dirigidas contra antígenos específicos (15, 16, 17).

En este contexto, diversos estudios describen la sobreexpresión de la subunidad alfa 2 del receptor de IL13 (IL13R $\alpha$ 2) en gliomas de alto grado, incluyendo GBM y un elevado porcentaje de GDI. En estas células tumorales, la unión a IL13R $\alpha$ 2 evita la apoptosis y favorece la proliferación tumoral (15, 17).

Tal y como se expone en los resultados, este trabajo confirma histológicamente la expresión heterogénea de IL13R $\alpha$ 2 en las células del GDI mediante análisis inmunohistoquímicos de manera similar a lo descrito para el GBM (15). Se observa también que el tejido cerebral sano no expresa este antígeno, en congruencia con estudios anteriores (16).

Acerca de esta materia se han realizado estudios con inmunotoxinas quiméricas dirigidas frente a IL13R $\alpha$ 2 que demuestran un aumento de la supervivencia en gliomas de alto grado (15). Es por ello por lo que se puede considerar IL13R $\alpha$ 2 como un antígeno específico frente a estas neoplasias, constituyendo una diana terapéutica de gran relevancia en el tratamiento de GDI. De hecho, recientemente se ha publicado que la administración locorregional de células CART-T dirigidas contra IL13R $\alpha$ 2 en pacientes con gliomas recurrentes de alto grado se ha asociado a un incremento de la supervivencia de los pacientes tratados (18).

## 4.2. Expresión de NG2/CSPG4

Mediante el análisis IHQ/IF del presente estudio se demuestra la expresión de NG2/CSPG4 en los PC condicionados de los vasos cooptados en contacto con las células de GDI. Este hallazgo está en consonancia con los estudios que describen su expresión en gliomas de alto grado (7). Por el contrario, esta inmunorreactividad de NG2/CSPG4 no se aprecia en las zonas vasculares del tejido sano, hecho que plantea la posibilidad de que esta expresión sea específica de PC condicionados. Para confirmar si la expresión de NG2/CSPG4 es exclusiva de PC se ha realizado doble IF con PDGR $\beta$  y NG2/CSPG4, verificando que NG2/CSPG4 se expresa exclusivamente en células PDGR $\beta$  positivas.

Como se ha planteado anteriormente, NG2/CSPG4 es un proteoglicano de superficie implicado en la adhesión celular, la migración y la invasión tumoral cuya expresión en glioma de alto grado se asocia con la agresividad del tumor y un pronóstico desfavorable (7, 18). Aunque su estudio en GDI sigue siendo limitado, se plantea que su expresión pueda contribuir a la naturaleza infiltrativa de manera similar al GBM.

En la actualidad existen líneas de investigación en GBM que estudian terapias dirigidas contra NG2/CSPG4 con resultados prometedores, incluyendo inmunoterapia con anticuerpos monoclonales y células CAR-T (7). Entre ellos, un artículo publicado en 2014 registró la reducción tumoral de GBM tras el tratamiento con anticuerpos monoclonales en combinación con células natural killer mediante resonancia magnética (18).

Dado que los resultados parecen indicar que NG2/CSPG4 se expresa de manera similar específicamente en los PC condicionados de GBM y GDI, los estudios conducidos en GBM dirigidos contra este proteoglicano podrían ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas en GDI.

### **4.3. Malformación vascular, microambiente tumoral e interacción células tumorales-pericitos**

El microambiente tumoral del GDI continúa siendo un área poco estudiada, si bien se comienza a reconocer su implicación en la proliferación y el mantenimiento tumoral, con las consiguientes implicaciones pronósticas y terapéuticas (2,4,11). Al igual que el GBM, el GDI se considera una neoplasia inmunológicamente “fría”, con baja infiltración de linfocitos T, baja inflamación e inmunosupresión. Sin embargo, estudios recientes señalan que el GDI exhibe un microambiente único, con menor infiltración celular y menos actividad inmunosupresora que el GBM (11).

En lo que respecta a la patogenia de este ambiente de inmunotolerancia, diversos artículos describen que el contacto directo entre las células tumorales del GBM y los PC induce un cambio de fenotipo en estos últimos que sería crucial para evadir la respuesta inmune y permitir la progresión tumoral (8,9). En el presente estudio se ha objetivado la presencia de prolongaciones de las células del GDI dirigidas hacia los PC perivasculares, lo que demuestra que el contacto entre estas células puede ser el sustrato de la cooptación vascular. Esta interacción física se ha demostrado en GBM mediante prolongaciones de la célula tumoral nombradas flectopodia por *Caspani et al.* (19), y provoca un cambio del secretoma de los PC con aumento de la secreción de citoquinas antiinflamatorias y reducción de las proinflamatorias. Además, aumenta la expresión de PDL1 y disminuye la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, impidiendo la acción de los linfocitos T (8).

Los resultados del análisis IHQ/IF realizado en este trabajo objetivan un contacto directo entre las células tumorales del GDI y los PC en la zona de infiltración, que a pesar de las diferencias entre el microambiente tumoral del GDI y el GBM, permite plantear que en el GDI este contacto es esencial para generar el TME protumoral, como ya ha sido demostrado en GBM (8,9).

El mecanismo que subyace a la transformación funcional de los PC contactados en el caso del GBM es una activación de la autofagia mediada por

chaperonas (20). En consecuencia, sería interesante estudiar si este mecanismo se reproduce también en el GDI.

Por otro lado, los resultados demuestran la existencia de abundante vascularización con morfología glomeruloide en la zona de infiltración del GDI, similar a la descrita en GBM. En la actualidad se considera que la vascularización anómala estudiada en el GBM es resultado de la cooptación vascular, mediante la cual las células tumorales emplean la vascularización preexistente para obtener irrigación, dando lugar a vasos de aspecto glomeruloide (8-10).

Por ello, impedir la interacción células tumorales-PC y/o imposibilitar el condicionamiento de los PC a fin de exponer al GDI al sistema inmune activo puede suponer un objetivo terapéutico prometedor.

#### **4.4. Expresión de CD19**

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo publicado hasta el momento en relación con la expresión de CD19 en el SNC y en el TME, verificando su expresión de forma selectiva en PC condicionados. Si bien son escasos los estudios al respecto en GDI, un estudio realizado por *Kong et al.* propuso que el empleo de terapias con CART-células NK (natural killer) dirigidas contra CD19 podrían resultar seguras y eficaces en el tratamiento de GBM (14), una neoplasia con escasa respuesta a las terapias convencionales.

Por ello, y conociendo el rol de los PC condicionados en la angiogénesis y el crecimiento tumoral (8,9) se plantea que CD19 puede ser una diana terapéutica prometedora para futuras estrategias de tratamiento en GDI, al igual que en GBM (14).

#### **4.5. Ventajas y limitaciones del estudio**

Entre las ventajas del presente trabajo se encuentra aportar nuevos datos sobre el comportamiento del GDI, una neoplasia escasamente estudiada hasta el momento. Las abundantes publicaciones sobre nuevos datos celulares y moleculares en el GBM pueden ayudar a abordar el estudio del GDI de forma

más profunda, para conocer mejor su fisiopatología y desarrollar tratamientos específicos eficaces.

Como principal limitación se presenta el reducido tamaño muestral. La baja disponibilidad de tejido para estudio responde tanto a la baja incidencia del tumor como a la escasez de biopsias y necropsias.



## 5. CONCLUSIÓN

---

En este proyecto de investigación queda patente la relevancia de examinar el comportamiento de las células tumorales y su interacción con los pericitos, así como de estudiar el microambiente tumoral en el frente de infiltración tumoral en busca de nuevas dianas terapéuticas. En el caso del GBM y posiblemente también en el GDI, las células del microambiente tumoral ayudan al tumor a escapar de la respuesta inmune y a crecer infiltrado el tejido sano.

Además, en relación con los objetivos planteados se ha constatado que:

1. Las células tumorales del GDI expresan la subunidad alfa 2 del receptor de IL13
2. Los pericitos condicionados por las células tumorales de GDI, presentes en la vascularización de la zona de infiltración, expresan NG2/CSPG4.
3. Existe un contacto directo entre las células tumorales del GDI y los pericitos que condiciona una malformación vascular característica y un microambiente tumoral en sentido protumoral.
4. CD19 se expresa tanto en las células tumorales del GDI como en los pericitos condicionados por estas.

Mientras que la heterogeneidad molecular de las células tumorales hace complejo el encontrar antígenos que específicamente se expresen en todas ellas, el identificar dianas terapéuticas en células protumorales del microambiente tumoral puede significar dianas terapéuticas estables y homogéneas. Diseñar inmunoterapia contra ellas puede permitir acabar con el tumor. En nuestro estudio NG2/CSPG4 y DC19 en los los pericitos condicionados por el GB podría ser una diana para combatir el GDI.



## 6. ANEXOS

---

### **ANEXO 2: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA**

Las muestras experimentales usadas en el trabajo experimental desarrollado por Elena Rodríguez Montero para el desarrollo de su TFG titulado: Estudio de la expresión de NG2/CSPG 4 y CD19 en glioma infantil, han sido obtenidas del Banco de Cerebros del IMIB-Arrixaca, dentro de la Red Española de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III. Los procedimientos experimentales han sido evaluados y aprobados por el Comité de Experimentación Clínica del Hospital General de Elche, en el contexto del análisis molecular de tumores gliales malignos del SNC.

Se adjunta PDF de este informe así como el MTA del IMIB firmado por el director del TFG.

## INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Dña. Leticia Soriano Irigaray, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital General Universitario de Elche.

### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta referida al proyecto de investigación titulado **“Análisis del potencial de crecimiento tumoral del glioblastoma IDH Wild-Type mediada por la acción inmunosupresora en pericitos peritumorales. Estudio de cohortes retrospectivo en los diagnósticos realizados desde 2015 hasta 2022 en el Hospital General Universitario de Elche”** con código de registro PI 95/2022, cuyo investigador principal es el **Dr. Jesús Jaramillo Merchán**, MIR Anatomía Patológica en el Hospital General Universitario de Elche.

Que en este estudio:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado (si aplica).
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.

Los miembros del CEIm, en su reunión del **26 de octubre de 2022 (acta 12/2022)**, tras la lectura y evaluación del proyecto de investigación, acuerdan emitir **Informe Favorable** a la realización del mismo.

*\*Se aprueba la exención del consentimiento informado.*

Lo que firmo en Elche a 02 de noviembre de 2022

Firmat per Leticia Soriano Irigaray el  
02/11/2022 12:37:03



Fdo.: Dña. Leticia Soriano Irigaray  
Secretaría CEIm HGU de Elche

CEIm Hospital General Universitario de Elche  
Camino de la Almazara, nº 11 · 03203 ELCHE · Tel. 966 61 61 74  
[Ceim\\_elx@gva.es](mailto:Ceim_elx@gva.es)

**Composición actual del CEIm del Hospital General Universitario de Elche:**

**Presidente**

Dr. Andrés Navarro Ruiz – S. Farmacia

**Vicepresidenta**

Dra. María del Mar Masiá Canuto- S. Medicina Interna (UEI)

**Jefatura técnica**

Dña. Leticia Soriano Irigaray – S. Farmacia

**Vocales**

**Facultativos Especialistas**

Dr. Félix Gutiérrez Rodero- S. Medicina Interna (UEI)

Dr. Álvaro Rodríguez Lescure – S. Oncología médica

Dra. Rosa Martín Gomis – S. Farmacia

Dra. Vázquez Gomis- S. Pediatría

D<sup>a</sup>. Eva de Miguel Balsa – S. Medicina Intensiva

**Farmacología**

Dr. Pedro Zapater Hernández

**Enfermería**

Dña. Carmen Rufete Cabrera

**Bioestadística**

D. José Vicente Segura Heras - Profesor titular Bioestadística

**Miembros independientes del Centro**

D. Alberto Martín Hidalgo - Miembro independiente del Centro

D. Fernando Vargas Torcal - Miembro independiente del Centro

**Miembro Lego**

D<sup>a</sup>. Manuela Angeles Peral Guilabert - Miembro ajeno a la profesión sanitaria y al Centro

**Ldo. Derecho**

D. Francisco Reyes Sansano Medina - Licenciado en Derecho

En el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación, ni en el dictamen de la solicitud de autorización del mismo. Para que conste donde proceda.

**ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS Y/O DATOS CLÍNICOS ASOCIADOS PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS Y/O DATOS CLÍNICOS ASOCIADOS PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

De una parte,

D<sup>a</sup>. María Fuensanta Martínez Lozano , con DNI 34796656W, representante legal de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia (FFIS), con domicilio en Pabellón docente del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca C/ Campo, 12, 30120, El Palmar, Murcia, que actúa como órgano gestor del Instituto Murciano de Investigación Sanitaria Pascual Parrilla (IMIB), organismo que cuenta entre sus Plataformas con el Biobanco en Red de la Región de Murcia (en adelante BIOBANCO IMIB), con número B.0000859 en el Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III, actuando en nombre y representación del citado instituto, con domicilio, a estos efectos, con sede en el Campus de Ciencias de la Salud edificio LAIB, y Don Luis Vicente García-Marcos Álvarez, como Director Científico del citado BIOBANCO, con domicilio en Edificio Laib, laboratorio 0.25, Ctra. Buenavista, s/n, 30120, El Palmar, Murcia, y DNI 21404891X.

De otra parte,

Don/Dña. (nombre del representante legal de la institución del receptor), en nombre y representación de (nombre de la institución) con domicilio en (domicilio completo de la institución receptora) y NIF (número de NIF), en virtud de las atribuciones y facultades que tiene conferidas y otorgadas, y

El investigador Salvador Martínez Pérez (en adelante RECEPTOR), afiliado a Universidad Miguel Hernández de Elche (en adelante UMH), con DNI 05152037Z

**EXPONEN**

- I. Que el BIOBANCO es una entidad pública
- II. Que el BIOBANCO conforme a lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su desarrollo, es un establecimiento público, sin ánimo de lucro, que acoge muestras biológicas humanas con fines de investigación biomédica.
- III. Que el BIOBANCO es miembro de la Plataforma ISCIII Biobancos y Biomodelos y dicha Plataforma constituye un marco cooperativo armónico en beneficio de la Comunidad Científica, promoviendo el incremento de la producción científica de excelencia en Biomedicina, garantizando los derechos de los pacientes y donantes en materia de donación, gestión y cesión de muestras biológicas e información asociada, en el marco de los estándares éticos y legales vigentes.
- IV. Que el RECEPTOR es una entidad pública/ privada (tachar lo que no proceda) (añadir algún atributo o descripción de la actividad de la entidad)

---

## ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS Y/O DATOS CLÍNICOS ASOCIADOS PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

---

- V. Que el RECEPTOR ha solicitado las muestras y/o datos asociados (MATERIAL) al BIOBANCO que constan en el formulario de solicitud de muestras y datos (ANEXO I) e incluidos en la solicitud con código IMIB/2024/10, para la realización del proyecto de investigación UNA POSIBLE DIANA TERAPEUTICA PARA BLOQUEAR LA PROGRESION DEL GLIOMAS: LA AUTOFAVIA MEDIADA POR CHAPERONAS EN PERICIOS (en adelante PROYECTO), descrito en el ANEXO II, disponiendo de la experiencia y los recursos necesarios para poder llevar a cabo dicho PROYECTO.
- VI. Que el BIOBANCO tiene capacidad de suministrar el MATERIAL requerido para el PROYECTO, y que este acuerdo se formaliza para que el BIOBANCO le ceda al RECEPTOR el MATERIAL, habiéndose evaluado favorablemente dicha cesión por los comités ético y científico a los que está adscrito el BIOBANCO, y cuenta con el informe favorable del Director Científico del Biobanco.
- VII. De acuerdo con lo anterior, y según lo dispuesto en la normativa vigente, las partes convienen la firma del presente acuerdo, de conformidad según las siguientes cláusulas.

### CLAÚSULAS

#### PRIMERA. OBJETO

El objeto del presente acuerdo es establecer las condiciones para la cesión del MATERIAL, por el BIOBANCO al RECEPTOR, para la ejecución del PROYECTO presentado.

Son parte integral de este Acuerdo el ANEXO I, con la Solicitud de las muestras; el ANEXO II, PROYECTO para el que se han solicitado las muestras; el ANEXO III (Registro de Transacción de Muestras), relativo al MATERIAL que se proporcionarán al RECEPTOR; y el ANEXO IV, con el presupuesto detallado de los servicios a realizar por el BIOBANCO. Este acuerdo suscribe la solicitud realizada a través de la página web del Biobanco IMIB con código IMIB/2024/10, solicitada por el RECEPTOR, con un coste asociado de 101,16 € (tarifa B).

#### SEGUNDA. OBLIGACIONES DEL BIOBANCO

El BIOBANCO se compromete a las siguientes obligaciones:

- I. Que la obtención y suministro del MATERIAL cumple con todas las garantías de protección, seguridad y confidencialidad establecidas en la normativa aplicable (REGLAMENTO UE 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016, normativa española sobre protección de datos de carácter personal vigente, LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y LEY 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, así como sus desarrollos normativos).
- II. Suministrar el MATERIAL de forma dissociada de los datos identificativos del donante (seudonimizada o anonimizada, según estos términos se definen en la legislación de protección de datos vigente, según lo indicado en el ANEXO III, protegiendo la identidad del donante, y cumpliendo los requisitos legales vigentes para dicha cesión.

## ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS Y/O DATOS CLÍNICOS ASOCIADOS PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

- III. Suministrar el MATERIAL al RECEPTOR en condiciones óptimas de utilización experimental, de acuerdo con los estándares de calidad del BIOBANCO, no pudiéndose garantizar la idoneidad del mismo para un propósito particular o con ninguna otra garantía, implícita o explícita.
- IV. Suministrar el MATERIAL de forma gratuita, pudiendo tan sólo repercutir en la cesión los gastos de obtención, mantenimiento, manipulación, envío y otros gastos de similar naturaleza relacionados con el MATERIAL, detallados en el presupuesto aceptado por el RECEPTOR e incluido en el ANEXO IV.
- V. Una vez transferido el material, El BIOBANCO no tendrá ningún tipo de responsabilidad derivada del uso que el RECEPTOR haga del MATERIAL suministrado, transfiriéndose también todas las obligaciones y responsabilidades descritas en el presente acuerdo, no pudiéndose reclamar responsabilidades al Biobanco del mal uso del material y datos clínicos cedidos.
- VI. Poner el MATERIAL a disposición del RECEPTOR para su recogida en la fecha acordada previamente entre las Partes.

### TERCERA. OBLIGACIONES DEL RECEPTOR

El RECEPTOR se compromete a las siguientes obligaciones:

- I. Utilizar el MATERIAL suministrado exclusivamente para la ejecución del PROYECTO presentado y previamente evaluado y aprobado por su Comité de Ético correspondiente. En el caso de que se produzca un cambio sustancial en el desarrollo del PROYECTO que afecte al uso del MATERIAL el RECEPTOR deberá comunicarlo al Biobanco con carácter previo y por escrito, y éste decidirá de forma expresa sobre la autorización de nuevo uso del MATERIAL.
- II. Custodiar y garantizar la trazabilidad del MATERIAL.
- III. No ceder el MATERIAL a terceros, investigadores y/o instituciones, no contemplados en el PROYECTO inicial.
- IV. Garantizar en todo momento la confidencialidad del MATERIAL. El compromiso de confidencialidad y de limitación en el uso subsiste durante todo el periodo en que se mantenga el MATERIAL, y éste no puede prolongarse más allá del necesario para cumplir los fines de investigación señalados en el PROYECTO y las obligaciones vinculadas al mismo.
- V. El RECEPTOR, cuando trate datos seudonimizados, se compromete a no intentar identificar al sujeto.
- VI. Asumir la responsabilidad y eximir de cualquier responsabilidad al BIOBANCO, respecto del manejo y almacenamiento adecuado y seguro del MATERIAL bajo las condiciones de bioseguridad apropiadas y por personal capacitado en su laboratorio para garantizar una contención adecuada del riesgo. El MATERIAL transferido puede contener virus, genomas virales latentes y otros agentes infecciosos.
- VII. Si en el curso de la investigación se obtuviese algún hallazgo relevante para la salud del sujeto donante o de sus familiares, informará al BIOBANCO garantizando el acceso a los correspondientes datos y resultados.

---

## ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS Y/O DATOS CLÍNICOS ASOCIADOS PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

---

- VIII. Mencionar la procedencia del MATERIAL en todas las comunicaciones y publicaciones científicas que se deriven de la investigación con dicho MATERIAL, con las siguientes fórmulas conjuntamente:

En Materiales y Métodos:

*“Las muestras y datos de pacientes incluidos en este estudio fueron proporcionados por el Biobanco IMIB (Registro Nacional de Biobancos B. 0000859) (PT20/00109), integrado en la Plataforma ISCIII Biobancos y Biomodelos, con la aprobación de sendos Comités Ético y Científico, y han sido procesados siguiendo procedimientos normalizados”*

*“Samples and data from patients included in this study were provided by the Biobank IMIB (National Registry of Biobanks B. 0000859) (PT20/00109), integrated in the Platform ISCIII Biobanks and Biomodels and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethics and Scientific Committees”, y*

En Agradecimientos:

*“Agradecemos particularmente a los pacientes y al Biobanco IMIB (PT20/00109) integrado en la Plataforma ISCIII Biobancos y Biomodelos su colaboración”*

*“We want to particularly acknowledge the patients and the Biobank IMIB (PT20/00109) integrated in the Platform ISCIII Biobanks and Biomodels for their collaboration”.*

- IX. Una vez publicados los resultados derivados de la utilización del MATERIAL, enviará al BIOBANCO una copia de todas las comunicaciones y artículos científicos publicados. Del mismo modo, depositará en el BIOBANCO los datos de interés derivados del proyecto realizado con el MATERIAL, tras su conclusión y publicación, quedando a disposición de futuros investigadores que requieran el mismo MATERIAL. Por su parte el BIOBANCO informará al RECEPTOR de los proyectos en los que se solicite y cedan esos datos.
- X. El BIOBANCO se reserva el derecho de recabar informes al RECEPTOR acerca de la utilización del MATERIAL, y realizar un seguimiento de los resultados obtenidos con el mismo para garantizar el derecho de información al donante.
- XI. Una vez finalizado el PROYECTO o extinguido el contrato, el RECEPTOR devolverá al BIOBANCO o destruirá a decisión de este último y a coste del RECEPTOR los excedentes de MATERIAL utilizado para dicha finalidad.
- XII. Sufragar al BIOBANCO los gastos generados según el presupuesto previamente aceptado, así como los costes de envío si los hubiera, e incluidos en el ANEXO IV. En ese caso, el investigador se haría cargo de contratar a una empresa transportista que garantice el transporte adecuado del MATERIAL cumpliendo estándares de calidad y seguridad requeridos. El BIOBANCO no se hace responsable de los daños o pérdida que pudiera ocasionarse al MATERIAL durante el transporte.
- XIII. Cumplir el Reglamento interno del Biobanco en lo referente a cesiones. Dichos aspectos se encuentran ya clausulados en este acuerdo.

### CUARTA. CONFIDENCIALIDAD

---

## ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS Y/O DATOS CLÍNICOS ASOCIADOS PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

---

Cada una de las partes se compromete a no difundir sin permiso de la otra parte, las informaciones científicas o técnicas pertenecientes a la otra parte a las que hayan podido tener acceso, siempre que esas informaciones no sean de dominio público o su revelación sea requerida por Ley o por autoridad pública.

Esta obligación se mantendrá en vigor con independencia de la vigencia del presente acuerdo y mientras dicha información mantenga su carácter confidencial.

### QUINTA. DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL E INDUSTRIAL

Salvo que las partes acuerden lo contrario, la aportación del BIOBANCO en el presente PROYECTO de Investigación queda limitada a la aportación del MATERIAL. El RECEPTOR ostentará los derechos de Propiedad Industrial y/o Intelectual que se puedan derivar de los resultados del PROYECTO.

### SEXTA. RESOLUCIÓN DE CONFLICTOS, LEY APLICABLE Y JURISDICCIÓN

Las partes se comprometen a resolver de manera amistosa cualquier desacuerdo que pueda surgir en el cumplimiento del presente acuerdo.

En el caso de conflicto por divergencias en la interpretación o ejecución del presente acuerdo, o cualquier cuestión que pudiera derivarse de la aplicación, cumplimiento y efectos del presente acuerdo, las partes se comprometen a someterse a la jurisdicción competente al domicilio del BIOBANCO, con renuncia expresa a cualquier otro fuero y jurisdicción.

Las partes acuerdan someterse a la normativa específicamente aplicable mencionada en el cuerpo del presente Contrato y supletoriamente lo dispuesto en el Código Civil. El presente Acuerdo se regirá según la legislación española.

Cualquier controversia que surja con motivo de su aplicación será resuelta por los juzgados y tribunales de Murcia

### SÉPTIMA. VIGENCIA DEL ACUERDO Y EXTINCIÓN DEL CONTRATO

El presente acuerdo entra en vigor en fecha de la última de las firmas que lo suscriben.

Este acuerdo podrá quedar extinguido, mediante escrito dirigido a la otra parte:

- a) Tras la conclusión del PROYECTO para el que se ha solicitado el MATERIAL.
- b) Por mutuo acuerdo de las partes.
- c) Clausura, o disolución o liquidación de cualquiera de las entidades/instituciones que suscriben el presente acuerdo.
- d) Incumplimiento de las obligaciones del presente acuerdo.


No obstante, la extinción del presente acuerdo por cualquier motivo, no se extinguirán las obligaciones de los firmantes en materia de confidencialidad, devolución o destrucción de excedentes, reconocimiento de procedencia, retorno de resultados y todas las que establezca la ley aplicable.

### OCTAVA: INVALIDEZ PARCIAL

## ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS Y/O DATOS CLÍNCOS ASOCIADOS PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

En caso de que cualquier cláusula o parte del presente acuerdo resulte ilegal, inválida o no ejecutable, las cláusulas restantes permanecerán con plena eficacia.

Y, para que conste a todos los efectos, afirmándose y ratificándose en el contenido del presente acuerdo, con promesa de cumplimiento estricto y fiel a los contenidos, las partes lo firman por duplicado y a un solo efecto.

Por parte del BIOBANCO:	Por parte de la Institución RECEPTORA:
Representante Legal del Biobanco*:  Firmado: María Fuensanta Martínez Lozano Fecha:	Representante Legal de la Institución*:  Firmado: (Nombre y Apellidos) Fecha:
Director/a Científico/a del Biobanco:  Firmado: Luis García-Marcos Álvarez Fecha:	Investigador/a Responsable del Proyecto:    Firmado: Salvador Martínez Pérez Fecha: 29/11/2024

\* Si el Representante Legal es el mismo en ambas instituciones, no es necesaria la firma.

### ANEXOS

- ANEXO I:** Formulario de solicitud de las muestras.
- ANEXO II:** Memoria del PROYECTO para el que se solicitan las muestras.
- ANEXO III:** Registro de transacción de muestras. Descripción detallada de las muestras e información que se proporcionarán al RECEPTOR, incluyendo el tipo de disociación de la información.
- ANEXO IV:** Presupuesto detallado de los servicios a realizar por el BIOBANCO.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1- Blasco-Santana L, Colmenero I. Molecular and pathological features of paediatric high-grade gliomas. *Int J Mol Sci.* 2024;25(15):8498.
- 2- Llordes GM, Medina Pérez VM, Curto Simón B, Castells-Yus I, Vázquez Sufuentes S, Schuhmacher AJ. Epidemiology, diagnostic strategies, and therapeutic advances in diffuse midline glioma. *J Clin Med.* 2023;12(16):5261.
- 3- Sejda A, Grajkowska W, Trubicka J, Szutowicz E, Wojdacz T, Kloc W, et al. WHO CNS5 2021 classification of gliomas: a practical review and road signs for diagnosing pathologists and proper patho-clinical and neuro-oncological cooperation. *Folia Neuropathol.* 2022;60(2):137-52.
- 4- Di Ruscio V, Del Baldo G, Fabozzi F, Vinci M, Cacchione A, de Billy E, et al. Pediatric diffuse midline gliomas: An unfinished puzzle. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(9):2064.
- 5- Infinger LK, Stevenson CB. Re-examining the need for tissue diagnosis in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas: a review. *Curr Neuropharmacol.* 2017;15(1):129–133.
- 6- Chico-Ponce de León F, Perezpeña-Diazconti M. Glioblastoma del puente. Gliomas pediátricos en la clasificación actual de los tumores del sistema nervioso central por la Organización Mundial de la Salud. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2017;74(2):147–153.
- 7- Mellai M, Annovazzi L, Bisogno I, Corona C, Crociara P, Iulini B, et al. Chondroitin sulphate proteoglycan 4 (NG2/CSPG4) localization in low- and high-grade gliomas. *Cells.* 2020;9(6):1538.
- 8- Pombero A, Garcia-Lopez R, Martínez S. Pericyte-glioblastoma cell interaction: A key target to prevent glioblastoma progression. *Cells.* 2023;12(9):1324.

9- Martinez-Morga M, Garrigos D, Rodriguez-Montero E, Pombero A, Garcia-Lopez R, Martinez S. Pericytes are immunoregulatory cells in glioma genesis and progression. *Int J Mol Sci.* 2024;25(10):5072.

10- Pombero A, Garcia-Lopez R, Martinez S. Brain mesenchymal stem cells: physiology and pathological implications. *Dev Growth Differ.* 2016;58(5):469–480.

11- Pachocki CJ, Hol EM. Current perspectives on diffuse midline glioma and a different role for the immune microenvironment compared to glioblastoma. *J Neuroinflammation.* 2022;19(1):276.

12- Li X, Ding Y, Zi M, Sun L, Zhang W, Chen S, Xu Y. CD19, from bench to bedside. *Immunol Lett.* 2017 Mar;183:86-95..

13- Parker KR, Migliorini D, Perkey E, Yost KE, Bhaduri A, Bagga P, Haris M, Wilson NE, Liu F, Gabunia K, Scholler J, Montine TJ, Bhoj VG, Reddy R, Mohan S, Maillard I, Kriegstein AR, June CH, Chang HY, Posey AD Jr, Satpathy AT. Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies. *Cell.* 2020;183(1):126-142.e17

14- Kong D, Kwon D, Moon B, Kim DH, Kim MJ, Choi J, Kang KS. CD19 CAR-expressing iPSC-derived NK cells effectively enhance migration and cytotoxicity into glioblastoma by targeting to the pericytes in tumor microenvironment. *Biomed Pharmacother.* 2024 May;174:116436.

15- Rechberger JS, Porath KA, Zhang L, Nesvick CL, Schrecengost RS, Sarkaria JN, Daniels DJ. IL-13R $\alpha$ 2 status predicts GB-13 (IL13.E13K-PE4E) efficacy in high-grade glioma. *Pharmaceutics.* 2022;14(5):922.

16- Thomas BC, Staudt DE, Douglas AM, Monje M, Vitanza NA, Dun MD. CAR T cell therapies for diffuse midline glioma. *Trends Cancer.* 2023;9(10):791-804.

17- Bodmer W, Golubovskaya V. Cancer immunotherapy: where next? *Cancers (Basel)*. 2023 Apr 18;15(8):2358.

18- Brown CE, Hibbard JC, Alizadeh D, Blanchard MS, Natri HM, Wang D, et al. Locoregional delivery of IL-13R $\alpha$ 2-targeting CAR-T cells in recurrent high-grade glioma: a phase 1 trial. *Nat Med*. 2024;30(4):1001–1012.

19- Dynamic Contrast Enhanced MRI Detects Early Response to Adoptive NK Cellular Immunotherapy Targeting the NG2 Proteoglycan in a Rat Model of Glioblastoma Rygh CB, Wang J, Thuen M, Gras Navarro A, Huuse EM, Thorsen F, et al. Dynamic contrast enhanced MRI detects early response to adoptive NK cellular immunotherapy targeting the NG2 proteoglycan in a rat model of glioblastoma. *PLoS One [Internet]*. 2014;9(9):e108414.

20 Caspani EM, Crossley PH, Redondo-Garcia C, Martinez S. Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes. *PLoS One*. 2014;9(7):e101402.

21- Valdor R, García-Bernal D, Bueno C, Ródenas M, Moraleda JM, Macian F, Martínez S. Glioblastoma progression is assisted by induction of immunosuppressive function of pericytes through interaction with tumor cells. *Oncotarget*. 2017;8(40):68614-68626.

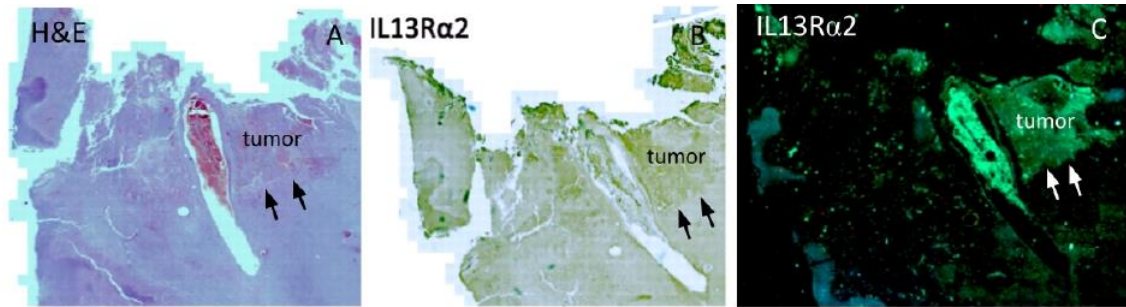


## 8. TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

**Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios**

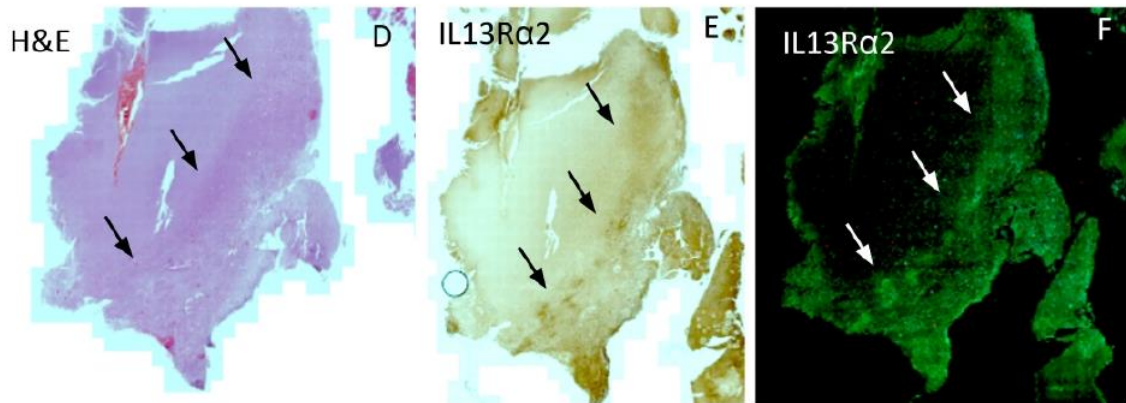
Técnica	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Objetivos
Inmunohistoquímica anti-IL3R $\alpha$ 2	Goat polyclonal anti-IL-13 R $\alpha$ 2	Anti-goat IgG donkey ab6880	Marcador de células tumorales de GDI O1- Análisis de la expresión de IL13RA2 por las células tumorales
Inmunohistoquímica anti-NG2	Rabbit anti-NG2/CSPG4 polyclonal IgG	Anti-rabbit IgG goat BA-1000	Marcador de PC O2- Analizar la presencia de NG2/CSPG4 en el microambiente tumoral del GDI O3- Descripción de la malformación vascular e interacción células tumorales-PC en la zona peritumoral
Inmunofluorescencia doble anti-NG2 y anti-IL3R $\alpha$ 2	Rabbit anti-NG2/CSPG4 polyclonal IgG  Human anti-IL-13 R $\alpha$ 2 antibody polyclonal goat IG	Anti-rabbit F14 (red) / F33 (red)  Anti-goat F27 (green)	Marcador de PC (NG2) Marcador de células tumorales (IL3R $\alpha$ 2) O1- Análisis de la expresión de IL13RA2 por las células tumorales. O2- Analizar la presencia de NG2/CSPG4 en el microambiente tumoral del GDI O3- Descripción de la malformación vascular e interacción células tumorales-PC en la zona peritumoral
Inmunofluorescencia doble anti-NG2 y anti-PDGFR $\beta$	Rabbit anti-NG2/CSPG4 polyclonal IgG  Human anti-PDGFR $\beta$ antibody polyclonal goat IG	Anti-rabbit F14 (red) / F33 (red)  Anti-goat F27 (green)	Marcador de PC (NG2, PDGFR $\beta$ ) O2- Analizar la presencia de NG2/CSPG4 en el microambiente tumoral del GDI O3- Descripción de la malformación vascular e interacción células tumorales-PC en la zona peritumoral
Inmunofluorescencia anti-GFAP	Rat monoclonal IgG anti-GFA	Anti-rat Alexa F44 (green)	Marcador de células tumorales de GDI O3- Descripción de la malformación vascular e interacción células tumorales-PC en la zona peritumoral
Inmunofluorescencia anti-CD19	Rabbit anti-CD19 recombinant monoclonal IgG	Anti-rabbit F14 (red) / F33 (red)	Posible marcador de células tumorales y PC condicionados O4-Análisis de expresión de CD19 y su interacción con PC

**Figura 1. Expresión de IL13R $\alpha$ 2 en GDI.**



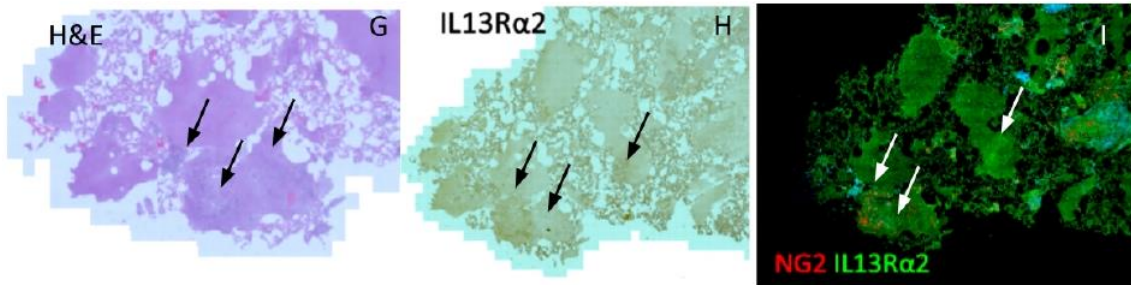
**GDI 18, muestra 1 de la necropsia: Glioma difuso infantil de tronco. Sección transversal de protuberancia.**

A) Tinción estructural con H&E mostrando la masa celular del GDI (tumor). Las flechas indican la zona de avance del tumor sobre el tejido sano. Se aprecia la alta densidad celular del tumor comparado con el tejido sano. B) IMH: Expresión de IL13R $\alpha$ 2 en las células tumorales, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flechas) C) IF: Expresión de IL13R $\alpha$ 2 en las células tumorales, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flechas).



**GDI 19, muestra 5 de la necropsia: Glioma difuso infantil de tronco. Sección transversal de protuberancia.**

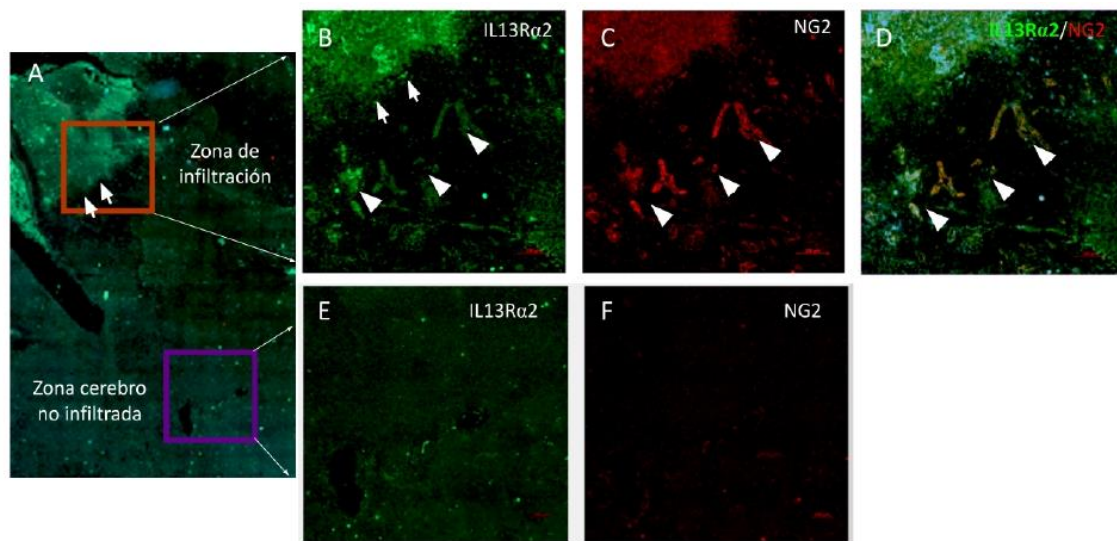
D) Tinción estructural con H&E mostrando la masa celular del GDI (tumor). Las flechas indican la zona de avance del tumor sobre el tejido sano. Se aprecia la alta densidad celular del tumor comparado con el tejido sano. E) IHQ Expresión de IL13R $\alpha$ 2 en las células tumorales, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flechas) F) IMF: Expresión de IL13R $\alpha$ 2 en las células tumorales, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flechas).



**GDI 78, pieza de necropsia 6: Glioma difuso infantil de tronco. Sección transversal del mesencéfalo.**

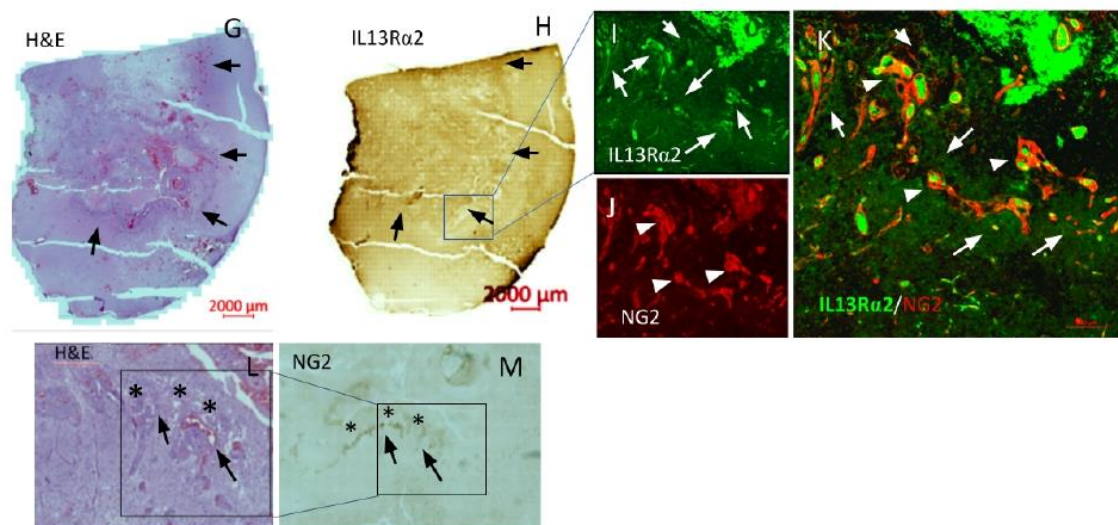
G) Tinción estructural con H&E mostrando la masa celular del GDI (tumor). Las flechas indican la zona de avance del tumor sobre el tejido sano. Se aprecia la alta densidad celular del tumor comparado con el tejido sano. H) IHQ: Débil expresión de IL13R $\alpha$ 2 en las células tumorales, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flechas) I) Inmunofluorescencia: Débil expresión de IL13R $\alpha$ 2 (verde) en las células tumorales y NG2 (rojo) en los PC, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flechas).

**Figura 2. expresión de NG2 en la zona de avance de GDI**



**GDI 18, muestra 1 de la necropsia: Glioma difuso infantil de tronco. Sección transversal de protuberancia.**

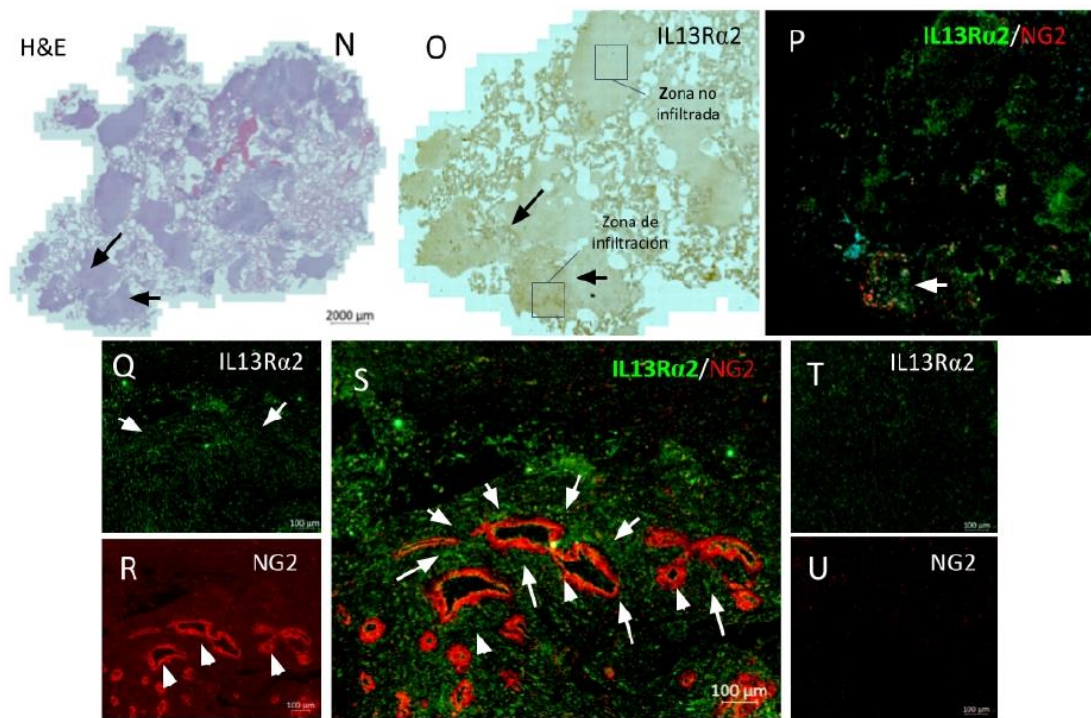
A) IF: expresión de IL13R $\alpha$ 2 en las células tumorales, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flechas). El recuadro rojo (zona de avance tumoral) se amplía en B. El recuadro violeta (zona de cerebro no infiltrada) se amplía en E. Las células tumorales expresan IL13R $\alpha$ 2 (verde). B) Aumento de la zona de avance tumoral expresando IL13R $\alpha$ 2. C) Intensa expresión de NG2 en los vasos peritumorales, con aspecto glomeruloide (flechas). D) Se aprecia la activación de NG2 en PC contactados por células de GDI (flechas). E, F) En la zona de tejido cerebral no infiltrado no se observa expresión de IL13R $\alpha$ 2 ni NG2.



**GDI 18, muestra 9 de la necropsia. Sección transversal del mesencéfalo.**

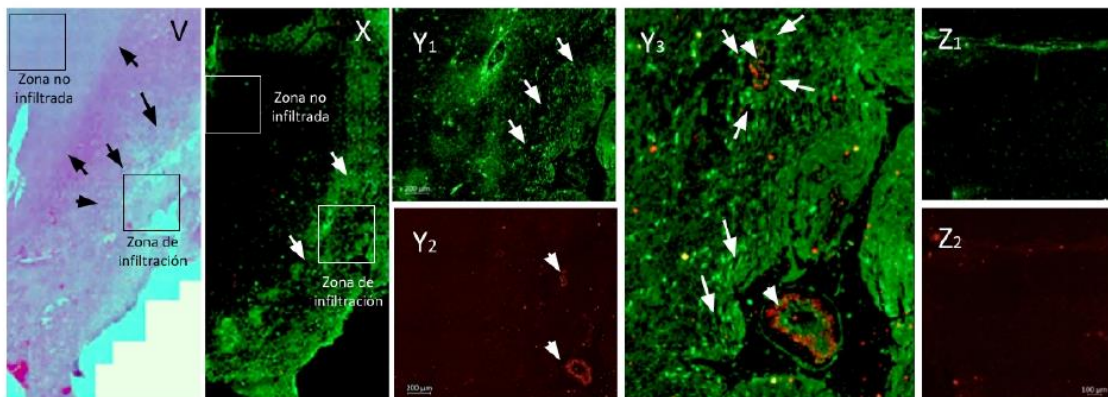
G) Tinción estructural con H&E mostrando la masa celular del GDI. Las flechas indican la zona de avance del tumor sobre el tejido sano. Se aprecia la alta densidad celular del tumor comparado con el tejido sano. H) IHQ: Expresión de IL13R $\alpha$ 2 en las células tumorales, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flechas). El recuadro muestra la zona mostrador en I-K. I, J, K) IF mostrando la expresión de IL13R $\alpha$ 2 (verde) en las células tumorales y NG2 (rojo) en los pericitos, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (puntas de flecha). L) Tinción estructural con H&E mostrando la región de malformación vascular peritumoral (flechas y asteriscos). M) Región señalada en la imagen L (recuadro) donde se ha detectado la expresión de NG2 en los vasos peritumorales.

**Figura 2. expresión de NG2 en la zona de avance de GDI**



**GDI 78, muestra 6 de la necropsia. Sección transversal de bulbo con mucha necrosis.**

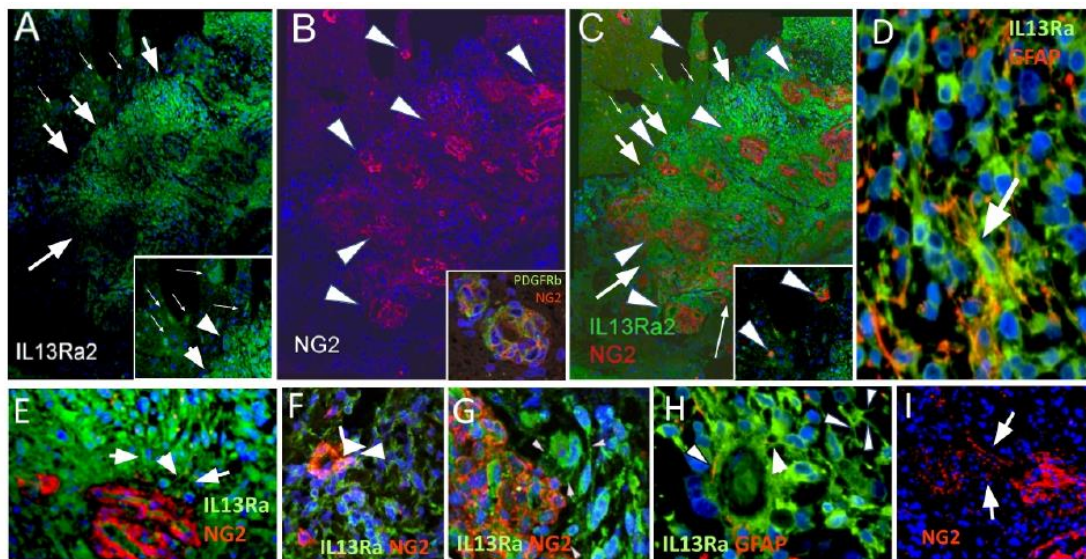
N) Tinción estructural con H&E mostrando la masa celular del GDI. Las flechas indican la zona de avance del tumor sobre el tejido sano. Se aprecia la alta densidad celular del tumor comparado con el tejido sano. B) IMH: Expresión de IL13Rα2 en las células tumorales, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flechas). P) IF: Expresión de IL13Rα2 en las células tumorales, coincidiendo la expresión con el frente de avance tumoral (flecha). Q, R, S) IF de la zona de avance tumoral (recuadro en O) con células de GDI IL13Rα2 positivas (verde, flechas) que infiltran difusamente el tejido adyacente y coaptan los vasos peritumorales, donde activan la expresión de NG2 en los pericitos (rojo, puntas de flecha). T, U) En la zona no infiltrada (recuadro en O) no se observa expresión de IL13Rα2 ni NG2.



**GDI 19, muestra 5 de la necropsia: Glioma difuso infantil de tronco. Sección transversal de protuberancia.**

V) Tinción estructural con H&E mostrando la masa celular del GDI (tumor) y el tejido no infiltrado peritumoral. Las flechas indican el frente de avance del tumor. X) IF con la expresión de IL13Rα2 en las células del GDI. Y 1, 2 y 3) Fotografías de IF donde se muestra la zona de infiltración (recuadros en V y X), las flechas señalan las células de GDI con expresión de IL13Rα2 (verde) y las puntas de flechas los PC expresando NG2 (rojo). Z 1, 2) Las zonas de tejido no infiltrado no presentan expresión de IL13Rα2 ni NG2.

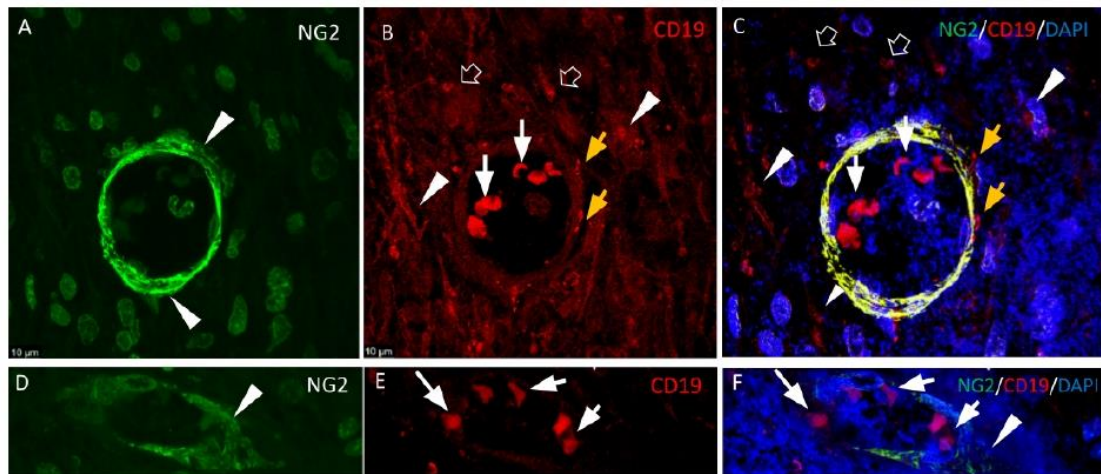
**Figura 3. Cooptación vascular por el GDI**



**GDI 23 muestra de biopsia. Secciones transversales de protuberancia.**

A) IF: Detección de la expresión de IL13Rα2 en el tumor, donde se aprecia el margen de la masa tumoral (flechas grandes) y la presencia de células aisladas de GDI (IL13Rα2 positivas) en el tejido peritumoral (flechas pequeñas; Insert). B) IF: Detección de NG2 en las paredes de los vasos tumorales (puntas de flecha). Insert: vasos peritumorales expresando NG2 en los PC, identificados por la expresión de PDGFRβ. C) IF: detección combinada de IL13Rα2 y NG2 donde se muestra la coincidencia de la activación de NG2 en las zonas de cooptación vascular por parte de células tumorales (flechas y puntas de flecha). En el insert se muestra como células infiltradas a distancia del margen tumoral son capaces de cooptar vasos y activar la expresión de NG2 (puntas de flecha). D) La expresión de IL13Rα2 coincide con la expresión de GFAP (flecha) demostrando el carácter glial de las células de GDI. E-G) la expresión de IL13Rα2 en las células de GDI nos permite observar las prolongaciones que estas células envían a los PC para activar los procesos de cooptación vascular (flechas en E-F; puntas de flecha en H). I) En algunas regiones de la sección se observan PC (NG2 +) migrando libremente por el espacio peritumoral (flechas).

**Figura 4. Expresión de CD19 en el GDI**



**GDI 18 muestra 1 de la necropsia.**

A) IF: Detección de la expresión de NG2 en pericitos alrededor de un vaso en la periferia del GDI (puntas de flecha). B) IF: Expresión de CD19 en células sanguíneas intravasculares (flechas blancas), en la membrana de células tumorales (puntas de flecha) y en la membrana celular de PC (flechas amarillas). C) Doble IF mostrando la relación de la localización de CD19 en la membrana del PC (flechas amarillas). D-F) En la región no infiltrada se observan PC con débil expresión de NG2 (punta de flecha en D y F), lo que permite localizar la expresión de CD19 exclusivamente en células intravasculares (flechas en E, F).



