



**VI CONGRESO DE  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

# **LIBRO DE RESÚMENES**

**CIB2018**

7,8 y 9 de febrero del 2018



[www.cibvalencia.es](http://www.cibvalencia.es)



@CIB\_2018



[dudas@cibvalencia.com](mailto:dudas@cibvalencia.com)



congreso de investigación biomédica

# PÓSTERES Y COMUNICACIONES ORALES

<b>PÓSTERES, TURNO 1</b>	7 de febrero, 10.00-10.30h
<ul style="list-style-type: none"><li>• DESÓRDENES DEL SISTEMA CIRCADIANO Y DEL SUEÑO EN PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA. <i>Marta Jover Aguilar.</i></li><li>• PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DGGE PARA EL ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL. APLICACIÓN A UN ESTUDIO CARDIOMETABÓLICO EN RATAS. <i>Cristina Ramos Andrades.</i></li><li>• MENINGITIS CRÓNICA, UN RETO DIAGNÓSTICO. <i>Maria Yan Wu.</i></li><li>• HIGH FRUCTOSE DIET PRODUCES SUBCLINICAL FAT DEPOSITION AND ALTERATIONS OF LIPID PROFILE IN RAT LIVER. <i>María Martin Grau.</i></li></ul>	
<b>COMUNICACIONES ORALES, TURNO 1</b>	7 de febrero, 12.00-13.45h
<ul style="list-style-type: none"><li>• ESTUDIO OBSERVACIONAL RETROSPECTIVO DEL COEFICIENTE DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS CRÓNICAS TRATADAS CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP). <i>Jesús Rebull Bramón.</i></li><li>• EFECTO NEUROPROTECTOR Y ANTIINFLAMATORIO DE UN ÁCIDO GRASO INSATURADO EN MODELOS IN VITRO E IN VIVO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON. <i>Jesús Alarcón Gil.</i></li><li>• EFECTOS DEL CONSUMO DE FRUCTOSA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y EL METABOLISMO LIPÍDICO DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN. <i>María Iribarren Astarloa.</i></li><li>• REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA ENZIMA RIBONUCLEÓTIDO REDUCTASA EN DEFICIENCIA DE HIERRO EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. <i>Cristina Ros Carrero.</i></li><li>• LA FRUCTOSA MATERNA AFECTA AL "METABOLISMO DE UN CARBONO" DE LA DESCENDENCIA SEGÚN EL GÉNERO. <i>Rodrigo Aguirre Lera.</i></li><li>• EFECTO DEL CONSUMO DE AZÚCARES DURANTE LA GESTACIÓN EN EL METABOLISMO LIPÍDICO DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN DE LA DESCENDENCIA. <i>Natalia Martínez Vizcaíno.</i></li><li>• BIOMEDICINA DE LA RIBOFLAVINA. CURANDO CON LA VITAMINA B2.</li></ul>	

## PÓSTERES, TURNO 2

7 de febrero, 18.15-18.45h

- SEARCH FOR AXON GUIDANCE MOLECULES INVOLVED IN THE MIGRATION OF THE INTERPEDUNCULAR NUCLEUS IN MOUSE DEVELOPING BRAIN. *Isabel María García Guillén.*
- PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES: MIGRACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS. *Christian Miquel Sánchez López.*
- COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA PATOLOGÍA DE LA PROTEÍNA TAU POSITIVA EN EL GYRUS AMBIENS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y SUJETOS CONTROL. *Adriana Rodado Añó.*
- RELACIÓN ENTRE LA DISBIOSIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EL DESARROLLO DE LESIONES ANALES PRECANCEROSAS DURANTE LA INFECCIÓN POR VIH. *Yolanda López Toboso.*
- RELATIONSHIP BETWEEN POSTOPERATIVE BLOOD PRESSURE LABILITY AND DELIRIUM IN NEUROSURGICAL PATIENTS. *Nekane Romero.*

## COMUNICACIONES ORALES, TURNO 2

7 de febrero, 18.45-20.00h

- PATRÓN ESTENOSANTE Y FISTULIZANTE EN LA ENFERMEDAD DE CROHN: PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS Y LA RUTA WNT EN LA FISIOPATOLOGÍA. *Juan José Lluch Galcerá.*
- OXYGEN LOAD DURING PRETERM STABILIZATION MODIFIES EPIGENETIC PROFILES. *Sheila Lorente Pozo.*
- IMPLICACIÓN DEL GEN IDH Y EGFR EN LA BIOPATOLOGÍA Y PRONÓSTICO DE GLIOBLASTOMAS PRIMARIOS CON MUTACIÓN EN EL GEN TP53. *Marta Dafne Cabañero Navalón.*
- PERFIL METABÓLICO URINARIO DEL RECIÉN NACIDO PREMATURO ALIMENTADO CON LECHE MATERNA O LECHE MATERNA DONADA. *José David Piñeiro-Ramos.*

- **MODELOS HETERÓLOGOS Y HOMÓLOGOS DE ROEDORES PARA ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE ENDOMETRIOSIS.** *María Marchante Cuevas.*

### PÓSTERES, TURNO 3

8 de febrero, 11.00-11.30h

- **DIFERENCIACIÓN DE iPSCS EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS.** *María Isabel Moscardó García*
- **EFFECTO DEL DOLOR INFLAMATORIO SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES OPIOIDES MU DEL ÁREA TEGMENTAL VENTRAL.** *Yolanda Campos Jurado, Marta Igual López, Jesús David Lorente Erenas*
- **CARACTERIZACIÓN PROBIÓTICA DE BACTERIAS AISLADAS DE DERIVADOS LÁCTEOS FERMENTADOS.** *Andrés Llatas Mateu*
- **INFLUENCIA DE LA VITAMINA D EN EL CRECIMIENTO DE MIOMAS.** *María Cristina Carbajo García*
- **INSIGHTS INTO NEURAL OSCILLATIONS IN STRESS.** *Danae Raya Salom*

### COMUNICACIONES ORALES, TURNO 3

8 de febrero, 12.45-13.45h

- **ALTERACIONES ANATÓMICAS Y PATOLÓGICAS EN EL SENO MAXILAR DE ETIOLOGÍA ODONTOGÉNICA. UNA EVALUACIÓN METODOLÓGICA DE REVISIONES SISTEMÁTICAS Y META-ANÁLISIS.** *Sonia Peñarrocha Otra*
- **EFFECT OF THE ANTIRETROVIRAL DRUG EFAVIRENZ ON THE PROCESS OF MITOPHAGY IN GLIAL CELLS.** *Olga Martínez Arroyo*
- **ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACTATO DESHIDROGENASA SALIVAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL.** *Manuel Iglesias Diaz*
- **ESTABLISHMENT OF AN INMUNOREGULATORY GENE EXPRESSION SCORE AS PROGNOSTIC BIOMARKER FOR RESECTABLE STAGES OF LUNG ADENOCARCINOMA.** *Andrea Moreno Manuel*

### PÓSTERES, TURNO 4

8 de febrero, 18.15-18.45h

- **LA NEOANGIOGÉNESIS EN EL MENINGIOMA. SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS.** *María González Bisquert*

- COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN PROGRAMA DE EJERCICIO INTRADIÁLISIS FRENTE A UN PROGRAMA DE EJERCICIO DOMICILIARIO SOBRE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN. *Erika Meléndez Oliva*
- COEXISTENCIA DE MOLA HIDATIFORME COMPLETA CON GESTACIÓN NORMAL. *Hui Chen*
- ESTUDIO DE MARCADORES DE SENESCENCIA EN CÉLULAS HUVEC TRATADAS CON FÁRMACOS ANTI-VIH. *Laia Abad Jordà*
- ESTUDIO DE ALTERACIONES DEL SUEÑO EN UN MODELO DE DOLOR CRÓNICO EN RATA. *Gloria Alfosea Cuadrado*

## COMUNICACIONES ORALES, TURNO 4

8 de febrero, 18.45-20:00h

- EOSINOPENIA AFTER MYOCARDIAL INFARCTION MIRRORS EOSINOPHIL MIGRATION TO THE INFARCTED MYOCARDIUM. ROLE OF EOTAXIN-1. *Maria Ortega Albiach*
- ESTUDIOS DE MEDICINA REGENERATIVA EN LA RECONSTRUCCIÓN ENDOMETRIAL COMO POSIBLE TRATAMIENTO EN LA INFERTILIDAD FEMENINA. *Yassmin Medina Laver*
- ESTUDIO DE LA RESERVA OVÁRICA EN LA RECIÉN NACIDA. *María Fontal Carcel*
- LA INSEMINACIÓN INTRAUTERINA COMO TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN ESPAÑA. *María Gabriela Trejo*
- IMPLICACIÓN DE LA CDH2 Y LA AFADINA EN LA REGULACIÓN DE LA GENERACIÓN DE LAS NEURONAS DE PROYECCIÓN DE LA CORTEZA CEREBRAL. *Marta Nadal Muñoz*



# DESÓRDENES DEL SISTEMA CIRCADIANO Y DEL SUEÑO EN PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA

*Marta Jover Aguilar*

**INTRODUCCIÓN.** El 50-65% de los pacientes con cirrosis refieren trastornos de sueño, principalmente relacionado con dificultades para quedarse dormido, numerosos despertares y somnolencia durante el día. Esta alteración del sueño produce un impacto negativo en la calidad de vida e incluso en la supervivencia tras el trasplante (1). Además, se ha visto que se produce un retraso en la fase de sueño y de los ritmos circadianos de secreción de melatonina y cortisol, que llegan incluso a la inversión del patrón de sueño (duermen durante el día y permanecen despiertos por la noche) (2).

Los ritmos marcadores más utilizados son el de melatonina y cortisol salivar, actimetría y temperatura central. Está descrito un retraso de fase en los ritmos circadianos de cortisol y melatonina en los pacientes con cirrosis, así como un aumento de la melatonina durante el día (3). Sin embargo, se desconoce el posible efecto de la cirrosis sobre otros ritmos marcadores del sistema circadiano, como son el de actividad, la exposición a la luz o la temperatura periférica distal (TPD) (4).

Por tanto, el objetivo principal del estudio fue evaluar el sistema circadiano mediante los ritmos marcadores de TPD, actividad y exposición a la luz, así como relacionarlos con los problemas de sueño.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** En el estudio se incluyeron 16 pacientes que fueron clasificados según la escala Child-Pugh (5 Child A, 5 Child B y 6 Child C). Los pacientes fueron monitorizados mediante Kronowise® (Kronohealth SL) durante 7 días completos para monitorizar la temperatura periférica distal, la exposición a la luz y la actividad. Además, sus hábitos de sueño se evaluaron mediante 3 cuestionarios validados (Somnolencia diurna de Epworth, Calidad del sueño de Pittsburg y Cronotipos de Munich). A continuación, se realizó un análisis no paramétrico de los ritmos estudiados y se chequeó la posible relación de los ritmos con los cuestionarios utilizados mediante un análisis de correlación con IBM SPSS Statistics versión 23.0.

**RESULTADOS.** Los pacientes Child C en comparación con los Child A presentaron valores más altos de TPD durante el día ( $33,77 \pm 0,46$  vs  $30,30 \pm 1,06$ oC, respectivamente;  $p < 0,05$ ) y durante la noche ( $34,64 \pm 0,20$  vs  $33,88 \pm 0,34$ oC, respectivamente;  $p < 0,05$ ), mientras que los Child B se mantuvieron en un punto intermedio. Además, los pacientes Child C mostraron valores más altos de actividad por la noche que los pacientes Child B ( $5,62 \pm 1,67$  vs  $1,96 \pm 0,32$  cuentas/minuto, respectivamente;  $p < 0,05$ ) y que los pacientes Child A ( $5,62 \pm 1,67$  vs  $3,68 \pm 0,57$  cuentas/minuto, respectivamente;  $p < 0,05$ ). En el caso de la exposición a la luz, los pacientes Child C presentaron

niveles nocturnos de iluminación mayores que los pacientes Child A ( $0,27\pm 0,09$  vs  $0,07\pm 0,03$  log10lux, respectivamente;  $p<0,05$ ).

Por último, el análisis de correlación mostró que los pacientes con mayor retraso en el centro del sueño referían una menor calidad de sueño ( $r=-0,524$ ;  $p<0,05$ ), menor duración del sueño ( $r=-0,448$ ;  $p<0,05$ ) y una mayor probabilidad de dormirse viendo la televisión ( $r=0,507$ ;  $p<0,05$ ).

**DISCUSIÓN / CONCLUSIONES.** Los pacientes con cirrosis hepática presentaron unos hábitos de sueño alterados, que se caracterizaron por un retraso en el centro del sueño, una peor calidad subjetiva del mismo y una reducción del sueño nocturno. Por tanto, estos pacientes presentan una cronodisrupción en función de la gravedad de su enfermedad, lo que puede suponer un peor pronóstico y supervivencia del trasplante.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Montagnese S, De Pittá C, De Rui M, Corrias M, Turco M, Merkel C et al. Sleep-Wake Abnormalities in Patients With Cirrhosis. *J Hepatol.*2014;59:705-712.
2. Montagnese S, Middleton B, R. Mani A, Skene D, Morgan M. Sleep and circadian abnormalities in patients with cirrhosis: features of delayed sleep phase syndrome? *Metab Brain Dis.*2009;24:427-439.
3. Martinez-Nicolas A, Ortiz-Tudela E, Rol M.A, Madrid J.A. Influencia de la exposición a la luz sobre el sistema circadiano. *Vigilia y sueño.* 2013;25(1):24-38.
4. Montagnese S, Middleton B, Mani R.A, Skene J.D, Morgan Y.M. On the origin and the consequences of circadian abnormalities in patients with cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.*2010;105:1773-1781.

# PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DGGE PARA EL ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL. APLICACIÓN A UN ESTUDIO CARDIOMETABÓLICO EN RATAS.

*Cristina Ramos Andrades.*

**INTRODUCCIÓN.** La comunidad de microorganismos que alberga el ser humano se conoce como microbiota humana. En concreto, la microbiota intestinal es la de mayor riqueza, con dos filos bacterianos representativos: Firmicutes y Bacteroidetes. Fenómenos de disbiosis (alteración de la composición y diversidad microbiana) se han asociado, en los últimos años, con el desarrollo de enfermedades cardiometabólicas, muy ligadas, además, a un estilo de vida poco saludable. La dieta es uno de los factores que más influye y, en este contexto, la microbiota intestinal está ocupando un papel central como posible diana terapéutica. El principal objetivo de este trabajo fue la puesta a punto de la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) para el estudio de la microbiota intestinal como metodología alternativa a la secuenciación masiva. Se trata de un método electroforético capaz de detectar diferencias entre fragmentos de DNA del mismo tamaño, pero con distinta secuencia de nucleótidos, mediante un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturante de urea y formamida.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** 6 ratas Wistar control de 12 semanas de edad fueron divididas en dos grupos en función del sexo: hembras (n=3) y machos (n=3). Tras determinar la influencia del sexo, 11 ratas Wistar macho fueron divididas en dos grupos: control (CT) (n=6) y modelo de síndrome metabólico (SM) con dieta rica en fructosa (60% en agua de bebida) (n=5). A partir de las heces de las ratas, se extrajo el DNA con QIAamp® DNA Stool Minikit (Qiagen). Se amplificó la región V3 del rDNA 16S bacteriano con los primers HDA1-GC y HDA2 (Murri et al., 2013). Una vez, optimizados los protocolos anteriores, se llevó a cabo la puesta a punto de la DGGE. Se procedió al montaje del equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRad). Brevemente, se prepararon dos soluciones desnaturantes 0% y 80% a partir de acrilamida/bisacrilamida 40%, urea y formamida desionizada. A partir de ellas, se elaboró el gel en gradiente del 35% al 65%. La electroforesis transcurrió a 120 V durante 5 min y, posteriormente, a 75 V durante 16 h. El marcaje del gel se realizó con SYBR® Green I y se reveló con un transiluminador UV. A partir de la posición e intensidad de las bandas del gel de DGGE, obtenidos con PyElph 1.4 e ImageJ, se construyó una matriz de datos para el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) a través de MATLAB (PLS Toolbox). El número de bandas de cada grupo fue evaluado con SPSS Statistics. La distribución normal se analizó con los test de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de varianzas, con el test de Levene. Posteriormente, se aplicó el test t entre los grupos control y síndrome metabólico, y el test no paramétrico de Mann-Whitney entre las ratas de diferente sexo (nivel de significatividad  $P < 0,05$ ).



**RESULTADOS.** El número medio de bandas de fue de 9 en hembras y 10,3 en machos, mientras que en las ratas control (CT) y en las ratas modelo de síndrome metabólico (SM) resultó ser de 8,5 y 7,2, respectivamente. Los resultados obtenidos tras el análisis de la posición, la intensidad y el número de bandas del gel de DGGE, como datos de riqueza microbiana, no mostraron diferencias estadísticamente significativas globales entre ninguno de los grupos experimentales. Estos resultados fueron compatibles con los obtenidos por secuenciación masiva con las ratas CT y SM. Tendencias observadas de separación en PCA y PLS-DA, así como los ratios Firmicutes:Bacteroides, sugirieron que, aumentando el tamaño muestral de los grupos del experimento, los resultados podrían presentar mayor significancia estadística.

**DISCUSIÓN / CONCLUSIONES.** La DGGE es una metodología de fingerprinting, independiente de cultivo, óptima para el estudio de la microbiota intestinal en diferentes grupos experimentales de manera rápida y económica. En función de la posición, la intensidad y el número de bandas del gel, se ha podido determinar que no se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos del estudio (hembras y machos; machos control y machos modelo de síndrome metabólico), a pesar de observarse ciertas tendencias que sí podrían ser relevantes en tamaños muestrales mayores. En concreto, la dieta rica en fructosa en ratas Wistar no parece alterar de manera considerable la diversidad y el tipo de microorganismos a nivel intestinal en este estudio, por lo que no se ha podido dilucidar la influencia de la microbiota en el desarrollo del síndrome metabólico en este modelo. Los resultados del análisis por DGGE son compatibles con los de secuenciación masiva, de forma que la combinación de ambas técnicas permitiría la caracterización profunda de la diversidad microbiana en un conjunto amplio de muestras.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Farha M. The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes. *Lipids Health Dis.* 2006; 15: 108.
2. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F, Queipo-Ortuño MI. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med.* 2013; 11: 46.
3. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16(6): 341-352.
4. Tang WH, Hazen SL. Microbiome, trimethylamine N-oxide, and cardiometabolic disease. *Transl Res.* 2017; 179: 108-115.

# MENINGITIS CRÓNICA, UN RETO DIAGNÓSTICO

*Maria Yan Wu*

**INTRODUCCIÓN.** La meningitis tuberculosa es la causa más frecuente de meningitis crónica en pacientes inmunocompetentes en nuestro medio. Puede complicarse con una vasculitis del sistema nervioso central e hidrocefalia lo que condiciona un peor pronóstico. La meningitis crónica suele suponer un reto diagnóstico ya que, pese a la amplia variedad de pruebas complementarias, la causa subyacente no se identifica en más de un tercio de los pacientes.

El objetivo de nuestro trabajo es realizar una revisión de la meningitis crónica y las vasculitis del sistema nervioso central, haciendo especial hincapié en la variante tuberculosa de ambas entidades. Para ello, presentamos el caso de un varón de 65 años admitido por inestabilidad de varios meses de evolución que, tras un exhaustivo proceso diagnóstico, fue diagnosticado de meningitis crónica de etiología probablemente tuberculosa y vasculitis del sistema nervioso central asociada.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Para la descripción del caso se revisaron las notas clínicas y las pruebas complementarias disponibles en la historia electrónica del paciente. Asimismo, se realizó una lectura sistemática de la bibliografía más importante relacionada con el tema, utilizando las bases de datos de Pubmed, Cochrane Library y MEDLINE en inglés y castellano.

**RESULTADOS.** Presentamos el caso de un varón de 65 años, ingresado por inestabilidad de varios meses de evolución que asoció progresivamente vómitos, diplopía, nistagmo horizonto-rotatorio, parálisis facial, mioclonías de las 4 extremidades y síndrome constitucional. El líquido cefalorraquídeo (LCR) mostró pleocitosis linfocitaria, hipoglucorraquia e hiperproteorraquia. El test de Mantoux fue positivo. La resonancia magnética cerebral (RMC) reveló múltiples lesiones isquémicas de nueva aparición, con defectos de repleción compatibles con trombos en ramas de la arteria cerebral media derecha y cerebral posterior izquierda, hidrocefalia y realce de meninges basales. La sospecha diagnóstica fue de meningitis crónica de probable etiología tuberculosa, con vasculitis del SNC asociada. La biopsia cerebral y leptomeníngea concordaban con el diagnóstico, aunque el cultivo fue negativo. El tratamiento con tuberculostáticos y corticoides mejoró claramente la clínica, permaneciendo únicamente una disartria leve. Tanto el LCR como la RMC presentaron mejoría.

**DISCUSIÓN / CONCLUSIONES.** La morbimortalidad de la meningitis tuberculosa está directamente relacionada con el retraso en su diagnóstico y tratamiento. Puede complicarse con una vasculitis del SNC e hidrocefalia, que retrasa la respuesta clínica al tratamiento y empeora el pronóstico. Su diagnóstico supone un reto por la variable presentación clínica y la ausencia de un test diagnóstico sensible. Debe de realizarse un reconocimiento rápido con pruebas de laboratorio, análisis del LCR y pruebas de imagen. La biopsia leptomeníngea y cerebral puede

ser necesaria para realizar el diagnóstico definitivo. El tratamiento temprano con la terapia antituberculosa y la administración de corticoide como adyuvante reduce la morbimortalidad. Ante un deterioro del estado neurológico en un paciente con meningitis tuberculosa, se deberá descartar la presencia de vasculitis asociada.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Helbok R, Broessner G, Pfausler B, Schmutzhard E. Chronic meningitis. *J Neurol*. 2009 Feb;256(2):168-75.
2. Thwaites GE, Chau TT, Stepniewska K, Phu NH, Chuong LV, Sinh DX, et al. Diagnosis of adult tuberculous meningitis by use of clinical and laboratory features. *Lancet*. 2002 Oct 26;360(9342):1287-92.

# HIGH FRUCTOSE DIET PRODUCE SUBCLINICAL FAT DEPOSITION AND ALTERATIONS OF LIPID PROFILE IN RAT LIVER.

*María Martin Grau.*

**INTRODUCCIÓN.** Diet and nutrition greatly influences in cellular metabolism. Consumption of sugars such as fructose has been linked with the appearance of several diseases as insulin resistance, inflammation, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and metabolic syndrome (MS). As previously described, fructose activates different metabolic pathways, including lipid biosynthesis. Thus, the objective of this study was to analyze the metabolic profile and the fat storage in hepatocytes of rats treated with a high-fructose diet.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Male Wistar rats n=8 (4 weeks old) randomly divided into two groups were fed normally (CTL group) and with a high fructose diet (H FrD group) during 16 weeks. At the age of 20 weeks, animals were sacrificed. Livers were removed. A fragment of the liver was analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) using the high-resolution magic angle spinning (HR-MAS). Another part of the liver was fixed in formalin and embedded in paraffin. Sections of liver were stained with hematoxylin and eosin and analyzed using Image J. Experimental results were analyzed for their significance (t – test Student). Significance was established at the 95% confidence level ( $p < 0.05$ ). Pearson correlations were obtained with MetaboAnalyst.

**RESULTADOS.** High fructose diet does not develop overweight in young rats. Even if the weight remains the same, more visibly fat appears in the liver. High fructose diet produces a change in liver metabolic profile of rats. Histology allows us to quantify the increase in fat storage. High-fructose diet produces an increase in hepatic triglycerides but a decrease in liver mobile lipids in young rats.

**DISCUSIÓN / CONCLUSIONES.** Metabolomics is a powerful tool for determining subclinical liver damage. We demonstrate that high fructose diet increase hepatic intracelular fat and alter the liver lipid profile in the absence of clinical symptoms in young rats. These results may be specially relevant for monitoring health status in apparently healthy youngsters consuming large amounts of sugar.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Martin Kussmann and Peter J. Van Bladeren. The extended nutrigenomics – understanding the interplay between the genomes of food, gut microbes and human host. *Frontiers in genetics, Nutrigenomics*. 2011; 2.
2. Carolin Lackner et al. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: The value of keratin

# ESTUDIO OBSERVACIONAL RETROSPECTIVO DEL COEFICIENTE DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS CRÓNICAS TRATADAS CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP).

*Jesus Rebull Bramón.*

**INTRODUCCIÓN.** Las heridas crónicas (lenta curación) con comorbilidades asociadas aumentan en los países desarrollados. La prevalencia e incidencia de las úlceras se triplica en mayores de 70 años. Únicamente curan un 50-60% de las heridas, necesitándose mejorar los estudios de efectividad de las terapias para heridas crónicas. Resultados recientes en nuestro grupo (TR2Lab) apoyan otros estudios publicados que evidencian que la terapia con plasma rico en plaquetas (PRP) puede reducir el tiempo de curación de las heridas crónicas (1,2). El PRP contiene factores de crecimiento que inciden en las distintas fases de la cicatrización. La terapia con PRP es una práctica clínica habitual en la Unidad Clínica de Heridas (UCH) del Hospital Universitario de la Santa Creu de Vic (HUSC), vinculada al TR2Lab. Varios estudios han analizado el efecto del PRP en la curación completa de heridas. Sin embargo, analizar el coeficiente de cicatrización de las heridas podría tener valor predictivo de la evolución de la herida durante el tratamiento.

**MATERIALES Y MÉTODOS.** Estudio observacional retrospectivo del coeficiente de cicatrización de las heridas crónicas tratadas en la UCH del HUSC. Se incorporaron al estudio todas heridas que tenían un registro clínico de un mínimo de 3 medidas del área de la lesión. Variables recogidas: etiología de la herida, sociodemográficas (edad y género), área de la herida y terapia con PRP (SI/NO). El coeficiente de cicatrización (% cicatrización/día) se calculó mediante la determinación del área de las heridas, la conversión de la misma a porcentaje y posterior ajuste mediante regresión exponencial de la ecuación propuesta por Jerčinović (3). Se estudió la relación entre el coeficiente de cicatrización y la terapia PRP (SI/NO). En las heridas tratadas con PRP se estudió la relación entre el coeficiente de cicatrización y, la etiología y las variables sociodemográficas. Se utilizaron los test estadísticos no paramétricos para datos no aparejados de Mann-Whitney-Wilcoxon.

**RESULTADOS.** Un total de 69 heridas registradas cumplieron el criterio de inclusión al estudio con un buen ajuste al modelo de cicatrización ( $R^2 \geq 0.8$ ). Un 58.6% de las heridas eran de mujeres (edad media 78.9 años). Las heridas tratadas con PRP (N =27) mostraron una ratio promedio de cicatrización (3.49%/día) significativamente más rápida que las heridas no tratadas con PRP (N=42, 1.45%/día) ( $p = 2.75e-05$ ). Entre las heridas tratadas con PRP, las de origen venoso mostraron un porcentaje de cicatrización de 4.6%/día respecto a 1.3%/día obtenido en las heridas que no recibieron dicho tratamiento, una diferencia significativamente superior. La terapia con PRP mostró una mayor aceleración del proceso de cicatrización en las heridas de mujeres ( $p=9.53e-07$ ), no observándose diferencias estadísticamente significativas en el caso de los hombres ( $p=0.214$ ). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la ratio de

cicatrización con el uso de la terapia con PRP con independencia de la edad de los pacientes: pacientes <70 años, N=48, p= 0.04; pacientes >70 años, p=2.1e-04.

**DISCUSIÓN/CONCLUSIONES.** Nuestro estudio aporta nuevas evidencias de la eficiencia de la terapia con PRP para el tratamiento de heridas crónicas, demostrando que la terapia con PRP mejora la velocidad de cicatrización de las heridas de los pacientes con independencia de la edad. Se ha demostrado que las heridas de origen venoso y las heridas de las mujeres son las que principalmente pueden beneficiarse de la terapia con PRP. Además, nuestro estudio corrobora que tanto el ajuste de una ecuación exponencial a las mediciones como la determinación del coeficiente de cicatrización podría ayudar a la toma de decisiones clínicas pues este parámetro podría usarse como variable predictiva de la evolución de la herida durante el tratamiento y del día de cicatrización completa o como variable para comparar la efectividad de una terapia entre distintas etiologías o distintas terapias en pacientes con heridas de la misma etiología.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Martínez-Zapata MJ, et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev.*2016.25;(5):CD006899.
- (2) Otero-Viñas M, et al. Autologous Platelet-Rich Plasma is a safe and efficient method to promote wound healing in a clinical wound unit. *Journal of Wound Care-WUWHS.*2016.Abstract Book.pp.187. <http://flickread.com/edition/html/57f3b1502948e#1>.
- (3) Jerčinović A, et al. Low Frequency Pulsed Current and Pressure Ulcer Healing. *IEEE Trans. Rehabil. Eng.*1994; Vol. 2(4): 225-233.



# EFECTO NEUROPROTECTOR Y ANTIINFLAMATORIO DE UN ÁCIDO GRASO INSATURADO EN MODELOS IN VITRO E IN VIVO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

*Jesus Alarcón Gil.*

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, la enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, después de la enfermedad de Alzheimer. A pesar de su gran relevancia, hoy en día no existen tratamientos que frenen su desarrollo, por lo que necesitamos encontrar compuestos neuroprotectores y antiinflamatorios eficaces contra ella. Por ello, en este trabajo hemos estudiado el efecto de un ácido graso insaturado (AGI; no damos su nombre por estar en proceso de patente) como tratamiento neuroprotector y antiinflamatorio en modelos in vitro e in vivo de Parkinson, así como su mecanismo de acción en un modelo in vitro.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los métodos llevados a cabo en este estudio incluyen tanto técnicas in vitro como in vivo. En el primer caso, se ha realizado el mantenimiento de los cultivos celulares de la línea celular dopaminérgica humana SH-SY5Y, los distintos tratamientos de los cultivos celulares, ensayos de viabilidad con MTT, y tinciones inmunocitoquímicas (ICQ). En cuanto a la experimentación in vivo, se han realizado análisis en ratones C57BL/6, procesamiento de los tejidos, y tinciones inmunohistoquímicas. Los test estadísticos realizados para los resultados obtenidos son: ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni y regresión no lineal.

## RESULTADOS

En primer lugar, en cuanto a la cinética y el efecto neuroprotector de AGI en el modelo de Parkinson in vitro de 6-OHDA en células SH-SY5Y, se ha comprobado que AGI es capaz de revertir en un 50% la muerte provocada por la 6-OHDA en estas células en una concentración desde 15  $\mu$ M a 35  $\mu$ M con una preincubación de AGI de 24 horas, mediante un ensayo con MTT. Estos resultados se comprobaron gracias a una inmunocitoquímica en la que se marcó caspasa-3 activa, observando una disminución considerable de la presencia de ésta en el grupo tratado con 6-OHDA y AGI respecto al tratado solo con 6-OHDA.

En lo que respecta al mecanismo de acción de AGI para ejercer el efecto anteriormente observado, se usaron la 3-metiladenina (3-MA; inhibidor de la formación del autofagosoma) y el PF-06424439 (inhibidor de la DGAT2) para comprobar si la autofagia y la génesis de gotas lipídicas intracelulares estaban involucrados en su mecanismo de acción. Así, tanto en el grupo tratado con 6-OHDA, AGI y 3-MA como en el grupo tratado con 6-OHDA, AGI y PF-06424439

se pudo observar cómo se anulaba el efecto neuroprotector que ejercía AGI respecto al grupo tratado con 6-OHDA y AGI, en ambos casos mediante un ensayo con MTT.

Finalmente, se realizaron experimentos para comprobar el efecto neuroprotector y antiinflamatorio de AGI en un modelo in vivo hemiparkinsoniano en ratones C57BL/6 inyectados con 6-OHDA. De este modo, se realizaron diferentes tinciones inmunohistoquímicas, tinción de Fluoro-Jade B y tinción TUNEL mediante las cuales se pudo comprobar, también in vivo, el efecto neuroprotector y antiinflamatorio de AGI.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

En este estudio hemos comprobado el efecto neuroprotector y antiinflamatorio, hasta ahora desconocido, de este ácido graso, tanto en el modelo in vitro como en el modelo in vivo de enfermedad de Parkinson, además de obtener claros indicios de su mecanismo de acción en el modelo in vitro. Este descubrimiento podría ser fundamental para el futuro desarrollo de este compuesto como un tratamiento eficaz contra el progreso de la enfermedad. Además, las observaciones sobre su mecanismo de acción aquí demostradas serían de gran interés citológico y bioquímico, debido a que es un claro ejemplo de la posible importancia de la génesis de gotas lipídicas como efecto neuroprotector, así como la posibilidad de que esté implicada la lipofagia en este proceso. Por ello, aparte del claro resultado práctico que podrían tener estos resultados, también abre la puerta al estudio de las gotas lipídicas, e incluso la lipofagia, como proceso neuroprotector.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Bailey AP, Koster G, Guillermier C, Hirst EM, MacRae JI, Lechene CP, et al. Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of *Drosophila*. *Cell* 2015;163(2):340-353.

Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease* 2013;3(4):461-491.

# **EFFECTOS DEL CONSUMO DE FRUCTOSA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y EL METABOLISMO LIPÍDICO DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN.** *María Iribarren Astarloa*

*María Iribarren Astarloa*

## **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

A lo largo de las últimas décadas se ha producido un aumento considerable en el consumo de bebidas edulcoradas con fructosa. Éste ha podido relacionarse en numerosos estudios con el incremento observado en la incidencia de enfermedades metabólicas, como pueden ser la obesidad, la diabetes tipo 2 o las enfermedades cardiovasculares (ECV). Aunque a día de hoy el consumo de este tipo de azúcar no está contraindicado para las mujeres durante el embarazo, algunas investigaciones apuntan a que la exposición de la descendencia a la fructosa durante su época fetal, puede suponer una serie de efectos negativos a largo plazo en su vida adulta. Para explicar este tipo de situaciones, se utiliza el concepto de programación fetal, según el cual la salud materna, su nutrición y otros factores ambientales durante la gestación son fundamentales para el desarrollo del embrión tras el nacimiento y en su vida adulta.

Debido a la implicación que tienen los triglicéridos en las enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico, hemos querido comprobar si la ingesta de fructosa de hembras adultas cuyas madres habían consumido fructosa o glucosa durante la gestación, afecta a los niveles plasmáticos de triglicéridos o a su concentración en el tejido adiposo marrón, así como los mecanismos moleculares implicados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Ratas gestantes Sprague-Dawley alimentadas con comida estándar fueron divididas en 3 grupos experimentales: control, fructosa y glucosa. El grupo control siguió con alimentación estándar acompañada de agua, mientras que los grupos fructosa y glucosa tomaron agua de bebida suplementada con un 10% (p/v) de fructosa o glucosa, respectivamente, durante toda la gestación. Una vez nacidas las crías, ellas y sus madres tomaron dieta estándar y agua sin aditivos. El día 21 tras el parto se procedió al destete de las crías y a la separación por sexos. El día 240 de vida, a las hembras descendientes de estos 3 grupos se las sometió a una dieta con agua suplementada con 10% de fructosa hasta el día 261, independientemente del grupo de madres del que procedieran. Se incluyó además un grupo control procedente de madres control, que bebió agua sin aditivo. El día 261 se sacrificó a las hembras, se extrajeron el plasma y el tejido adiposo marrón que fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

## RESULTADOS

La exposición a fructosa en la gestación, indujo una respuesta diferente a la ingesta de fructosa en la descendencia hembra en la edad adulta en cuanto a expresión génica y parámetros bioquímicos. Los triglicéridos acumulados en el tejido adiposo marrón experimentaron un aumento en los grupos tratados (C/F, F/F y G/F) con respecto al grupo control (C/C), de la misma manera que lo hicieron un grupo de genes que estimulaban la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos (LXR $\alpha$ ) y la funcionalidad y actividad termogénica del tejido (UCP-1 y FGF21).

La expresión de diversos genes diana de PPAR $\gamma$ , encargado de estimular el almacenamiento de grasas en el tejido, también se vio aumentada en los grupos tratados, salvo en el caso del grupo tratado F/F. En este grupo, F/F, los niveles de ácidos grasos y triglicéridos en plasma se vieron aumentados debido a esa falta de activación de los genes responsables de acumular éstos en el tejido.

## CONCLUSIONES

En definitiva, los resultados obtenidos demuestran cómo el metabolismo de ácidos grasos y triglicéridos está influenciado por la nutrición materna durante la gestación y por la re-exposición a fructosa líquida en la edad adulta de la propia descendencia.

## BIBLIOGRAFÍA

Tappy L, Lê KA. Health Effects of Fructose and Fructose-Containing Caloric Sweeteners: Where Do We Stand 10 Years After the Initial Wistle Blowings? *Curr Diab Rep.* 2015; 15(54): p. 1-12.

Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty disease. *J. Nutr. Biochem.* 2012; 3(23): p. 203-208.

Rodríguez L, Panadero MI, Roglans N, Otero P, Álvarez-Millán JJ, Laguna JC, et al. Fructose during pregnancy affects maternal and fetal leptin signaling. *J Nutri Biochem* 2013; 24(10): p.1709-1716.

Rodríguez L, Panadero MI, Rodrigo S, Roglans N, Otero P, et al. Liquid fructose in pregnancy exacerbates fructose-induced dyslipidemia in adult female offspring. *J Nutr Biochem* 2016; 32: p. 115-122.

# REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA ENZIMA RIBONUCLEÓTIDO REDUCTASA EN DEFICIENCIA DE HIERRO EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

*Cristina Ros Carrero.*

## INTRODUCCIÓN

El hierro es un micronutriente esencial para todos los organismos eucariotas debido a que participa en muchos procesos biológicos como la replicación o reparación del DNA. La ribonucleótido reductasa (RNR) es un enzima esencial dependiente de hierro que cataliza el paso limitante en la síntesis de los desoxirribonucleótidos (dNTPs). El mantenimiento de una concentración adecuada de dNTPs es esencial para asegurar la integridad genómica en la célula. Esto explica que RNR se encuentre regulada por diversos mecanismos. No obstante, poco se sabe acerca de su regulación en deficiencia de hierro. En este trabajo se plantea estudiar los mecanismos de regulación de la subunidad catalítica Rnr1 en escasez de hierro utilizando como organismo modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas pertenecen al fondo genético silvestre BY4741 o W303/CRY1. El medio de cultivo utilizado es SC y la deficiencia de hierro se crea al añadir al medio el quelante de hierro BPS (sulfato de bazofenantrolina). El estudio de la actividad transcripcional se realizó con ensayos  $\beta$ -galactosidasa. Para ello, se llevaron a cabo construcciones plasmídicas de los promotores de los genes analizados fusionados al gen reportero lacZ. El nivel de mRNA se determinó por RT-qPCR. Se ha utilizado el test estadístico t-Student para la evaluación de la significatividad en los ensayos  $\beta$ -galactosidasa y niveles de mRNA.

## RESULTADOS

En este estudio se demuestra la inducción transcripcional de RNR1 en deficiencia de hierro mediada por los factores de transcripción Aft1 e Ixr1. Por un lado, se sugiere una regulación directa de Aft1 uniéndose a los elementos de respuesta al hierro (FeRE) sobre el promotor de RNR1. Por otro lado, se ha observado una inducción de IXR1 en escasez de hierro. Se demuestra que los FeRE detectados en su promotor contribuyen a su activación transcripcional en estas condiciones. Por último, se ha visto que el promotor de RNR1 regula su inducción en respuesta a daños en el DNA.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Los mecanismos de regulación de RNR por estrés genotóxico y durante el ciclo celular están bien estudiados<sup>1</sup>. En este trabajo se presenta un posible mecanismo que utiliza *S. cerevisiae*

para optimizar la función de RNR1, la subunidad catalítica, a lo largo de la deficiencia de hierro, que constituye uno de los desórdenes nutricionales más abundantes a nivel mundial. Se sabía que *Ixr1* mantiene la expresión de RNR1 a nivel basal<sup>2</sup>. Aquí hemos demostrado que *Ixr1* también participa en la inducción de RNR1 en deficiencia de hierro. Además, se muestra que la expresión de *IXR1* se induce en estas condiciones, sugiriéndose también una regulación por Aft1 mediante la unión a los FeRE en su promotor. Asimismo, los resultados permiten plantear dos nuevas dianas (*RNR1* e *IXR1*) del regulón de hierro, activado por Aft1, que presentan FeREs con variaciones respecto a la secuencia consenso descrita<sup>3</sup>.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Sanvisens, N., De Llanos, R., & Puig, S. Function and regulation of yeast ribonucleotide reductase: cell cycle, genotoxic stress, and iron bioavailability. *Biomedical Journal*. 2013; 36(2), 51-51
- 2 Tsaponina, O., Barsoum, E., Åström, S. U., & Chabes, A. *Ixr1* is required for the expression of the ribonucleotide reductase Rnr1 and maintenance of dNTP pools. *PLoS Genet*. 2011; 7(5), e1002061.
- 3 Rutherford, J. C., Jaron, S., & Winge, D. R. Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(30), 27636-27643.



# LA FRUCTOSA MATERNA AFECTA AL "METABOLISMO DE UN CARBONO" DE LA DESCENDENCIA SEGÚN EL GÉNERO.

Rodrigo Aguirre Lera

## INTRODUCCIÓN

La fructosa es un edulcorante común en la dieta occidental. Este monosacárido no sólo cuenta con un transportador específico, sino que, además, es una fuente no regulada para la lipogénesis. Una ingesta alta de fructosa influye negativamente en parámetros relacionados con enfermedades cardiovasculares (ECV), como la homocisteinemia. Además, se ha observado que el consumo de fructosa durante la gestación afecta a la programación fetal de forma diferente según el género. Entre los mecanismos epigenéticos que producen la programación fetal, se encuentra la metilación del ADN, que sucede como parte del "metabolismo de un carbono". La actividad de las enzimas de este ciclo influye tanto en la epigenética como en la homocisteinemia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se establecieron tres grupos experimentales de ratas que bebieron, durante la gestación, agua sin ningún aditivo, agua con un 10% de fructosa y agua con un 10% de glucosa. Las crías bebieron agua sin aditivos durante toda su vida y, el día 261 de edad, fueron sacrificadas. Se recogió la sangre para determinar los niveles de homocisteína en plasma y se tomaron muestras de hígado para determinar la expresión génica de enzimas del ciclo de un carbono. Para determinar la expresión génica, el RNA fue extraído, convertido a ADNc y cuantificado mediante una PCR a tiempo real, y los datos se analizaron mediante un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA).

## RESULTADOS

La ingesta materna de fructosa durante la gestación produjo, en los machos, una disminución de la expresión génica hepática de BHMT, influyendo negativamente en la formación de metionina, y de MAT1A, evitando un exceso de SAM. En las hembras, la ingesta materna de fructosa durante la gestación incrementó los niveles de homocisteína en plasma, así como la expresión génica hepática de CBS, pero no la de BHMT, que se redujo, lo que indica un mayor uso de la vía de la transulfuración, quizás como un mecanismo para compensar dicha hiperhomocisteinemia.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran cómo el metabolismo de un carbono está influenciado por la nutrición materna durante la gestación, lo que indicaría un riesgo cardiovascular desigual

dependiente del género en la progenie de madres que consumieron fructosa durante la gestación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Yoo S, Ahn H, Park Y. High Dietary Fructose Intake on Cardiovascular Disease Related Parameters in Growing Rats. *Nutrients*. 2016 Dec 26;9(1):11.
2. de la Cuesta M, Fauste E, Rodrigo S, Rodríguez L, Panadero MI, Álvarez-Millán JJ, et al. Nutrigenomics and fetal programming: maternal fructose affects the cholesterolemia of progeny in a gender-dependent manner. In: *European Atherosclerosis Society, 85th Congress*. Prague, Czech Republic; 2017.
3. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem*. 2012 Aug 1;23(8):853–9.
4. Christensen KE, Wu Q, Wang X, Deng L, Caudill MA, Rozen R. Steatosis in mice is associated with gender, folate intake, and expression of genes of one-carbon metabolism. *J Nutr*. 2010 Oct 1;140(10):1736–41.

# **EFFECTO DEL CONSUMO DE AZÚCARES DURANTE LA GESTACIÓN EN EL METABOLISMO LIPÍDICO DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN DE LA DESCENDENCIA**

*Natalia Martínez Vizcaíno*

## **INTRODUCCIÓN**

El consumo de azúcares ha ido aumentando considerablemente en los últimos años, especialmente debido a las bebidas azucaradas, de la misma manera que lo han hecho patologías como obesidad, diabetes o síndrome metabólico. Ambos fenómenos parecen estar asociados, y el papel de la fructosa parece ser uno de los más relevantes debido a su metabolismo. Se cree que la programación fetal es un factor clave en los efectos de la ingesta materna de fructosa, determinando la dieta de la madre durante la gestación el desarrollo de síndrome metabólico y sus patologías asociadas en su descendencia. Ya que últimamente se ha estado investigando sobre el potencial terapéutico del tejido adiposo marrón en la obesidad y enfermedades relacionadas, quisimos averiguar si el consumo de glucosa o de fructosa durante la gestación afectaba a la cantidad de triglicéridos acumulada en este tejido de la descendencia o a la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

A ratas gestantes se les administró agua sin aditivos o agua con 10% de fructosa o glucosa durante la gestación. Cuando las crías nacieron, llevaron una dieta normal hasta el día 261 de vida en el que fueron sacrificadas para extraer su tejido adiposo marrón. La cantidad de triglicéridos fue medida mediante un ensayo colorimétrico. En el caso de la expresión génica, el RNA fue extraído, convertido a ADNc y cuantificado mediante una PCR a tiempo real. Los datos fueron analizados mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA).

## **RESULTADOS**

La ingesta materna de azúcares causó un aumento en la cantidad de triglicéridos almacenados en el tejido, estadísticamente significativo en el grupo glucosa, lo que se podría relacionar con la expresión obtenida en algunos de los genes estudiados. Tanto en el grupo glucosa como en el fructosa, se apreció una expresión mayor en los genes LXR $\alpha$  (factor de transcripción lipogénico), LPL (proporciona ácidos grasos al tejido), PEPCCK (proporciona precursores para formar triglicéridos) y UCP-1 (proteína desacoplante). En el caso de CD36 (media la entrada de ácidos grasos), esta tendencia sólo se dio en el grupo fructosa y en el de PGC1- $\alpha$  (que también proporciona precursores del glicerol), en el grupo glucosa.

## **CONCLUSIONES / DISCUSIÓN**

En conclusión, el consumo de fructosa y glucosa durante la gestación induce una mayor acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo marrón de la descendencia hembra adulta. Esto coincide con la expresión de ciertos genes lipogénicos o encargados de proporcionar precursores para la formación de triglicéridos. Además, esta expresión inducida cambia según la ingesta materna haya sido de fructosa o glucosa.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Tappy L, Lê K-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010; 90(1):23–46.

Rodríguez L, Panadero MI, Roglans N, Otero P, Rodrigo S, Álvarez-Millán JJ, et al. Fructose only in pregnancy provokes hyperinsulinemia, hypoadiponectinemia, and impaired insulin signaling in adult male, but not female, progeny. *Eur J Nutr.* 2016; 55(2):665–74.

Calderon-Dominguez M, Mir JF, Fucho R, Weber M, Serra D, Herrero L. Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte.* 2016; 5(2):98–118

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el estudio del metabolismo intracelular de la riboflavina ha demostrado la importancia de esta vitamina en el correcto funcionamiento celular. Gracias a la investigación, se ha descubierto que alteraciones en el transporte o en el entramado metabólico de la riboflavina se relacionan con enfermedades de extrema gravedad y cuyo pronóstico era considerado nefasto. Afortunadamente, también se ha descubierto que un simple tratamiento a base de suplementación de esta vitamina resuelve e incluso revierte la sintomatología de estos trastornos, devolviendo la calidad de vida a los pacientes afectados. En este trabajo se resumen, para conocimiento del público general, dos de estos síndromes y las alteraciones que los provocan.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la revisión bibliográfica, se emplearon los términos [riboflavin], [riboflavin deficiency], [Brown-Vialletto-Laere syndrome], [MADD] para la búsqueda de artículos en la base de MedLine/PubMed. También en esta misma base se realizó búsqueda por autor, con los nombres de [Maria Barile] y [Rikke Olsen].

Se ha incluido información de todos los artículos encontrados relacionados con la riboflavina. Éstos fueron revisiones bibliográficas o artículos sobre experimentos realizados por los grupos de trabajo. El mayor inconveniente en incluir artículos ha residido en su precio, pues solo han sido incluidos aquellos a los que la Universidad de Valencia suministraba acceso gratuito.

## RESULTADOS

Al ser una revisión bibliográfica, los resultados obtenidos son un mero resumen de las ideas de los artículos consultados.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El rol de la riboflavina en el metabolismo celular va cobrando fuerza a medida que se van descubriendo sus funciones principales, la mayoría de ellas relacionadas con el mantenimiento del estado redox celular, la apoptosis o el metabolismo energético. Sin embargo, no se sabe con exactitud cómo puede intervenir en todos estos procesos. Lo que sí que parece conocerse por el momento es su mecanismo de transporte desde la luz intestinal hasta la célula (mediante los Riboflavin Transporters, RFVT) y las reacciones iniciales intracelulares en las que interviene, para convertirse en FMN y FAD (gracias a las enzimas RKF y FADS). Se sabe también que FAD es un componente necesario para el correcto funcionamiento de varias proteínas, llamadas flavoproteínas, que intervienen en gran cantidad de procesos celulares.

Es por ello que alteraciones en los RFVTs o en la enzima FADS ocasionan graves problemas metabólicos, como el síndrome de Brown-Vialetto-Laere o una entidad conocida como MADD (Multiple Acyl-CoA Dehidrogenase Deficiency), respectivamente. Ambos son cuadros extremadamente poco frecuentes, pero no por ello de menor interés, ya que una correcta suplementación de riboflavina permite controlar e incluso revertir los síntomas, mejorar la calidad de vida y aumentar la supervivencia de los pacientes afectados.

En conclusión, la riboflavina resulta extremadamente interesante en la medicina del siglo XXI no sólo por los misterios que aún se desconocen sobre su metabolismo y sobre su auténtica relevancia a nivel intracelular, sino también porque puede guardar el secreto de la cura de muchas enfermedades. La riboflavina es el ejemplo perfecto para demostrar que la investigación biomédica es esencial, porque, gracias a ella, se obtienen las respuestas que salvan vidas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Barile M, Giancaspero T, Leone P, Gallucio M, Indiveri C. Riboflavin transport and metabolism in humans. *J Inherit Metab Dis* (2016) 39:545-557. Publicado online el 6 Jun 2016.
- [2] Olsen RKJ, Konarikova E, Giancaspero TA, Mosegaard S, Boczonadi V, Matakovic L et al. Riboflavin-Responsive and -Non-responsive Mutations in FAD Synthase Cause Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase and Combined Respiratory-Chain Deficiency. *Am J Hum Genet.* 2016 Jun 2;98(6): 1130-1145. Citado en PubMed PMID: 27259049.
- [3] Bosch AM, Stroek K, Abeling NG, Waterham HR, Ijlst L, Wanders RJ. The Brown-Vialetto-Van Laere and Fazio Londe syndrome revisited: natural history, genetics, treatment and future perspectives. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Oct 29;7:83. Citado en PubMed PMID: 23107375
- [4] Jaeger B, Bosch AM. Clinical presentation and outcome of riboflavin transporter deficiency: mini review after five years of experience. *J Inherit Metab Dis.* 2016 Jul;39(4):559-64. Citado en PubMed PMID: 26973221.



# SEARCH FOR AXON GUIDANCE MOLECULES INVOLVED IN THE MIGRATION OF THE INTERPEDUNCULAR NUCLEUS IN MOUSE DEVELOPING BRAIN

*Isabel María García Guillén*

## INTRODUCCIÓN

During brain development, postmitotic neurons follow radial or tangential migrations to their final destination in the brain before undergoing its final differentiation and establishing brain connections. We have previously demonstrated that the interpeduncular nucleus (IP) is formed by various neuronal populations identified by the expression of specific transcription factors (Otp, Otx2, Pax7 or Nkx6.1). These neurons follow independent tangential migratory pathways to reach its final destination in the IP. However, the molecular mechanism regulating these migratory processes remains unknown. Our hypothesis is that axonal guidance molecules may be involved in this phenomenon in mouse developing brain. We have first determined if the neuronal migratory populations identified in chick are also present in mouse. Then, our aim was to find out if some of the axonal guidance molecules, already identified in mouse, are expressed during development in the territory where the IP nucleus migration takes place. Finally, we have analyzed the presence of the receptors of these axonal guidance molecules, in the migratory populations to the IP nucleus.

## MATERIAL Y MÉTODOS

For our purposes, we have performed in situ hybridization (ISH) in sagittal and transverse sections of mouse embryos at different developmental stages.

## RESULTADOS

Our study indicates that in the developing mouse embryo there are also four migratory populations (identified by the expression of Otp, Otx2, Pax7 or Nkx6.1) that undergo tangential migration to the IP nucleus. Moreover, we have found several axonal guide molecules expressed in the territory where the migration process occurs: Netrin1 and Slit1 among others. Finally, we have demonstrated the presence of DCC (receptor of Netrin1), ROBO (receptor of Slit1) and other receptors in some of these migratory populations to the IP.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

According to our results, we have demonstrated the existence of 4 neuronal populations expressing Otp, Otx2, Pax7 or Nkx6.1 that follow independent dorso-ventral tangential migratory pathways to form the mouse IP nucleus, similarly to the developing chick IP nucleus. Furthermore, we have observed the expression of several axonal guide molecules, like Netrin1 and Slit1, in the migration territory of the IP populations. Finally, some of these migratory neurons also express DCC and ROBO, the corresponding receptors of the axonal guidance molecules identified: Netrin1 and Slit1, respectively. In conclusion, our work demonstrates that

mouse and chick IP nuclei present and share at least 4 neuronal populations forming the IP nucleus, and here we propose that their mechanism of migration is maybe mediated by the guidance molecules Netrin 1 and Slit 1.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Lorente-Cánovas B, Marín F, Corral-San Miguel R, Hidalgo-Sánchez M, Ferrán JL, Puelles L and Aroca P. Multiple origins, migratory paths and molecular profiles of cells populating the avian interpeduncular nucleus. *Dev. Biol.* 361, 12-26 (2012).

Kim M, Fontelonga T, Roesener AP, Lee H, Gurung S, Mendonca PR, Mastick GS. Motor neuron cell bodies are actively positioned by Slit/Robo repulsion and Netrin/DCC attraction. *Dev. Biol.* 399, 68-79 (2015)

# PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES: MIGRACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS.

*Christian Miquel Sánchez López*

## INTRODUCCIÓN

Las vesículas extracelulares (VEs) son pequeñas vesículas producidas y secretadas por la mayoría de las células, con un diámetro comprendido entre los 30 y 300 nm. Se han encontrado en prácticamente todos los fluidos corporales, sugiriéndose así su participación en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, entre los que se incluye la inmunomodulación, y que abre las puertas a su uso en el diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades.

La metástasis es un proceso que engloba múltiples etapas, entre las que se incluyen la supervivencia de la célula tumoral en la circulación sanguínea, además de la colonización y crecimiento en el tejido hospedador. Teniendo en cuenta la capacidad de estas vesículas extracelulares para promover y regular muchos procesos biológicos, es probable que puedan, a su vez, influenciar la capacidad de las células tumorales de producir metástasis. En esta revisión trataremos de enfocarnos en el papel inmunomodulador de las vesículas extracelulares en la migración y el mantenimiento de las células cancerosas en el órgano hospedador.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Búsqueda bibliográfica en PubMed – NCBI y RefWorks de literatura presente desde el año 2010, revisando la bibliografía existente sobre la migración de células cancerosas y su asentamiento en el órgano diana, y seleccionando aquellos artículos enfocados en las vesículas extracelulares.

En cuanto a los métodos utilizados en las distintas investigaciones, eran diversos para la obtención de sus respectivos resultados, pero sí eran más homogéneos en sus métodos de caracterización y obtención de las vesículas extracelulares, incluyendo:

- Ultracentrifugación diferencial.
- Análisis de rastreo de nanopatrículas (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)).
- TEM (microscopía electrónica de transmisión).
- inmunoblotting
- Cromatografía de exclusión molecular.
- Marcaje de exosomas.

## RESULTADOS

Migración de células cancerosas:

- Las plaquetas acompañan a las células cancerosas y ayudan a su supervivencia en la migración a su tejido diana. Exosomas derivados de plaquetas contienen P-selectina y glicoproteínas IIb y IIIa.
- Exosomas derivados de células tumorales en estado de hipoxia contienen TGF- $\beta$ 1, que favorece el decrecimiento de la expresión del receptor NKG2D, activador de células NK

En el tejido diana:

- Vesículas extracelulares derivadas de tumores favorecen que exista un ambiente inmunosupresivo, afectando tanto a la respuesta celular como a la humoral:
  - Favorecen, por un lado, que exista una disminución de linfocitos T CD8+, por activación de apoptosis (Fas/FasL). Por otro, incentivan la proliferación de linfocitos T CD4+ y su conversión a células T reguladoras (expresión de IL-10, TGF- $\beta$ 1, CTLA-4 y granzima B, que reducen la actividad de células NK). Además de encontrarse in vitro vesículas extracelulares de células tumorales conteniendo miRNAs inmunosupresores (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-891a, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-20a-5p, and hsa-miR-1908).
  - Vesículas extracelulares que favorecen la expresión de Her2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2) y EpCAM (Molécula de adhesión de células epiteliales) en cáncer de mama, que pueden unirse y neutralizar anticuerpos. Exosomas de linfoma de linfocitos contienen CD20, reduciendo el efecto terapéutico del Rituximab (anti-CD20).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Las vesículas extracelulares están actualmente siendo el centro de atención de muchas investigaciones, debido a su participación en numerosos procesos (tanto fisiológicos como patológicos), a su potencial rol como biomarcadores y a su posible uso terapéutico y como transportadores de fármacos. Teniendo en cuenta, por otro lado, la elevada incidencia del cáncer en la actualidad, unida a la complejidad que acarrea el estudio de los múltiples factores asociados al inicio y desarrollo del mismo, hace que sea de elevada utilidad el estudio de la comunicación intercelular relacionada con la migración y el asentamiento de las células tumorales en sus tejidos diana, lo que podría abrir las puertas a la investigación de nuevas dianas terapéuticas y uso de fármacos para su tratamiento.

De esta revisión se puede concluir que las vesículas extracelulares están implicadas en procesos, tanto de inmunomodulación del sistema inmunitario (células NK, linfocitos T CD4+ y CD8+), como de protección de las células cancerosas en la migración en el torrente sanguíneo (interacción con plaquetas y con células endoteliales). Además, pueden interferir con el efecto

terapéutico de algunos fármacos (Rituximab) y contener moléculas que favorezcan la unión y neutralización de anticuerpos (modulación de la respuesta humoral).

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Berchem G, Noman MZ, Bosseler M, Baconnais S, Le E, Nanbakhsh A, et al. Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF-  $\beta$  and miR23a transfer. *Oncoimmunology*. 2016; 5:1–13.
2. Whiteside TL. Exosomes carrying immunoinhibitory proteins and their role in cancer. *Clinical and Experimental Immunology*. 2017; 189:259–67.
3. Nyman TA, Laitinen S, Aatonen MT, Tiina O, Siljander PR. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. 2014; 1:1–15.
4. Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, Skvortsova II. The role of exosomes in cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 2017; 44:170-181.

# COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA PATOLOGÍA DE LA PROTEÍNA TAU POSITIVA EN EL GYRUS AMBIENS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y SUJETOS CONTROL.

*Adriana Rodado Añó*

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a millones de personas en el mundo. La característica esencial es la muerte neuronal que provoca una gran atrofia cortical, la cual se desarrolla en etapas. El estudio anatómico de los cerebros de pacientes señala esta gradación que se conoce como estadios de Braak, existiendo desde un grado I hasta el grado VI. El grado I es el de menor significación patológica, y se da en una región del cerebro conocida como Formación del Hipocampo (FH).

La FH se compone de la corteza entorrinal (CE) y del hipocampo (H). La indemnidad de la FH es necesaria para la memoria, uno de los primeros síntomas de la EA. El gyrus ambiens (GA) es una estructura macroscópica que coincide plenamente con una de las subdivisiones de la CE (campo EMI, Insausti y cols., 1985). Dado que la patología de la EA se extiende por la CE, y existe muy poca información acerca de esta parte de la CE, nos planteamos hacer un estudio detallado del GA en enfermos con diversos estadios de la EA y sujetos control. El estudio consiste en la determinación cartográfica de la patología Tau-positiva en ambos grupos y profundizar en la fisiopatología de la EA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se está realizando en cerebros de Archivo del Laboratorio de Neuroanatomía Humana en Albacete. El número de casos es de 6 cerebros de ambos sexos en estadios I-VI, y de 6 cerebros control aproximadamente de la misma edad y sexo. Algunos de estos cerebros fueron fijados por inmersión en formol neutralizado al 10% (8 casos en total) mientras que el resto de los casos fueron perfundidos por vía vascular (carótida interna). En todos los casos se aisló el lóbulo temporal el cual se cortó seriadamente en un micrótopo de deslizamiento acoplado a una unidad de congelación (Microm, Heidelberg), desde el polo temporal hasta 0.5 cm por detrás del esplenio del cuerpo calloso. Se recogieron todos los cortes y se tiñeron a intervalos de 500  $\mu$ m (0.5 mm). Los cortes fueron analizados en sus componentes citoarquitectónicos. Series alternativas cada 2mm fueron elaboradas y teñidas con el anticuerpo AT8 que marca la proteína Tau asociada a la degeneración neurofibrilar.

## RESULTADOS

El estudio está en fase de realización, por lo que los resultados que presentamos son preliminares.



- 1) Determinación macroscópica del Gyrus ambiens: localización, extensión, morfología, relación con los surcos de la parte ventromedial del lóbulo temporal humano
- 2) Identificación y caracterización citoarquitectónica del Gyrus ambiens
- 3) Identificación del Gyrus ambiens en los casos con enfermedad de Alzheimer y comparación con el grupo control.
- 4) Inmuntinción con el anticuerpo AT8 para la demostración de la proteína Tau.
- 5) Cartografía de la distribución de proteína Tau (células positivas) en el Gyrus ambiens
- 6) Comparación de la cartografía entre los grupos control y con enfermedad de Alzheimer

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

El estudio está en proceso de elaboración, y por lo tanto no se pueden proporcionar conclusiones definitivas, aunque de modo general podemos decir que el Gyrus ambiens es una zona relativamente resistente en cuanto a la presencia de neuronas morfológicamente identificables, aunque presentando degeneración neurofibrilar revelada por la positividad de la proteína Tau. Otros objetivos están en fase de realización.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Carlos Delgado-Gonzalez, Jose; Mansilla-Legorburo, Francisco; Florensa-Vila, Jose; Maria Insausti, Ana; Vinuela, Antonio; Tunon-Alvarez, Teresa; Cruz, Marcos; Mohedano-Moriano, Alicia; Insausti, Ricardo; Artacho-Perula, Emilio. Quantitative Measurements in the Human Hippocampus and Related Areas: Correspondence between

Ex-Vivo MRI and Histological Preparations. PLOS ONE. 10 - 6, PUBLIC LIBRARY SCIENCE, 22/06/2015. ISSN1932-6203

Artacho-Perula, Emilio; Insausti, Ricardo. Quantitative estimations of the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. ANALYTICAL AND QUANTITATIVE CYTOLOGY AND HISTOLOGY. 29 - 1, pp. 1 - 16. SCI PRINTERS & PUBL INC, 01/02/2007. ISSN 0884-6812

Insausti R; Marcos P; Arroyo-Jimenez MM; Blaizot X; Martinez-Marcos A. Comparative aspects of the olfactory portion of the entorhinal cortex and its projection to the hippocampus in rodents, nonhuman primates, and the human brain. Brain Research Bulletin. 57, pp. 557 - 560. 01/02/2002.

Insausti R; Amaral DG. The human hippocampal formation. The Human Nervous System. pp. 871 - 912. 3rd. edition. G Paxinos and J Mei, Eds., Academic Press, San Diego, 2011.

# RELACIÓN ENTRE LA DISBIOSIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EL DESARROLLO DE LESIONES ANALES PRECANCEROSAS DURANTE LA INFECCIÓN POR VIH.

*Yolanda López Toboso*

## INTRODUCCIÓN

Los pacientes con VIH muestran una alta prevalencia de infección anal por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo y una incidencia muy elevada de lesiones precancerosas anales como lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (low-risk squamous intraepithelial lesion, LSIL) que incluye el condiloma acuminado y displasia leve, y de alto grado (high-risk squamous intraepithelial lesion, HSIL) que incluye la displasia moderada, severa y el carcinoma in situ. La infección por VIH se asocia también a disbiosis intestinal, con comunidades bacterianas enriquecidas en genes involucrados en vías pro-inflamatorias, que se correlacionan con marcadores de progresión clínica.

El objetivo del estudio es caracterizar la microbiota intestinal asociada al desarrollo de lesiones precancerosas anales (HSIL) en hombres infectados por VIH para identificar biomarcadores bacterianos del desarrollo de HSIL. Para ello, se estudiará la composición de la microbiota fecal y de la mucosa anal por ultrasecuenciación del gen del rRNA 16S en 100 hombres que mantienen sexo con hombres (HSH) y son VIH+ y en 50 HSH VIH- con presencia de infección anal por VPH de alto riesgo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se incluyen pacientes HSH VIH+ y HSH VIH-, ambos con presencia de lesiones anales precancerosas. Se trabaja con muestras de raspados anales y heces, conservadas a -80°C hasta su procesamiento.

Las heces que son recogidas en RNAlater se diluyen 1/2 en tampón PBS y se homogenizan en un vórtex. Tras una centrifugación a 2000 rpm y 4°C durante 5 minutos para eliminar residuos fecales sólidos se recoge el sobrenadante, donde se encuentra la suspensión bacteriana. Los raspados anales han sido recogidos en suero fisiológico y por ello se centrifuga directamente a 4000 rpm y 4°C durante 30 minutos para obtener el pellet celular.

Para la extracción de ácido nucleicos, de ambos tipos de muestras, se siguió el protocolo MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, que se basa en la tecnología de perlas magnéticas. En el caso de las heces se realiza una nueva centrifugación para obtener el pellet. Para romper la pared y membranas celulares, los pellets celulares se tratan con buffer lysis y lisozima y se incuban a 37°C durante 30 minutos. A continuación se añade proteinasa K y se incuban a 65°C por 10

minutos y se desactiva a 95°C durante 10 minutos. Finalmente, se centrifuga y se coge el sobrenadante para continuar el proceso en el robot de extracción.

La cantidad de DNA purificado se midió mediante cuantificación fluorométrica con el Fluorómetro Qubit 2.0. Además, se realizaron electroforesis para las muestras cuantificadas con el objetivo de comprobar que el DNA genómico aparecía en las condiciones adecuadas.

Cabe destacar que se realizó una PCR cuantitativa para las muestras de raspados anales con el fin de poder determinar qué cantidad de DNA bacteriano y humano tenía cada una de las muestras. Por último, se prepararon las muestras para su secuenciación mediante Illumina.

## RESULTADOS

Todavía no se han obtenido resultados de este trabajo ya que la secuenciación de las muestras está en proceso. No obstante, se realizó una investigación previa donde la N era menor y no se incluían controles. Los participantes del estudio previo se clasificaron de acuerdo con la presencia de lesiones histológicas: HSIL, LSIL y normales. Se encontró mayor diversidad en la mucosa rectal que en las heces, lo que indica una composición distinta de la microbiota en la mucosa comparada con heces. Se investigó si bacterias específicas podrían servir como biomarcadores de LSIL.

Los taxones que fueron identificados en el estudio previo como predictivos de LSIL podrían ser relevantes para la patogénesis de VPH. En mucosa, se encontró *Campylobacter* como predictiva de LSIL, sugiriendo que este patógeno podría iniciar la carcinogénesis. *Peptostreptococcus* es un patógeno ligado al cáncer de colon y se encontró enriquecido en pacientes con LSIL. Como predictivo de HSIL se encontraron *Gardnerella* y *Catenibacterium*.

Por otra parte y en consonancia con los hallazgos en mucosa, *Ruminococcus* se encontró en heces como predictor de HSIL. Este taxón está presente en la microbiota saludable, lo que sugiere que su aumento podría ser la respuesta a una perturbación crónica, en este caso la infección por VPH. También se observó un enriquecimiento en heces de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bifidobacterium*.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

En este estudio se observó que los componentes de la microbiota fecal y rectal son capaces de predecir la presencia de lesiones anales precancerosas. Encontraron evidencia de que la disbiosis asociada al VIH puede promover la persistencia y la patogénesis del VPH. Por tanto, se sugiere utilizar estas bacterias como herramientas de diagnóstico para la detección de lesiones anales precancerosas en HSH infectados con VIH.

Se observó una composición distinta de la microbiota en la mucosa comparada con heces. Los taxones bacterianos enriquecidos en pacientes con HSIL y LSIL fueron diferentes, por lo que se calculó la precisión diagnóstica de estos taxones predictivos como biomarcadores bacterianos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses, *Vaccine*. 2012; 305:F55-F70.

Serrano-Villar S, Vázquez-Domínguez E, Pérez-Molina JA, Sainz T, de Benito A, Latorre A, Moya A, Gosalbes MJ, Moreno S. HIV, HPV, and microbiota: partners in crime?, *Research Letter*. 2016; 30:1-5.

Serrano-Villar S, Vázquez-Castellanos JF, Vallejo A, Latorre A, Sainz T, Ferrando-Martínez S, Rojo D, Martínez-Botas J, Del Romero J, Madrid N, Leal M, Mosele JI, Montilva MJ, Barbas C, Ferrer M, Moya A, Moreno S, Gosalbes MJ, Estrada V. The Effects of Prebiotics on Microbial Dysbiosis, Buryrate Production and Immunity in HIV-infected Subjects, *Mucosal Immunol*. 2016; 10:1279-1293.

Vázquez-Castellanos JF, Serrano-Villar S, Latorre A, Artacho A, Ferrús ML, Madrid N, Vallejo A, Sainz T, Martínez-Botas J, Ferrando-Martínez S, Vera M, Dronda F, Leal M, Del Romero J, Moreno S, Estrada V, Gosalbes MJ, Moya A. Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals, *Mucosal Immunol*. 2015; 8:760-772.

# RELATIONSHIP BETWEEN POSTOPERATIVE BLOOD PRESSURE LABILITY AND DELIRIUM IN NEUROSURGICAL PATIENTS.

*Nekane Romero.*

## INTRODUCCIÓN

Postoperative delirium (PD) is one of the most common complications following surgery with a reported incidence ranging from 10-70% depending on the type of surgery. One possible area of intervention to prevent postoperative delirium (PD) is postoperative blood pressure management. However, the relationship between postoperative blood pressure and PD still remains unclear. The goal of this study was to test the hypothesis that postoperative blood fluctuations in blood pressure increased the occurrence in postoperative delirium in patients undergoing neurosurgery.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Study subjects undergoing neurosurgery were enrolled in an ongoing prospective observational study of the pathophysiology of postoperative delirium. Postoperative blood pressure was measured and predefined criteria were used to define hypotension. Delirium was measured by the Confusion Assessment Method on the first two postoperative days.

Fluctuation in a patient's blood pressure was quantified by calculating the variance of the patient's blood pressure record during ICU. Variance is a measure of the data spread. Blood pressure fluctuation was calculated according to the formula  $\text{variance} = \frac{1}{n} \sum (x_i - x_m)^2$ , where  $x_i$  is a patient's blood pressure at a particular time point,  $x_m$  is the mean of the patient's blood pressure, and  $n$  is the number of blood pressure measurements.

Patients were categorized based on whether they developed PD. We analysed continuous data that were normally distributed by Student's t-test and continuous data that were normally distributed by Mann-Whitney analysis. The analysis of normal distribution was performed by the Kolmogorov-Smirnov test. Dichotomous data were compared with the Fisher exact test. We used backwards stepwise multivariate logistic regression by including those univariate variables that differed between patients with and without PD, with a p-value of  $< 0.1$ .

## RESULTADOS

PD was observed in 45 (9.2%) patients. Mechanical ventilation for  $< 48$ h [odds ratio (OR), 3.94; 95% confidence interval (CI) 1.72-9.03], postoperative blood pressure variance (OR, 3.0; 95% CI,

1.29-6.96), prior stroke (OR 2.79; 95% CI 1.12-6.96) and age (per year of age; OR, 1.01; 95% CI 1.01-1.07) were independently associated with PD.

It's the first study that found increased fluctuations in blood pressure in neurosurgical patients to be predictive of PD.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Postoperative fluctuations in blood pressure increased the occurrence of PD in patients undergoing neurosurgery. Maintaining blood pressure at a stable level, based on preoperative values, appears to help preventing PD.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Rudiger A, Begdeda H, Babic D, Krüger B, Seifert B, Schubert M, Spahn DR, Bettex D. Intra-operative events during cardiac surgery are risk factors for the development of delirium in the ICU. *Crit Care* 2016;20:264.
2. Wassenaar A, van den Boogaard M, van Achterberg T, et al. Multinational development and validation of an early prediction model for delirium in ICU patients. *Intensive Care Med* 2015;41:1048-56.

# PATRÓN ESTENOSANTE Y FISTULIZANTE EN LA ENFERMEDAD DE CROHN: PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS Y LA RUTA WNT EN LA FISIOPATOLOGÍA

Juan José Lluch Galcerá

## INTRODUCCIÓN

La fibrosis y el desarrollo de fístulas constituyen una de las principales complicaciones asociadas a la Enfermedad de Crohn (EC). La vía de señalización Wnt se ha relacionado con la fibrogénesis por inducir la activación de fibroblastos y la transición epitelial-mesenquimal (TEM)<sup>1</sup>. El presente trabajo pretende: analizar el patrón de expresión de las distintas moléculas de la ruta Wnt en resecciones quirúrgicas procedentes de pacientes con EC estenosante y/o fistulizante y relacionar la expresión de los ligandos Wnt con el patrón macrofágico y su potencial para generar la TEM.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los pacientes con EC (n=43) fueron divididos de acuerdo con la clasificación de Montreal (edad al diagnóstico, localización y patrón). Se aisló el ARNm de las resecciones de pacientes que presentaban un patrón estenosante (B2, n=26), fistulizante/estenosante (B3, n=17) o de mucosa sana procedente de pacientes con cáncer colorrectal (control, n=25). La expresión de marcadores macrofágicos (CD206, CD86 y CD16), de fibrosis, citocinas proinflamatorias, ligandos Wnt, *cmyc*, *Lgr5* y *DKK1* fue analizada mediante RT-PCR o Citometría de Flujo. El depósito de matriz extracelular se analizó mediante tinción con tricrómico o Sirius Red. Las correlaciones entre las variables fueron analizadas utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (\*p < 0.05). Se analizó la expresión de genes relacionados con la TEM en criptas de pacientes control aisladas y tratadas con Wnt2b durante 7 horas.

## RESULTADOS

Se observó un mayor porcentaje de macrófagos positivos para CD16 (B2: 36.12±5.8%; B3:69.7±24.4) o CD86 (B2: 30.58±10.9%; B3:88.8±18.4) y una mayor expresión de ARNm de IL-1 y IL-6 en el tejido intestinal procedente de las muestras con un patrón B3 comparado con las muestras de los pacientes con un patrón B2. En el grupo de los pacientes con EC se detectó una mayor expresión de ARNm de Vimentina y una menor expresión de E-Cadherina que en el grupo control; en cambio, no se hallaron diferencias en la expresión de estos marcadores entre los pacientes con EC, que mostraron un depósito similar de matriz extracelular independientemente de que tuvieran un comportamiento B2 o B3 (Tabla 1). La expresión de *DKK1*, *cmyc* y *Lgr5* era superior en los pacientes B3. Los pacientes con EC presentaron una sobreexpresión generalizada de ligandos WNT (Wnt2, Wnt3 y Wnt6) con la excepción de Wnt2b, que estaba aumentado en el tejido con patrón B3 pero disminuido en las muestras con patrón B2 (P<0.01, B3 vs B2), en comparación con el grupo control. La expresión de Wnt2b

presenta una correlación positiva y significativa con CD16 ( $r=0.8155$ ,  $P=0.0007^*$ ), Vimentina ( $r=0.6315$ ,  $P=0.0087^*$ ) y STAT3 ( $r=0.4919$ ,  $P<0.0001^*$ ), únicamente en el patrón B3. La administración exógena de Wnt2 produce un incremento de los genes relacionados con la TEM (Vimentina y Snail1/2).

Tabla 1. Expresión del ARNm de genes relacionados con altos niveles de inflamación en comparación con la expresión de la b-actina (EC vs control). Los datos están expresados como la Media  $\pm$  Error estándar de la media con  $n \geq 7$  en todos los grupos, analizado con ANOVA + Kewman-Keuls test.

	IL-1	IL-6	Vimentina	E-Cadherina	Wnt2b	CD86	CD16
B2	3,6 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 0,8	4,1 $\pm$ 1,0	0,9 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,6	4,8 $\pm$ 0,9
B3	8,9 $\pm$ 2,0*	8,7 $\pm$ 1,8*	5,1 $\pm$ 1,0	0,7 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,4*	7,7 $\pm$ 1,3*	7,2 $\pm$ 1,1

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Los pacientes B2 y B3 presentan un diferente patrón de infiltración macrofágica y de expresión de ligandos Wnt. El ligando Wnt2b, probablemente secretado por macrófagos CD16 positivos, podría jugar un papel importante en el desarrollo de fístulas en pacientes con comportamiento B3.

## BIBLIOGRAFÍA

Akhmetshina A, Palumbo K, et al. (2012). Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- $\beta$ -mediated fibrosis. *Nature Communications*, 3, 735–. <http://doi.org/10.1038/ncomms1734>.



# OXYGEN LOAD DURING PRETERM STABILIZATION MODIFIES EPIGENETIC PROFILES.

*Sheila Lorente Pozo*

## INTRODUCTION

Preterm infants with immature antioxidant defenses frequently need oxygen at birth. Oxidative stress has been associated with structural changes of DNA. We hypothesized that the oxygen load provided during stabilization would induce modifications in DNA methylation profile.

## MATERIAL AND METHODS

Prospective observational study performed in preterm <32 weeks' gestation that received oxygen upon stabilization. Initial inspired fraction of oxygen was 0.3. Thereafter oxygen was titrated according to oxygen saturation and heart rate. Patients were monitored for FiO<sub>2</sub>, SpO<sub>2</sub>, HR, tidal volume, respiratory rate and OL during stabilization using a respiratory function monitor. Cord (t1) and 2 hours (t2) blood samples were processed for DNA methylation. DNA-methylation high-resolution microarray that interrogates 850,000 CpGs sites in the human genome to find the impact of OL during neonatal resuscitation on DNA methylation at a global level was employed. Term infants were used as controls.

## RESULTS

A total of 45 preterm infants with a gestational age of 28 weeks (95% CI 25- 32) and 17 healthy term infants born (controls) were recruited. The median for oxygen load was 644 mL O<sub>2</sub>/kg (95% CI=275-976 O<sub>2</sub> mL/kg). Significant differences in DNA methylation were found between term and preterm infant in cord blood. Moreover, in preterm infants DNA methylation with expression and repression of relevant genes significantly correlated with the OL received upon stabilization and determined at 2 hours after birth.

## DISCUSSION / CONCLUSIONS

DNA methylation profile was modified by prematurity and oxygen. Oxygen influenced expression/repression of relevant genes. Permanence of these changes is being followed.

## BIBLIOGRAPHY

1. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, Nuñez-Ramiro A, Kuligowski J, Cháfer-Pericás C, Cernada M, Escobar J, Vento M. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol.* 2017;12:674-681.
2. Heyn H, Moran S, Hernando-Herraez I et al. DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Res.* 23 (9), 1363-1372 (2013).

3. Nanduri J, Prabhakar N. Development programming of O<sub>2</sub> sensing by neonatal intermittent hypoxia via epigenetic mechanisms. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 105-109 (2013).
4. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics* 8 (3), 389-399 (2016).

# IMPLICACIÓN DEL GEN IDH Y EGFR EN LA BIOPATOLOGÍA Y PRONÓSTICO DE GLIOBLASTOMAS PRIMARIOS CON MUTACIÓN EN EL GEN TP53.

*Marta Dafne Caballero Navalón*

## INTRODUCCIÓN

Existen pocos casos descritos de glioblastomas primarios con doble mutación TP53-IDH. A fin de explicar la baja prevalencia de su asociación, analizar la probable implicación biopatológica de ambos genes y definir su correlato genético-clínico, se ha analizado en el estudio el estado mutagénico del gen IDH y del gen EGFR -el más frecuentemente mutado en estos tumores-, en 21 muestras de glioblastoma con mutación TP53. Se ha realizado además, un análisis estadístico comparativo contrastando diferentes características epidemiológicas en cada una de las combinaciones genéticas estudiadas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Procesamiento histopatológico de las muestras seleccionadas con tinciones tradicionales e inmunohistoquímica para visión en microscopía óptica. Diagnóstico anatomopatológico de las muestras. Análisis del estado genético de los genes TP53, IDH y EGFR mediante PCR y secuenciación. Análisis estadístico descriptivo e inferencial de las combinaciones genéticas y sus características clínicas.

## RESULTADOS

Los 21 pacientes poseían la mutación de TP53. Al secuenciar este gen en todas las muestras, se descubrieron seis sustituciones y una alteración en la pauta de lectura, no descritas hasta ahora en el glioblastoma.

Existen 14 casos TP53+ IDHwt, y 7 que son TP53+ y además IDH+. Si consideramos la mutación EGFRvIII, la poseen 8 del primer grupo (siendo TP53+ IDHwt EGFRvIII), y 5 del segundo (siendo TP53+ IDH+ EGFRvIII).

La edad al diagnóstico de pacientes con glioblastoma TP53+ IDH+ es significativamente menor que la de pacientes con glioblastomas IDHwt. También se diagnostican significativamente más pronto aquellos TP53+ IDH+ EGFRvIII frente a los TP53+ IDH+ EGFRwt. Además, se demostró mayor supervivencia en pacientes TP53+ IDH+ que en los IDHwt de forma estadísticamente significativa, y la única variable que permite predecir la supervivencia es el estado mutagénico de IDH.

## DISCUSIÓN

La OMS en 2016 publicó una actualización acerca de la clasificación genética de los glioblastomas en la que los dividía en IDHwt (o primarios, por presentarse de novo) e IDH+ (o secundarios, por evolucionar desde lesiones de bajo grado). No obstante, en nuestro estudio, todos los casos diagnosticados como glioblastomas primarios que además son IDH+ se comportan como secundarios. Por tanto, por sus repercusiones a nivel pronóstico y su futura implicación en el manejo terapéutico, en todos los glioblastomas se debería analizar el estado mutagénico de IDH, con independencia de ser diagnosticados como primarios o secundarios.

Por otro lado, en el análisis presentado se muestra cómo la mutación EGFRvIII, pese a ser de mal pronóstico por sí misma, al combinarse con la mutación de IDH sigue presentando largas supervivencias probablemente debido a la tendencia a presentar un menor tamaño tumoral en ese grupo, o bien, porque el propio IDH es un factor protector tan importante que “anula” por un tiempo el efecto oncogénico del EGFR.

En consecuencia, es de tremenda importancia conocer cómo y por qué el IDH influye tanto en la supervivencia de los glioblastomas primarios.

## BIBLIOGRAFÍA

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17:98–110

Nørøxe, D. S., Poulsen, H. S., & Lassen, U. (2016). Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open*, 1(6), e000144. <https://doi.org/10.1136/esmooopen-2016-000144>

# PERFIL METABÓLICO URINARIO DEL RECIÉN NACIDO PREMATURO ALIMENTADO CON LECHE MATERNA O LECHE MATERNA DONADA.

*José David Piñeiro-Ramos*

## INTRODUCCIÓN

La leche materna es esencial para una nutrición óptima del recién nacido, sobre todo para los recién nacidos pretérmino. Más allá de los aspectos nutricionales, la leche materna aporta una amplia gama de lípidos, aminoácidos y anticuerpos específicos que ayudan a la regulación gastrointestinal y la maduración del sistema inmune. Desde el nacimiento, los recién nacidos se exponen a la microbiota materna. El patrón de colonización de las bacterias contribuye al desarrollo y crecimiento del recién nacido.

Cuando la leche materna (OMM) no está disponible, la leche materna donada (DHM) es la mejor alternativa para la alimentación del recién nacido. Sin embargo, el proceso de pasteurización indispensable para garantizar la seguridad alimentaria, altera la composición de la DHM, eliminando la microbiota y desnaturalizando las proteínas. Estas alteraciones podrían modificar el patrón de colonización bacteriano del recién nacido.

Este estudio analiza el impacto del tipo de alimentación en recién nacidos pretérminos (OMM o DHM) sobre el perfil metabolómico urinario.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un análisis no dirigido del metaboloma urinario en una población de 40 recién nacidos pretérmino alimentados con OMM (N=20) y DHM (N=20). Las orinas se recogieron a las 4 semanas de vida del recién nacido. El análisis se llevó a cabo empleando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (Ultra Performance Liquid Chromatography – Time of Flight Mass Spectrometry, UPLC-TOFMS), una columna de fase reversa (C18) e ionización de tipo electrospray positivo (ESI+). El análisis de las muestras se randomizó para evitar posibles sesgos analíticos y se incluyó el análisis de una muestra control (QC, quality control) cada 5 muestras para monitorizar y corregir posibles derivas instrumentales.

Para el tratamiento bioinformático de los datos crudos generados se empleó el software XCMS online. Posteriormente, el análisis bioestadístico de los datos preprocesados se realizó empleando PLS Toolbox (PLS\_Toolbox 7.0, Eigenvector Research Inc. Mansos, WA) y funciones propias desarrolladas en MATLAB (Matlab R2017a, MathWorks, Natick MA).

Se llevó a cabo un análisis discriminante multivariante y supervisado mediante modelos de regresión lineal parcial (Partial Least Squares – Discriminant Analysis, PLS-DA). La identificación

de los metabolitos de interés se llevó a cabo empleando una base de datos con más de 250 (co)metabolitos de bacterias generada a partir de una búsqueda bibliográfica dirigida a la identificación de metabolitos asociados a microbiota.

## RESULTADOS

El preprocesado de los datos obtenidos a partir de las muestras proporcionó una tabla de picos con información acerca de los niveles de 2041 variables metabolómicas, identificadas a partir de su relación masa carga y su tiempo de retención. El análisis metabolómico reveló diferencias estadísticamente significativas entre los perfiles metabolómicos de recién nacidos alimentados con OMM y con DHM (test de permutaciones, p-valor = 0.004). El análisis de la importancia relativa de cada variable metabolómica en la separación observada permitió la identificación de un conjunto de 34 variables asociadas a microbiota. De ellas, 21 variables se encontraron en una mayor concentración en orinas de recién nacidos alimentados con OMM entre las que se encuentran el ácido hipúrico o el glucoronide, y 13 variables se encontraron en mayor concentración en el caso de DHM donde se encuentran el p-cresol y TMAO entre otros.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Este estudio ha permitido, por primera vez, observar el impacto de un cambio en la alimentación (OMM o DHM) sobre el metaboloma urinario de recién nacidos pretérmino. A partir de los resultados obtenidos, se llevará a cabo la identificación de los metabolitos putativos mediante la adquisición de sus espectros de MS/MS y, cuando sea posible mediante el análisis de patrones (masa exacta, RT, MS/MS). Además, se estudiarán las vías de señalización alteradas donde intervienen esos metabolitos y se compararán entre los dos grupos de estudio.

Por otro lado, se procederá al análisis de la composición de la microbiota intestinal mediante secuenciación de segunda generación pirosecuenciando los genes del RNA ribosomal 16S e identificándolos con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos resultados permitirán obtener mayor información acerca de la asociación entre la alimentación y microbiota intestinal en recién nacidos, y su impacto sobre el metaboloma del recién nacido.

Los resultados obtenidos indican que, aun siendo la leche donada la mejor alternativa a la leche materna, esta tiene efectos en el recién nacido evidenciado en su perfil metabolómico. La combinación entre la información del microbioma y el metaboloma constituye un enfoque que mediante la biología de sistemas puede ayudar a entender mejor el rol de la nutrición en la salud de recién nacidos pretérmino a corto y largo plazo.

# MODELOS HETERÓLOGOS Y HOMÓLOGOS DE ROEDORES PARA ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE ENDOMETRIOSIS.

*María Marchante Cuevas*

## INTRODUCCIÓN

La endometriosis es una enfermedad ginecológica crónica que afecta al 10-15% de las mujeres en edad reproductiva. Aunque ha sido muy estudiada, se desconocen los mecanismos moleculares concretos que la originan. Además, no existen métodos de diagnóstico para identificarla en etapas tempranas de desarrollo, ni tratamientos eficaces a largo plazo. Por tanto, es necesario desarrollar modelos animales que permitan un mejor conocimiento y tratamiento de la enfermedad. Los primates no humanos han sido empleados en diferentes estudios, sin embargo, su uso presenta más limitaciones éticas y económicas que otros animales como los roedores. Así pues, uno de los fines de los investigadores es establecer modelos animales en roedores para estudiar la endometriosis. En la presente revisión, se comentan los modelos de roedores que existen hasta la fecha para el estudio de la endometriosis, desde los modelos heterólogos y homólogos a punto final hasta los modelos no invasivos, discutiendo las características y aplicaciones de estos.

## MÉTODOS

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica exhaustiva empleando bases de datos como PubMed, y se usaron las siguientes palabras clave en inglés: endometriosis, homologous models, heterologous models, rodents, non-invasive models. En total se emplearon 75 referencias desde 1927 con la teoría de Sampson sobre el origen de la endometriosis, hasta estudios recientes de enero del 2018 en modelos homólogos de ratón.

## RESULTADOS

Entre los modelos presentados en la revisión, se encuentran los homólogos donde a partir de un animal donante se obtiene el endometrio que será transferido a otro receptor singénico, y los heterólogos donde el tejido trasplantado en el animal es de origen humano. Estos modelos a su vez pueden ser a punto final, siendo el animal sacrificado para conocer el resultado del estudio, o no invasivos que van a permitir evaluar el desarrollo y tratamiento de la enfermedad de manera continua. El desarrollo de dichos modelos ha permitido obtener un mayor conocimiento de la endometriosis, estudiar entre otros el papel del sistema inmune, la dependencia con los estrógenos, la angiogénesis y la apoptosis. Además, sugieren posibles dianas terapéuticas basadas por ejemplo en el uso de inmunomoduladores o drogas antiangiogénicas.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

La revisión realizada plantea la necesidad de desarrollar modelos animales que permitan conocer, entre otros, los mecanismos involucrados en el desarrollo y mantenimiento de la endometriosis. Los modelos animales de los que se dispone en el estudio de la endometriosis han ido mejorando a lo largo del tiempo, y cada vez se dispone de un mayor número. Sin embargo, es importante destacar que no existe un modelo animal mejor que otro, sino que el más adecuado dependerá del fin del estudio. Así pues, si por ejemplo se quiere evaluar el efecto de una droga a lo largo del tiempo lo más adecuado sería un modelo no invasivo, pero si por el contrario se quiere conocer el efecto a término, sería mejor un modelo animal a punto final.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Defrere S, Colette S, Lousse JC, Donnez J, Van Langendonck A. Review: luminescence as a tool to assess pelvic endometriosis development in murine models. *Reprod Sci* 2009 Dec;16(12):1117-1124.
- (2) Greaves E, Critchley HOD, Horne AW, Saunders PTK. Relevant human tissue resources and laboratory models for use in endometriosis research. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2017 Jun;96(6):644-658.
- (3) Grummer R. Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 2006 Sep-Oct;12(5):641-649.



# DIFERENCIACIÓN DE iPSCS EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

*María Isabel Moscardó García*

## INTRODUCCIÓN

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) son un tipo de células madre caracterizado por su habilidad de autorenovarse y su potencial para diferenciarse en cualquier otro tipo celular especializado del cuerpo. La derivación de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (mDA) a partir de iPSCs resulta de particular interés debido a la importancia de estas neuronas en la enfermedad del Parkinson (PD). La PD es un trastorno neurodegenerativo progresivo e hipocinético, que se caracteriza por bradicinesia, rigidez, acinesia, postura anormal y temblores. La mayoría de estos problemas motores se asocian a la pérdida de neuronas mDA en la sustancia negra pars compacta (SNc). Es por ello, por lo que en los últimos años ha surgido un creciente interés por la diferenciación de iPSCs en mDAs para observar como afecta la edad a este tipo de neuronas.

En este proyecto nos basamos en la diferenciación de iPSCs (provenientes de fibroblastos humanos) en neuronas mDAs, para, posteriormente, ver cuales son las rutas que se encuentran alteradas con el envejecimiento y poder trasladar los resultados a humanos. Por tanto, los objetivos principales son: (1) diferenciar iPSCs en neuronas mDAs, (2) llevar a cabo análisis "Single cell", en concreto Split-seq, e (3) identificar cambios asociados al envejecimiento y la PD.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el proyecto cultivamos diferentes líneas iPSCs, con mutaciones relevantes en la PD (como los genes PARKIN1, PARKIN2, PINK1, SNCA, etc) en placas de 6 y 12 pocillos, y las dejamos crecer durante 25, 30 o 40 días, alimentándolas cada día con el medio correspondiente de acuerdo con el protocolo descrito en (Tomishima, 2012). Posteriormente, realizamos a cada una de las muestras dos tipos de análisis, con la finalidad de determinar si están expresando o no los marcadores dopaminérgicos que corresponden a cada estadio de desarrollo y, cuya expresión nos confirma la diferenciación de iPSCs en neuronas mDA. En primer lugar realizamos qRT-PCR, para ello llevamos a cabo la extracción del RNA, a partir del cual obtendremos cDNA y, por último realizaremos la qRT-PCR. Seguidamente, procesamos otra muestra de las mismas condiciones a través del protocolo de Split-seq (Rosenberg et al., 2017) para realizar el análisis "single cell". Por último, aquellas muestras cuyo estadio de desarrollo se encuentre en el día 21, serán sometidas a tinción, utilizando anticuerpos primarios y secundarios (inmunohistoquímica), observando el resultado bajo microscopio electrónico, con el fin de determinar si expresan los marcadores TH y MAP2, característicos del día 21 y que reflejan que las iPSCs ya se han diferenciado en neuronas mDA.)

## RESULTADOS

Lamentablemente, actualmente no disponemos de los resultados de los análisis que se realizaron a todas las muestras cultivadas, debido a que dicha investigación sigue en curso. No obstante, tenemos los resultados de análisis inmunohistoquímicos realizados a distintas muestras, los cuales demuestran que tras 21 días de cultivo, siguiendo el protocolo mencionado anteriormente, se obtienen neuronas mDA, partiendo de iPSCs provenientes de fibroblastos humanos. Además, hemos obtenido resultados de algunas de las muestras que se sometieron a qRT-PCR, que nos ha permitido ver como ha cambiado la expresión de genes característicos de neuronas mDA a lo largo del tiempo, siendo prácticamente nula al inicio, cuando teníamos iPSCs, y aumentando progresivamente su expresión a lo largo del tiempo, hasta llegar al día 21 (aproximadamente) en el que se alcanza la condición de neuronas mDA. Posteriormente, se realizó el mismo análisis a neuronas mDA de 40 días de edad, para ver cuales eran las rutas que se veían alteradas con el envejecimiento de dichas neuronas. Sin embargo, todavía no disponemos de estos resultados. Lo mismo nos ha sucedido con los resultados del Split-seq, el cual incluye la secuenciación de la muestra y el posterior manejo informático y estadístico de los resultados, parte que todavía se encuentra en desarrollo.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

En conclusión, podemos decir que el protocolo de diferenciación diseñado por Tomishima, nos permite obtener neuronas mDA a partir de iPSCs de procedencia humana, además nos permite ver cuales son las rutas de las neuronas mDA que se ven afectadas con el envejecimiento. Esto debería facilitar enormemente la aplicación de neuronas mDA en modelos de enfermedades y terapia celular, para combatir enfermedades tan comunes como el PD. Sin embargo, son muchos los aspectos que todavía necesitan ser estudiados y mejorados.

## BIBLIOGRAFÍA

Tomishima, M. (2012). Midbrain dopamine neurons from hESCs. StemBook.

Studer, L. (2012). Derivation of dopaminergic neurons from pluripotent stem cells, volume 200, pages 243-263. Elsevier.

Rosenberg, A.B., Roco, C. M., Muscat, R. A., Kuchina, A., Mukherjee, S., Chen, W., Peeler, J. D., Yao, Z., Tasic, B., Sellers, D. L., Pun, S. H., Seelig, G. (2017). Scaling single cell transcriptomics through split pool barcoding. bioRxiv (This article is a preprint and has not been peer-reviewed ).

Tollervey, J. R., Wang, Z., Hortobágyi, T., Witten, J. T., Zarnack, K., Kayikci, M., Clark, T. A., Schweitzer, A. C., Rot, G., Curk, T., Zupan, B., Rogelj, B., Shaw, C. E., and Ule, J. (2011). Analysis

of alternative splicing associated with aging and neurodegeneration in the human brain.  
Genome Research, 21(10):1572-1582.

# EFFECTO DEL DOLOR INFLAMATORIO SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES OPIOIDES MU DEL ÁREA TEGMENTAL VENTRAL.

*Yolanda Campos Jurado, Marta Igual López, Jesús David Lorente Erenas*

## INTRODUCCIÓN

El tratamiento del dolor crónico con analgésicos opioides puede dar lugar a problemas de adicción, en particular en pacientes con historial previo de abuso de drogas<sup>1</sup>. Como señala un estudio previo, el dolor inflamatorio produce una desensibilización de receptores opioides mu (MOR) en áreas cerebrales que modulan la percepción del dolor (vía nociceptiva)<sup>2</sup>. Asimismo, se puede esperar que la mera presencia del dolor pueda producir una desensibilización de MOR en las vías del refuerzo relacionadas con los procesos de adicción. Por lo que el dolor puede ser un factor de riesgo que incremente el consumo de analgésicos opioides y otras drogas. De hecho, en un estudio previo, se observó que los animales con dolor inflamatorio requerían el doble de dosis de heroína que los animales control para obtener los mismos efectos neuroquímicos en el núcleo accumbens (NAc), centro clave en desarrollo de la adicción<sup>3</sup>. El objetivo de este trabajo es explorar mediante estudios inmunohistoquímicos la posible desensibilización de los MOR en el área ventral tegmental (VTA) a través del análisis de la expresión de la proteína cFos en las áreas de proyección de este núcleo. De este modo analizaremos la existencia o no de desensibilización de los MOR locales y su influencia, homogénea o no, en las áreas de proyección que son claves en el desarrollo de las conductas adictivas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio se utilizó un modelo de dolor inflamatorio en rata macho Sprague Dawley ampliamente utilizado en la literatura, que consiste en el desarrollo de una reacción inflamatoria en respuesta al complejo adyuvante de Freud (CFA). El CFA se diluyó en el mismo volumen de salino estéril y se inyectó subcutáneamente un volumen de 0,1 mL en la pata trasera de los animales de los grupos experimentales.<sup>3</sup> Además a las ratas se les implantó quirúrgicamente una cánula para la microinyección local en VTA. Las ratas recibieron salino (grupo control) o una de las dos dosis de DAMGO (agonista selectivo de los MOR) ensayadas (7 y 14 ng). A las 2 h de dicha administración, los animales fueron perfundidos intracardiamente con PBS y seguidamente con 4% PFA y sus encéfalos extraídos. Tras la obtención de cortes histológicos de 40 µm con la ayuda de un micrótopo de congelación, se realizó una inmunohistoquímica incubando con anticuerpo de cFos (1:10000, Santa Cruz). El análisis estadístico empleado ha sido una prueba t de Student para muestras independientes.

## RESULTADOS

Los resultados muestran que la administración de 7 ng de DAMGO en el VTA produce un aumento de la expresión de la proteína cFos en el NAc en los animales tratados con salino. Sin embargo, en los animales tratados con CFA los niveles de expresión de cFos no presentan diferencias respecto al grupo control. Curiosamente, en ambos grupos la expresión de proteína cFos aumenta tras la administración de 14 ng de DAMGO intra-VTA. Por otra parte, el análisis de la corteza prefrontal (PFC) muestra diferencias en los niveles de cFos en la corteza cingulada anterior (ACC). Únicamente, en los animales tratados con salino se observa un incremento en la expresión de cFos tras la administración de 7 ng de DAMGO.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman que la presencia de dolor inflamatorio produce una desensibilización de los MOR del VTA, que es dependiente de la dosis DAMGO empleada y de la región de proyección.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Potter JS, Prather K, Weiss RD. Physical pain and associated clinical characteristics in treatment-seeking patients in four substance use disorder treatment modalities. *Am J Addict.* 2008;17(2):121-125.
2. Zhang W, Xie Y, Gu J, et al. Liquid chromatography with amperometric detection at a nano crystalline ce-doped lead dioxide film modified electrode for determination of (R)-salsolinol, (R)-N-methylsalsolinol and monoamine neurotransmitters in parkinsonian patients' cerebrospinal fluid. *Analyst.* 2004;129(3):229-234.
3. Hipolito L, Fakira AK, Cabañero D, et al. In vivo activation of the SK channel in the spinal cord reduces the NMDA receptor antagonist dose needed to produce antinociception in an inflammatory pain model. *Pain.* 2015; in press.

# CARACTERIZACIÓN PROBIÓTICA DE BACTERIAS AISLADAS DE DERIVADOS LÁCTEOS FERMENTADOS.

*Andrés Llatas Mateu*

## INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que, tras su ingestión en cierto número, ejercen efectos beneficiosos en el hospedador más allá de los inherentes a la nutrición básica. Una fuente potencial de probióticos, en forma de bacterias ácido lácticas, son los derivados lácteos fermentados, tales como queso o kéfir.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio, se aislaron un total de dieciocho cepas procedentes de diferentes derivados lácteos (seis de queso tipo torta del casar, seis de queso feta y seis de kéfir) empleando medios de cultivo específicos para el aislamiento de bacterias ácido lácticas. Seguidamente se evaluó su potencial probiótico mediante el análisis de su morfología y carácter gram, pruebas de resistencia a pH y bilis, resistencia a antibióticos, actividad antimicrobiana frente a patógenos (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica* spp.), y adhesión celular y competición por la adhesión frente a patógenos (*Salmonella entérica* spp.) in vitro.

## RESULTADOS

Los resultados de estas pruebas evidencian que catorce de las cepas aisladas presentaron una buena resistencia a las condiciones gastrointestinales de pH y bilis. En cuanto a su resistencia a antibióticos, no se encuentran resistencias remarcables en comparación con los valores indicados por la EFSA. Respecto a la actividad antimicrobiana frente a patógenos clínicos y contaminantes de alimentos, varias cepas presentaron actividad frente a estos en medio sólido. Los estudios de adhesión en células Caco-2/TC7 evidenciaron una cierta adhesión de las cepas aisladas, así como un % de reducción de la adhesión de *Salmonella entérica* spp.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio indican que las bacterias ácido lácticas aisladas de estos derivados lácteos tienen un potencial uso como probióticos.

## BIBLIOGRAFÍA

I. Khan, & S.C. Kang (2016). Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi - a traditional Korean fermented food. *Food Control*, 60, 88–94.

Y. Wang, J. Zhou, X. Xia, Y. Zhao, & W. Shao (2016), Probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* FM-LP-4 isolated from Xinjiang camel milk yogurt. *International Dairy Journal*, 62, 28-34.

K. Angmo, A. Kumari, Savitri. T.C. Bhalla (2016), Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 428-435.

# INFLUENCIA DE LA VITAMINA D EN EL CRECIMIENTO DE MIOMAS.

*María Cristina Carbajo García*

## INTRODUCCIÓN.

Los fibromas uterinos, leiomiomas o miomas uterinos son los tumores benignos más comunes en mujeres en edad reproductiva. Presentan una gran variedad de síntomas como dolor abdominal e infertilidad. En la actualidad, la histerectomía es la principal opción de tratamiento, pero posee importantes efectos secundarios. La vitamina D es un esteroide liposoluble que presenta funciones relacionadas con el metabolismo, el anabolismo y la reabsorción de los huesos, la homeostasis mineral, el transporte intestinal de calcio y el control del ciclo celular. El objetivo de esta revisión es proporcionar un resumen detallado del conocimiento científico actual sobre la relación entre la vitamina D y los leiomiomas tanto in vitro como in vivo, así como postular el papel potencial de la vitamina D3 como una opción de tratamiento a largo plazo eficaz, económica y segura para los fibromas uterinos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando la base de datos de PubMed para identificar y resumir información relevante acerca de la influencia de la vitamina D en el crecimiento de miomas. Se seleccionaron artículos originales tras la búsqueda con las palabras clave: "vitamin D", "myoma", "leiomyoma" y "uterine fibroid".

## RESULTADOS

Estudios recientes han demostrado que la vitamina D juega un papel importante en el crecimiento de los fibromas uterinos, existiendo una asociación entre el déficit de vitamina D y un riesgo aumentado de desarrollar leiomiomas uterinos. La presencia de unos niveles óptimos de vitamina D reduce la proliferación de células de leiomioma in vitro y el crecimiento de tumores de leiomioma in vivo, tanto en modelos animales como en humanos. La vitamina D3 ejerce su efecto sobre los miomas actuando sobre distintos procesos. Disminuye el crecimiento tumoral a través de la inhibición de factores proliferativos y anti-apoptóticos, así como la inducción de proteínas implicadas en la apoptosis. Además, la vitamina D3 disminuye la expresión de receptores esteroideos y de proteínas de la matriz extracelular que son importantes en el proceso de fibrosis. La vitamina D3 antagoniza la vía WNT/ $\beta$ -catenina y los efectos de la COMT. Por último, se han realizado estudios sobre el potencial de la vitamina D3 y sus análogos como agentes terapéuticos anti-miomas que demuestran su eficacia.



## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La información recopilada postula la función potencial de la vitamina D3 como una opción de tratamiento médico no quirúrgico efectivo y seguro para los fibromas uterinos, abriendo la puerta a una nueva opción terapéutica que posee menos efectos secundarios que los tratamientos actuales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sharan C, Halder SK, Thota C, Jaleel T, Nair S, Al-Hendy A. Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-O-methyltransferase. *Fertil Steril* 2011 Jan;95(1):247-253.
2. Halder SK, Osteen KG, Al-Hendy A. Vitamin D3 inhibits expression and activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human uterine fibroid cells. *Hum Reprod* 2013 Sep;28(9):2407-2416.
3. Halder SK, Sharan C, Al-Hendy A. 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment shrinks uterine leiomyoma tumors in the Eker rat model. *Biol Reprod* 2012 Apr 19;86(4):116.
4. Halder SK, Sharan C, Al-Hendy O, Al-Hendy A. Paricalcitol, a vitamin d receptor activator, inhibits tumor formation in a murine model of uterine fibroids. *Reprod Sci* 2014 Sep;21(9):1108-1119.

# INSIGHTS INTO NEURAL OSCILLATIONS IN STRESS

*Danae Raya Salom*

## INTRODUCCIÓN.

The stress system coordinates the adaptive responses of the organism to stressors of any kind. Dysfunction in this circuit may induce disturbances in emotional and cognitive aspects of several stress-related pathologies including depression. Thus, comprehension of dynamics and communication between these structures may lead to better understand neurobiological mechanism underlying anxiety disorders and also the beneficial effects of some treatments, such as deep brain stimulation (DBS).

The main purpose of this work is to delve into interactions between several of the structures related to stress control evaluating changes in their oscillatory activity after applying to 2 different models of acute stress. In Experiment 1 Local Field Potentials (LFP) from the infralimbic division of the medial prefrontal cortex (IL), the basolateral division of the amygdala (BLA) and the dorsal hippocampus (HPCd), were recorded after the injection of corticotropin releasing hormone (CRH) in the dorsal raphe nucleus (DR). In Experiment 2, we analysed the effects of the electrical activation of the central nucleus of the amygdala (CeA) over the oscillatory dynamics of the IL. In addition, in Experiment 3 the effects of high-frequency electrical stimulation (DBS) targeting the nucleus accumbens core in the oscillatory activity of the infralimbic cortex were examined.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Subjects and surgical procedures

Data was obtained from adult female Sprague-Dawley rats weighting 200-250g. All the experimental protocols were carried out according to the animal care guidelines of the European Communities Council Directive (2010/63/EU) and approved by the Ethics Committee of the University de Valencia prior to performing the experiments. All efforts were made to minimise the number of animals treated and their suffering. Rats were housed at a thermoregulated environment in a 12-h light/dark cycle with access to food and water ad libitum.

Animals were anaesthetised with urethane (Sigma), prepared in saline and administered [i.p.] at 1 ml/kg. During the experiments, animals were placed on a stereotaxic frame (Narishige, Japan), and the body temperature was kept at 37–38°C with an isothermal heating pad. With a supplement of local lidocaine anaesthesia, a midline sagittal incision was made and the skull surface was cleaned and dried. Trepine holes were made from bregma reference, based on stereotaxic coordinates according to the atlas of Paxinos and Watson (2005).

## Recording and stimulation procedures

Field potentials were recorded through formvar insulated stainless steel monopolar macroelectrodes (120 $\mu$ m diameter bluntly cut; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), placed in the infralimbic cortex (AP: 3.2 mm, L: 0.6 mm and DV: 5.0 mm) for experiments 1, 2 and 3. In experiment 1, two additional electrodes were placed in hippocampus (AP: -3.5 mm, L: 2.5 mm and DV: 3.0 mm) and basolateral amygdala (AP: -2.5 mm, L: 4.5 mm and DV: 7.8 mm). The AcbCo coordinates of experiment 3 were AP: 1.2 mm, L: 1.2 mm and DV: 7.4 mm. A stainless-steel skull screw was implanted in the occipital bone and used as reference. Signals were recorded and filtered with a first differential AC pre-amplifier (Grass p551;  $\times 10$ ; 0.3-300 Hz) added to a second amplification (CIBERTEC Amplifier,  $\times 100$ ; 0.3-300 Hz) and sampled at 1 kHz. The data were digitised with the Power 1401 plus A/D converter (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) and stored and on-line controlled in a computer by the Spike2 software (Cambridge Electronic Design).

In experiment 1, the stimulation was achieved through CRH (Sigma) infusion in the dorsal raphe (AP: -7.8 mm, L: 0.0 mm and DV: 6.5 mm). 0.5  $\mu$ l were administered (0.1  $\mu$ l/min). Control group received saline instead. Electrical stimulation was performed through bipolar electrodes (120 $\mu$ m diameter bluntly cut stainless steel wire) at the CeA (AP: -2.5 mm, L: 4.5 mm and DV: 7.8 mm) in experiment 2. The stimulation parameters were adjusted to mimic the neuronal activity recorded in CeA during restraint stress (1). The electrical stimulation was performed with a pattern of pulses of 0.2 ms to 5 Hz, with an intensity of 800  $\mu$ A applied over a 3-minutes period (adapted from Forster et al., 2008)(2). In experiment 3 the DBS pattern consisted of stimulation pulses of 60 ms to 130 Hz and 50  $\mu$ A during 5 min. These parameters are commonly used for clinical purposes.

## Data analysis

All the analyses were performed off-line in the MATLAB development environment (The MathWorks, Natick, MA, USA) using self-developed and built-in routines. First, LFPs were down-sampled to 200 Hz and filtered between 0.1 and 100 Hz. The resultant signals were digitally notch filtered with a Butterworth bandstop filter around  $50 \pm 3$  Hz, applied in both the forward and reverse directions to remove phase distortions. All the signals were z-score normalised.

## Fourier analysis

The frequency components of LFP traces were extracted using the fast Fourier transform (FFT). Power spectral density estimation was done by means of the Welch method (50% overlapping with Hamming 2s window) as implemented the Signal Processing MATLAB Toolbox, with a resolution of 0.2 Hz. Field activities were classified by frequency bands as follows: slow oscillations (SW, < 1.5 Hz), delta (1.5-3Hz), theta (3-12Hz), spindles (12-16 Hz), low gamma (30-60 Hz) and high gamma (60-90 Hz). To quantify the oscillatory activity for a range of frequencies,

the relative power of the band compared to the total power of complete range (Nyquist frequency) for each epoch was determined.

### **Phase-amplitude coupling**

Cross-frequency interactions of a signal were assessed by the modulation index. Briefly, raw data is filtered in the two frequency ranges of interest. MI is a normalized measure that reflects how well the instantaneous amplitude of a faster oscillation is phase-locked to the slower waves. The instantaneous phase of the slow wave and the amplitude of the fast oscillation are both computed by the Hilbert transform.

### **Statistical analysis**

Statistical comparisons were made by parametric after checking the assumptions of normality (Shapiro–Wilks test;  $p < 0.05$  to reject) and homoscedasticity (Levene's test;  $p < 0.05$  to reject). Data that failed normality were transformed to logarithmic values, and again tested for normality. For the paired comparisons, Student's t test was performed. The threshold for significance between the comparisons was accepted at the 95% ( $p < 0.05$ ) or 99% level ( $p < 0.01$ , as a double significant value). All the results were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). These calculations were made using the R statistical package.

## **RESULTADOS**

Injection of CRH in the DR induced a general activation of the amygdala and the hippocampus, so a significant increment in theta waves power, as well as theta LFP coherence between these structures, was observed. Electrical activation of the CeA caused a delayed but significant change in IL, with prominent slow waves accompanied by an increase in theta activity, coupled with faster oscillations, including gamma and spindles. Interestingly, DBS of nucleus accumbens core generated a similar but not identical slow wave in the IL since spindles were not detected. These results are discussed in terms of processing of the stress response and memory formation.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Experiment 1: CRH injection in the DR decreases SW oscillation, accompanied by faster frequencies such as theta, beta and spindles. Higher theta coherence levels are observed between BLA, HPC and IL after the stimulation.

Experiment 2: CeA electrical stimulation, which has been demonstrated as an acute-stress model, induces, with a delay, a characteristic  $< 1$  Hz slow oscillation accompanied by the rising of theta and spindles activity, which remains stable for about 1h. In addition, cross-frequency

coupling is observed, including theta-gamma coupling and both spindles and gamma nesting in the slow waves.

Experiment 3: The AcbCo DBS increases SW oscillations in IL, but this activity is not coupled to spindles. The presence of SW in IL could be involved in stress regulation.

These oscillatory patterns are compatible with cognitive, emotional and memory processing related to the stress management.

Increases in theta after CRF injection seem to be related to stress/fear processing (overall, low theta).

The SW observed after the CeA electrical activation, coupled to higher frequencies, might be involved in memory consolidation and/either in the IL's role in amygdala modulation.

The slow wave generated by the AcbCore DBS might facilitate the IL to modulate the amygdala, but would not allow consolidation.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Henke PG. Unit-activity in the central amygdalar nucleus of rats in response to immobilization-stress. *Brain Res Bull* [Internet]. 1983 Jun [cited 2017 May 31];10(6):833–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6616273>
2. Forster GL, Pringle RB, Mouw NJ, Vuong SM, Watt MJ, Burke AR, et al. Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus increases medial prefrontal cortical serotonin via type 2 receptors and median raphe nucleus activity. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2008 Jul [cited 2018 Jan 15];28(2):299–310. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18702701>

# ALTERACIONES ANATÓMICAS Y PATOLÓGICAS EN EL SENO MAXILAR DE ETIOLOGÍA ODONTOGÉNICA. UNA EVALUACIÓN METODOLÓGICA DE REVISIONES SISTEMÁTICAS Y META-ANÁLISIS.

*Sonia Peñarrocha Otra*

## INTRODUCCIÓN

La proximidad anatómica de los dientes antrales con el seno maxilar se asocia a alteraciones como la sinusitis maxilar de origen odontogénico, cambios anatómicos en la membrana sinusal y otras patologías como los quistes de retención mucosa o mucocelos.

## OBJETIVOS

El objetivo de la presente revisión es evaluar de manera crítica la calidad metodológica de revisiones sistemáticas, con o sin meta-análisis, que evalúen alteraciones anatómicas o patologías de origen odontogénico en el seno maxilar.

Se usó el formato PEO (Population, Exposition, Outcome): ¿Cuáles son las variantes anatómicas y las alteraciones patológicas u opacidades asociadas a lesiones de origen odontogénico reportadas en revisiones sistemáticas con o sin meta-análisis que incluyan estudios basados en tomografía computarizada del seno maxilar?

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron cuatro estudios: un meta-análisis y tres revisiones sistemáticas descriptivas. Tras un proceso crítico de evaluación, pudimos observar que las puntuaciones AMSTAR oscilaban entre 2 a 8, siendo dos revisiones las que mostraban una baja calidad metodológica, mientras que los otros dos estudios obtuvieron una evaluación moderada y alta respectivamente.

## RESULTADOS

Se detectaron más de 15 resultados diferentes entre características anatómicas y patología en los senos maxilares de origen odontogénico. Existe una gran variabilidad y poca correlación en los datos proporcionados entre estudios, respecto a la prevalencia de alteraciones sinusales de origen odontogénico. Ningún reporte pudo combinar de manera estadística los resultados entre sí debido a la alta heterogeneidad entre los estudios, ya que en su mayoría son revisiones

cualitativas. Cabe resaltar la ausencia de un criterio diagnóstico estandarizado para la sinusitis maxilar o el engrosamiento de membrana.

## DISCUSIÓN

El tema de alteraciones y patología sinusales de origen odontogénico requiere un mejor enfoque que evalúe la metodología de los estudios primarios a fondo a fin de ofrecer en profundidad detalles que permitan mejorar la evidencia con futuros estudios clínicos e identificando diferentes tipos de sesgo.

## BIBLIOGRAFÍA

Patel NA, Ferguson BJ. Odontogenic sinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2012 Feb [cited 2017 Oct 2];20(1):24–8. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00020840-201202000-00006>

Hoskison E, Daniel M, Rowson JE, Jones NS. Evidence of an increase in the incidence of odontogenic sinusitis over the last decade in the UK. *J Laryngol Otol* [Internet]. 2012 Jan 21 [cited 2017 Oct 2];126(1):43–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933468>

Ariji Y, Obayashi N, Goto M, Izumi M, Naitoh M, Kurita K, et al. Roots of the maxillary first and second molars in horizontal relation to alveolar cortical plates and maxillary sinus: computed tomography assessment for infection spread. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2006 Mar 15 [cited 2017 Oct 2];10(1):35–41. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00784-005-0020-5>

Von Arx T, Fodich I, Bornstein MM. Proximity of premolar roots to maxillary sinus: a radiographic survey using cone-beam computed tomography. *J Endod* [Internet]. 2014 Oct [cited 2017 Oct 2];40(10):1541–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239914005974>

# EFFECT OF THE ANTIRETROVIRAL DRUG EFAVIRENZ ON THE PROCESS OF MITOPHAGY IN GLIAL CELLS.

*Olga Martínez Arroyo*

## INTRODUCCIÓN

Efavirenz (EFV) is the most widely used member of the family of non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) employed in anti-HIV treatment. Although generally considered safe, EFV has been associated with several neurotoxic effects whose mechanisms are poorly understood. Previous studies related this toxicity to the alteration of cellular bioenergetics, mitochondrial dysfunction and autophagy, where the process of mitophagy could play a fundamental role. Here, we have aimed to study the effect of EFV on the process of mitophagy in vitro (glial cells) and in vivo (mice).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Human glioblastoma cells U251-MG were exposed to clinically relevant concentrations (10, 25 $\mu$ M) of EFV (24h). Thapsigargin (2 $\mu$ M TG, ER stress inductor), Rotenone (10 $\mu$ M Rot, ETC complex I inhibitor) and CCCP (10 $\mu$ M, uncoupler of oxidative phosphorylation) were used as controls. Cells were also starved by culturing them in HBSS, a condition known to trigger bulk (unspecific) autophagy. We performed quantitative RT-PCR and Western Blot analysis of the main markers of autophagy/mitophagy while fluorescence confocal microscopy was employed for colocalization analysis. The expression of protein markers of autophagy/mitophagy proteins was assessed in whole brain tissue from mice treated with 2.47 mg (p.o) of EFV during 12 weeks.

Statistical analysis: mean $\pm$ SEM (n=4-7), t-Student (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs DMSO-vehicle); Data obtained with untreated cells were considered 100%.

## RESULTADOS

EFV-treated human glioblastoma cells display altered mitochondrial morphology observed by confocal microscopy. While mitochondria in cells treated with DMSO remain in a filamentous long network, EFV-treated cells showed a loss of the mitochondrial network and perinuclear location of mitochondria. This together with the degradation of mtDNA induced by EFV suggested the induction of mitophagy. However, the decrease of expression levels of the mitophagy-related genes (PINK1 / PARK2) was contradictory, only a clear concentration-dependent increase in the protein levels of the protein adaptor NBR1 was observed and its increase was not correlated with the gene expression. In addition, the accumulation of some



outer (VDAC-1) and inner membrane (ACO2, CLPX) mitochondrial proteins, and the lack of colocalization of mitochondria with lysosomes suggest a failure in the total development of the process. Finally, the results obtained in an in vivo model showed great interindividual variability and differed from those obtained in U-251MG cells. Unexpectedly, the expression of none of the proteins analyzed (except PARKIN) was significantly upregulated in the brain.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

EFV alters mitochondrial morphology in glial cells and induces mitophagy as shown previously in other cell types. However, if the process is fully completed remains unclear. These manifestations may play a role in various clinically relevant situations responsible for the neuropsychiatric symptoms caused by this drug.

Keywords: HIV, NNRTI, autophagy, mitophagy, mitochondria, mitochondrial dysfunction, neurotoxicity.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Apostolova N, Gomez-Sucerquia LJ, Gortat A, Blas-Garcia A, Esplugues JV. Compromising mitochondrial function with the antiretroviral drug efavirenz induces cell survival-promoting autophagy. *J Hepatol.* 2011; 54:1009–1019.

Bertrand L, & Toborek M. Dysregulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagic Responses by the Antiretroviral Drug Efavirenz. *Mol Pharmacol.* 2015; 88:304– 315.

Dong Q, Oh JE, Yi JK, Kim RH, Shin KH, Mitsuyasu R, Kang MK. Efavirenz induces autophagy and aberrant differentiation in normal human keratinocytes. *J Mol Med.* 2013; 31:1305–12.

Funes HA., Apostolova N, Alegre F, Blas-Garcia A, Alvarez A, Marti-Cabrera M, Esplugues JV. Neuronal bioenergetics and acute mitochondrial dysfunction: A clue to understanding the central nervous system side effects of efavirenz. *J Infect Dis.* 2014; 210:1385–1395.

# ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACTATO DESHIDROGENASA SALIVAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL.

*Manuel Iglesias Díaz*

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal o periodontitis es un proceso crónico infeccioso e inflamatorio caracterizado por la presencia de patógenos bacterianos sulculares que invaden el espacio biológico, disminución de la respuesta inmune del huésped y la destrucción de tejido conectivo; con pérdida subsiguiente de inserción periodontal y reabsorción del hueso alveolar, dañando lo que conocemos como periodonto o tejidos periodontales. Una enfermedad multifactorial, crónica inflamatoria, donde existe una compleja interacción entre el comportamiento microbiano y la respuesta del huésped; sin olvidar posibilidad de tener una genética predisponente, ni los factores ambientales.

El uso de los biomarcadores bioquímicos es uno de los métodos más avanzados existentes hoy en Periodoncia para diagnóstico y seguimiento de la enfermedad periodontal (EP). La lactato deshidrogenasa (LDH) se trata de una enzima citoplasmática liberada cuando existe destrucción celular.

El objetivo principal de estudio fue diagnosticar y realizar un seguimiento de la enfermedad periodontal de forma predictiva mediante las mediciones de lactato deshidrogenasa salival basadas en espectrofotometría.

La intención de este estudio fue de corroborar presencia la enfermedad periodontal medida convencionalmente (clínica y radiológicamente) mediante un método más objetivo y certero que un método manual y visual; debido a que en ocasiones podemos presentar signos clínicos de enfermedad periodontal no necesariamente activa. Sirviéndose de la medición por espectrofotometría de la existencia de destrucción tisular patológica, asociándose a una liberación citoplasmática de lactato deshidrogenasa en el medio salival analizado.

Además de la presencia, también el seguimiento de los tratamientos para el mantenimiento de la enfermedad periodontal. Si estos eran efectivos y cuantificables en los pacientes, presentando una lactato deshidrogenasa disminuida tras dicho tratamiento.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico cuasi experimental, por presentar grupos de sujetos seleccionados en base a unos estrictos criterios de inclusión y exclusión, es decir no aleatorio. Y

longitudinal prospectivo, por analizar datos y variables en base a tiempos clínicos marcados por los objetivos del desarrollo de la investigación.

El estudio se realizó sobre 10 pacientes sanos, como grupo control, y 10 pacientes con evidencia clínica y radiológica de enfermedad periodontal, entre 30 y 65 años.

Para grupo control se eligieron unos índices y examen periodontal básico buscando que presentasen buenos índices de higiene y profundidad al sondaje. Y para grupo periodontal, la EP fue diagnosticada en base a profundidad al sondaje, nivel de inserción clínica, índices higiene oral y cálculo, sangrado al sondaje, principalmente.

La variable principal fue concentración (U/L) de LDH para determinar y analizar la actividad entre los diferentes grupos. El número de muestras realizadas fue 30 sobre 20 pacientes, contemplando a su vez 3 ensayos por muestra realizada (T=90).

## **RESULTADOS**

Tras los análisis realizados se determinó que los pacientes sanos obtenían valores entre 100'95–250'79 U/L, los pacientes periodontales antes de tratamiento 146'03–341'9 U/L y después 120'317–283'492 U/L.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Los resultados ofrecen la visión de que existe una diferencia significativa entre pacientes periodontales con el grupo control. A su vez, también el tratamiento periodontal redujo la actividad enzimática. Los autores De la Peña VA et al. 2004-2007; Leiva-Huerta ER et al. 2000; Nomura Y et al. 2006-2012; Yoshie H et al. 2007, concluyen en la misma dirección. Confirman la existencia de estas diferencias bien entre pacientes sanos y periodontales, así como antes y después del tratamiento; y por ello es considerado uno de los biomarcadores enzimáticos a utilizar.

Por todo ello y en base a la investigación realizada, se concluye que el estudio de la lactato deshidrogenasa salival mediante espectrofotometría se trata de un buen método predictivo para diagnóstico o seguimiento de la evolución y mantenimiento de la enfermedad periodontal objetivamente. Pudiendo servirse ésta como un punto de partida al desarrollo de un protocolo más preciso en conjunto a otros biomarcadores.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sexton WM, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson III DR, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol* 2011;38:434-41.
2. De La Peña VA, Dios PD, Rodríguez-Núñez I, Rodríguez-Segade S. Effect of ultrasonic scaling on salivary lactate dehydrogenase. *Am J Dent* 2005;18(2):113-5.
3. Nomura Y, Shimada Y, Hanada N, Numabe Y, Kamoi K, Sato T, et al. Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis. *Arch Oral Biol* 2012;57(4):413-20.
4. De la Peña VA, Diz-Dios P, Lojo-Rocamonde S, Tojo-Sierra R, Rodríguez-Segade S. A standardised protocol for the quantification of lactate dehydrogenase activity in saliva. *Arch Oral Biol*. 2004 Jan;49(1):23-7.

# ESTABLISHMENT OF AN IMMUNOREGULATORY GENE EXPRESSION SCORE AS PROGNOSTIC BIOMARKER FOR RESECTABLE STAGES OF LUNG ADENOCARCINOMA

*Andrea Moreno Manuel*

## INTRODUCCIÓN

Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) accounts for 80% of lung cancer cases, and adenocarcinoma is one of its major histological subtypes. It is known that the immune system plays a key role in tumour development, thus a better understanding of immune surveillance and tumour microenvironment can lead to the development of new therapies. This research consists in analysing immuncheckpoint genes as potential prognostic biomarkers of early-stage lung adenocarcinoma patients.

## MATERIALS AND METHODS

The expression of eight genes involved in immune-regulation (PD-L1, PD-L2, IDO-1, IDO-2, ICOS-LG, CD5, CD6 and CD200) was analysed by RTqPCR in 87 paired fresh-frozen tumour and normal tissue NSCLC samples. Relative gene expression was calculated by Pfaffl formulae using ACTB, CDKN1B and GUSB as endogenous controls. Correlations between clinico-pathological and analytical variables were determined by non-parametric tests. A three gene score was calculated following the Z-score method, which consists in quantifying each gene influence on survival. Survival was assessed by Cox regression, and significant analyses ( $p < 0.05$ ) were represented with Kaplan-Meier curves (log-rank test) after data dichotomization by taking the median as a cut-off value.

## RESULTS

The patient cohort consisted mainly in males, current or former smokers, and was characterized by a median age of 65 years and a good performance status (PS=0) in 77% of the patients. Regarding correlations between clinico-pathological variables and gene expression, a higher expression of PD-L2 was found in poorly differentiated tumours ( $p = 0.010$ ) and lower IDO-2 expression in smokers ( $p = 0.010$ ). An association of improved overall survival (OS) and relapse-free survival (RFS) was observed in patients with higher PD-L1, IDO-1 and IDO-2 expression levels. A gene expression score, which comprised these three genes was called PDIDO Score and was calculated according to the formula:  $0.179 * PD-L1 + 0.173 * IDO-1 + 0.097 * IDO-2$ , whose coefficients were obtained after quantification of their influence on survival. Patients with higher PDIDO Score levels showed improved RFS (18.87 vs. NR months;  $p = 0.001$ ) and OS (29.83

vs. NR months;  $p=0.0002$ ). A multivariate analysis demonstrated that the score could be established as an independent prognostic biomarker of RFS (HR=0.274; 95% CI; 0.126-0.593;  $p=0.001$ ) and OS (HR=0.267; 95% CI, 0.113-0.630;  $p=0.003$ ) in lung adenocarcinoma.

## DISCUSSION / CONCLUSIONS

The PDIDO score allows patients to be classified into two prognostic groups very significantly, as gene signatures have been reported to be stronger biomarkers than genes alone [1,2]. In this case, the PDIDO score is formed by three molecules of two important immunoregulatory pathways in cancer, PD-1 and IDO pathways [3]. Although these genes individually encode inhibitory molecules, this score allows identification of inflamed tumours, which present infiltration by immune cells. Hence, they are detected and destroyed by the immune system. These results support previous findings in our lab [4], which reported that inflamed tumours are associated with a stronger immune response, meaning better patient prognosis.

In summary, analysing the immunoregulatory gene expression in early-stage NSCLC adenocarcinomas has allowed the PDIDO Score to be established as an independent prognostic biomarker of RFS and OS.

Supported by grants from FEDER and PI12-02838 and PI15-00753 from ISCIII.

## BIBLIOGRAPHY

1. Usó M, Jantus-Lewintre E, Calabuig-Fariñas S, Blasco A, García del Olmo E, Guijarro R et al. Analysis of the prognostic role of an immune checkpoint score in resected non-small cell lung cancer patients. *Oncolmunology*. 2016;6(1):e1260214.
2. Lossos I, Czerwinski D, Alizadeh A, Wechser M, Tibshirani R, Botstein D et al. Prediction of Survival in Diffuse Large-B-Cell Lymphoma Based on the Expression of Six Genes. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(18):1828-1837.
3. Spranger S, Spaapen R, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha T et al. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Science Translational Medicine*. 2013;5(200):200ra116.
4. Usó M, Jantus-Lewintre E, Bremnes R, Calabuig S, Blasco A, Pastor E et al. Analysis of the immune microenvironment in resected non-small cell lung cancer: the prognostic value of different T lymphocyte markers. *Oncotarget*. 2016;7(33):52849-52861.

# LA NEOANGIOGÉNESIS EN EL MENINGIOMA. SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

*María González Bisquert*

## INTRODUCCIÓN.

El meningioma (MN) es el tumor primario intracraneal más frecuente en la edad adulta, con afectación preferencial por la mujer. Es habitualmente benigno y la OMS lo clasifica en 3 grados en función de su histología en relación a su agresividad. Aunque se sabe que la neoangiogénesis es un proceso necesario para proporcionar nutrientes y oxígeno a las neoplasias, no son abundantes los trabajos sobre la relevancia de los procesos simultáneos a esta neoangiogénesis y su impacto pronóstico en los pacientes afectados de MN. Por esta razón, nos proponemos realizar una revisión bibliográfica sobre la neoangiogénesis en el MN, su determinación, sus consecuencias en el tratamiento y sus implicaciones pronósticas en el MN.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En esta revisión obtuvimos la bibliografía en el buscador PubMed del National Center for Biotechnology Information. Se realizaron 2 búsquedas con las palabras clave meningiomas hypoxia y meningiomas angiogenesis. Los criterios de inclusión en el estudio fueron: que los artículos estuvieran publicados en los últimos 5 años, que se dispusiera de acceso desde la conexión de la UV y que, además, el idioma fuera inglés o español. Se excluyeron adicionalmente los textos sin factor impacto, tesis doctorales y los case report y correspondence. Se realizó una lectura exhaustiva de los abstracts y se descartaron aquellos cuya temática principal fuera el abordaje quirúrgico. De la selección final se extrajeron los resultados.

## RESULTADOS

La búsqueda Meningiomas hypoxia proporcionó 50 resultados, tras los filtros aplicados quedaron 12. Con la búsqueda Meningiomas neoangiogenesis: obtuvimos 134 resultados. Tras aplicar los filtros oportunos y criterios de exclusión quedaron 16. De la lectura detallada de los artículos se extrae el papel relevante de VEGF, concretamente la isoforma A en la angiogénesis. Su expresión se regula por HIF1A, la familia de TGF y la hipoxia entre otros. Artículos recientes sugieren miRNAs implicados también en esta regulación, lo que ampliaría las terapias antiangiogénicas, que hasta el momento no han demostrado gran eficacia ya que los estudios son limitados, hacia estas dianas. La densidad de vasos se asocia con el grado histológico de los MN y por tanto con el pronóstico si bien su importancia en el grado I todavía no está clara.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El estudio de la angiogénesis tumoral en el MN ha perdido relevancia en los últimos años. Esto podría deberse a la falta de repercusión sobre la evolución de los pacientes con las terapias antiangiogénicas ensayadas. Las terapias combinadas resultan más eficaces aunque parece necesario mejorar la selección de casos que podrían beneficiarse de sus efectos. El análisis detallado de las moléculas que se interrelacionan entre respuesta a hipoxia y neoangiogénesis en el meningioma puede ayudar al diseño de futuros estudios que mejoren la predicción de agresividad y la respuesta a terapias.

## BIBLIOGRAFÍA

Ling C, Pouget C, Rech F, Pflaum R, Treffel M, Bielle F, et al. Endothelial Cell Hypertrophy and Microvascular Proliferation in Meningiomas Are Correlated with Higher Histological Grade and Shorter Progression-Free Survival. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016;75(12):1160-1170

Karsy M, Guan J, Cohen A, Colman H, Jensen RL. Medical Management of Meningiomas: Current Status, Failed Treatments, and Promising Horizons. *Neurosurg Clin N Am*. 2016;27(2):249-60.



# COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN PROGRAMA DE EJERCICIO INTRADIÁLISIS FRENTE A UN PROGRAMA DE EJERCICIO DOMICILIARIO SOBRE MACADRORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN.

*Erika Meléndez Oliva.*

## INTRODUCTION

Cardiovascular disease is the main cause of morbidity and mortality in patients with chronic kidney disease, and its incidence is not justified in these patients by traditional risk factors. Recent studies point to oxidative stress and inflammation as new and potential cardiovascular risk factors. There is a correlation between different oxidative stress biomarkers and glomerular filtration rate, worsening the renal function when reactive oxygen species increase.

On the other hand, physical exercise can reduce oxidative stress and inflammatory markers, improving antioxidant defence system and chronic inflammatory state in patients undergoing haemodialysis.

Although some studies have been published with different exercise modalities and duration programs, very few were conducted in this patient population as long-term programs that combine strength and resistance exercises. The first goal of the present study was to evaluate the effect of a four-month duration exercise program that combines strength and resistance exercise on oxidative stress and inflammation biomarkers in patients undergoing haemodialysis maintenance therapy. As a second objective, the current study investigates whether there are differences in the results obtained between a group of patients who performed the intradialysis exercise and another who does it at home.

## MATERIALS AND METHODS

The study was performed from September 2015 to June 2016. Seventy-one patients were enrolled in this study from Hemodialysis Unit of Manises Hospital, Valencia. The study received approval from the Ethics Committee of Biomedical Research of University and Polytechnic Hospital La Fe of Valencia (register number 2016/0123), and all patients gave written informed consent to participate. Sample patients were randomized in two groups, one who did intradialytic exercise program (Group of intradialytic intervention; n=36), and other who performed home-based exercise program (Group of home-based intervention: n=35).

Both exercise programs, intradialytic and home-based, had a length of four months. Frequency of exercise sessions were three times a week with duration of sixty minutes each one. Both programs combined strength and resistance exercise.

For the analysis of oxidative stress and inflammation the following markers were determined in plasma: Malondialdehyde (MDA), carbonylated proteins, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 y PCR. They were determined before and after the exercise program to assess the effect of the exercise on these markers.

For the statistical analysis of the results, the distribution of variables was examined using the Kolmogorov-Smirnov test or the Shapiro-Wilk test as needed. The results were expressed as a mean  $\pm$  standard deviation for variables distributed normally and as median and ranges in case of variables not distributed normally. The difference in variables between the groups was analyzed using a variance analysis of repeated measurements of two factors. This analysis was used statistical program SPSS 20.0.

## RESULTS

IL-6 decreased statistically significantly in the intradialysis group, while PCR decreased significantly in the group that performed the exercise at home. The rest of the markers analyzed did not suffer a significant change after the exercise.

## DISCUSSION / CONCLUSIONS

The results obtained are consistent with those published by other authors, confirming that the combined exercise of strength and long-term resistance has an anti-inflammatory effect in patients undergoing a hemodialysis maintenance therapy, which results in a lower risk of cardiovascular disease. Longer-lasting studies would be necessary to assess a longer-term beneficial effect on markers of oxidative stress.

## BIBLIOGRAPHY

1. Dogaru CB, Duta C. Chronic Kidney disease and oxidative stress. *AMT*, v20, no. 1, 2015, p 64.
2. Wilund KR, Tomayko Ej, Wu PT, Ryong Chung H, Vallurupalli S, Lakshminarayann B, Fernhall B: Intradialytic exercise training reduce stress and epicardial fat: a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 25:2695-2701, 2010.
3. Marta Esgalhado, Milena Barcza Stockler-Pinto, Ludmila Ferreira Medeiros de França Cardozo, Cinthia Costa, Jorge Eduardo Barboza, Denise Mafra. Effect of acute intradialytic strength physical exercise on oxidative stress and inflammatory responses in hemodialysis

patients. *Kidney Research and Clinical Practice*. Volume 34, Issue 1, March 2015, Pages 35-40.

4. 6. Seong EY. Acute intradialytic exercise and oxidative stress in hemodialysis patients. *Kidney Res Clin Pract* 34 (2015) 1-3.

# COEXISTENCIA DE MOLA HIDATIFORME COMPLETA CON GESTACIÓN NORMAL.

Hui Chen

## INTRODUCCIÓN

La mola hidatiforme se refiere a un embarazo anormal no viable por definición, caracterizado por diversos grados de proliferación trofoblástica y edema de las vellosidades placentarias asociadas o no a feto/embrión. Un embarazo gemelar consistente en la coexistencia de una mola hidatiforme completa con una gestación normal es una entidad sumamente rara (1/22.000-100.000 gestaciones), donde el riesgo de complicaciones maternas graves es mucho mayor. Por ello, no es de extrañar que tanto el manejo como la posibilidad de éxito sean discutidos ante la escasez de casos reportados y la inexistencia de recomendaciones prefijadas. Se presenta, por tanto, el caso de una paciente con gestación normal junto a una gestación molar coexistente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción del caso clínico y revisión bibliográfica.

## RESULTADOS

Paciente de 38 años, nuligesta, con esterilidad primaria de factor masculino fue sometida a FIV con microinyección espermática (ICSI) para conseguir la gestación. De los 7 óvulos maduros extraídos y fecundados mediante ICSI se le transfirieron 2 blastocistos vitrificándose los otros 5. La paciente quedó gestante y, en el estudio ecográfico de la semana 12 se objetivó una gestación con placenta y feto dentro de la normalidad, pero, llamó la atención la presencia de una segunda placenta de aspecto molar. Tras comentar con la pareja la hipótesis diagnóstica (coexistencia de una gestación normal con mola hidatiforme completa) se decidió realizar una biopsia corial para confirmar el diagnóstico. El resultado genético pone en manifiesto un cariotipo 46, XX en la placenta de la gestación normal y un cariotipo 92, XXXX en la placenta molar. Asimismo, el estudio anatomopatológico confirma la coexistencia de un trofoblasto molar y normal. Tras discutir con la pareja las diferentes opciones y riesgos se decidió continuar con la gestación, la cual continúa sin incidencias reseñables hasta la semana 34, en la que se decidió finalizar la gestación mediante cesárea electiva naciendo una niña sana con un peso de 2100 gramos. La niña evolucionó sin incidencias a nivel neonatal y la madre no ha presentado ninguna complicación durante el periodo postnatal, aun sí, se le hará un seguimiento durante un año para descartar enfermedad persistente.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Este tipo de gestación gemelar, además de ser muy infrecuente, sus posibles complicaciones médicas graves (metrorragia masiva, preeclampsia, hiperémesis gravídica, enfermedad trofoblástica persistente...) junto a la inviabilidad per se de la gestación molar casi nunca permitían que llegasen a término. Sin embargo, actualmente, gracias al diagnóstico ecográfico precoz y el desarrollo del ámbito sanitario, existen casos con buen pronóstico y evidencia científica de éxito, como es el nuestro; así como posibilidades de prevención, control y/o manejo de las posibles complicaciones ante y postparto que pueda suponer.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lurain JR. Gestational trophoblastic disease I: Epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;203(6):531–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2010.06.073>
2. Savage JL, Maturen KE, Mowers EL, Pasque KB, Wasnik AP, Dalton VK, et al. Sonographic diagnosis of partial versus complete molar pregnancy: A reappraisal. *J Clin Ultrasound*. 2017;45(2):72–8.
3. Suksai M, Suwanrath C, Kor-anantakul O, Geater A, Hanprasertpong T, Atjimakul T, et al. Complete hydatidiform mole with co-existing fetus: Predictors of live birth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2017;212:1–8.

# ESTUDIO DE MARCADORES DE SENESCENCIA EN CÉLULAS HUVEC TRATADAS CON FÁRMACOS ANTI-VIH.

*Laia Abad Jordá*

## INTRODUCCIÓN.

La terapia antirretroviral combinada, empleada en el tratamiento de la infección por VIH-1, se ha asociado con diversos efectos adversos, incluyendo el deterioro prematuro de los tejidos y una mayor prevalencia de enfermedades relacionadas con la edad. Los mecanismos involucrados no están claros, pero evidencias recientes apuntan a la posible inducción de una senescencia celular prematura por algunos fármacos antirretrovirales. El objetivo de este trabajo es analizar la participación de Efavirenz, Rilpivirina, Raltegravir y Darunavir, fármacos antirretrovirales que actúan a distintos niveles del ciclo de replicación del VIH-1, en el proceso de senescencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La línea de células primarias humanas HUVEC ("Human Umbilical Vein Endothelial Cells") se trató con concentraciones clínicamente relevantes de Efavirenz (5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ), Rilpivirina (0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{M}$ ), Raltegravir (0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ ) o Darunavir (5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. Se estudiaron la morfología celular (microscopía en campo claro), la viabilidad (ensayo colorimétrico de MTT) y la expresión de marcadores de senescencia (p53, STAT3, MCP-1, IL-6, IGFBP3 y MIP-3a, mediante RT-PCR cuantitativa y/o Western blot). Los datos (porcentaje del control, siendo el valor obtenido en las células sin tratamiento considerado 100%) fueron analizados utilizando el software "GraphPad Prism v.6" con la prueba "t de Student".

## RESULTADOS

Efavirenz induce la expresión génica (p53, STAT3, MCP-1, IL-6, IGFBP3 y MIP-3a) y proteica (p53 y STAT3) de marcadores de senescencia, y produce disminución de la viabilidad celular sugiriendo una disminución en la función mitocondrial. En el análisis morfológico se observa el desarrollo de un fenotipo senescente prematuro, y una menor proliferación y supervivencia celular, de forma concentración-dependiente y similar a la inducida por el control positivo de inducción de senescencia, Etoposido, lo que ocurre en concordancia con el análisis de viabilidad celular en el que se observa una disminución para EFV 25  $\mu\text{M}$  similar a la de Etoposido. Los demás fármacos analizados no producen efectos significativos, excepto Rilpivirina en el análisis de la expresión proteica (p53 y STAT3), a pesar de no obtener resultados significativos en los otros parámetros.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo contribuyen a un envejecimiento prematuro, y estudios anteriores han demostrado que Efavirenz los produce en células hepáticas. Las células HUVEC tienen una importante contribución en la inflamación crónica y el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad; después de un cierto número de divisiones entran en un estado de senescencia con características propias como el aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias. Como conclusión, en células HUVEC, Efavirenz a concentraciones clínicamente relevantes induce la expresión de marcadores de senescencia y produce disminución de la viabilidad celular.

## BIBLIOGRAFÍA

Blas-García A, Polo M, Alegre F, Funes HA, Martínez E, Apostolova N, et al. Lack of mitochondrial toxicity of darunavir, raltegravir and rilpivirine in neurons and hepatocytes: a comparison with efavirenz. *J Antimicrob Chemother.* 1 de noviembre de 2014;69(11):2995-3000.

Caron M, Auclair M, Vissian A, Vigouroux C, Capeau J. Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues. *Antivir Ther (Lond).* 2008;13(1):27-38.

Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* junio de 2014;69 Suppl 1:S4-9.

Pantsulaia I, Ciszewski WM, Niewiarowska J. Senescent endothelial cells: Potential modulators of immunosenescence and ageing. *Ageing Res Rev.* agosto de 2016;29:13-25.

# ESTUDIO DE ALTERACIONES DEL SUEÑO EN UN MODELO DE DOLOR CRÓNICO EN RATA.

*Gloria Alfosea Cuadrado.*

## INTRODUCCIÓN.

La patogénesis de la fibromialgia es desconocida. Los principales síntomas incluyen dolor, depresión y alteraciones del sueño con una alta comorbilidad, lo que sugiere una alteración del sistema monoaminérgico como origen común de los síntomas. El modelo de mialgia inducida por reserpina en rata produce una depleción temporal de monoaminas que se acompaña de una disminución de los umbrales de dolor y sintomatología depresiva. El objetivo del presente trabajo es estudiar la existencia de alteraciones del sueño en este modelo, y analizar el papel que los núcleos monoaminérgicos Rafe Dorsal (DR) y Locus Coeruleus (LC) pueden tener en el desarrollo de estas alteraciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las alteraciones del sueño se estudiaron mediante el registro de potenciales de campo local a través de la implantación de electrodos crónicos en hipocampo (CA1) y en la corteza somatosensorial primaria, así como electrodos de electromiograma en la nuca. La actividad de DR y LC se evaluó mediante la inmunodetección fluorescente de Fos.

## RESULTADOS

Existe una alteración de la arquitectura del sueño en las ratas sometidas al modelo de mialgia inducida por reserpina. Durante la implantación del modelo se observa un aumento significativo de sueño REM, con predominio de ondas theta y atonía. En las semanas posteriores el patrón de sueño cambia, existiendo un predominio de sueño de ondas lentas con escasas spindles, y un aumento significativo de las transiciones entre estados de sueño. El análisis espectral muestra la presencia de intrusiones de ondas alpha durante el sueño de ondas lentas. Por otro lado, el análisis de Fos muestra un aumento de la actividad de DR y una disminución de la actividad de LC a los 5 y 15 días de la implantación del modelo.



## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El modelo de mialgia inducida por reserpina produce alteraciones en los patrones de sueño. Estas alteraciones podrían estar mediadas por los cambios en los patrones de activación observados en DR y LC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Moldofsky H. The significance of dysfunctions of the sleeping/waking brain to the pathogenesis and treatment of fibromyalgia syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 2009; 35(2):275–83.
2. Nagakura Y, Oe T, Aoki T, Matsuoka N. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. *Pain.* 2009; 146(1-2):26–33.
3. Li S-J, Cui S-Y, Zhang X-Q, Bin Yu, Sheng Z-F, Huang Y-L, et al. PKC in rat dorsal raphe nucleus plays a key role in sleep–wake regulation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015; 63(C):47–53.
4. Monti JM, Lagos P, Jantos H, Torterolo P. Increased REM sleep after intra-locus coeruleus nucleus microinjection of melanin-concentrating hormone (MCH) in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015; 56(C):185–8.

# EOSINOPENIA AFTER MYOCARDIAL INFARCTION MIRRORS EOSINOPHIL MIGRATION TO THE INFARCTED MYOCARDIUM. ROLE OF EOTAXIN-1

*María Ortega Albiach*

## INTRODUCCIÓN

Deregulation of immune system has been traditionally associated with extensive infarct size and adverse cardiac events after myocardial infarction (MI). However, little attention has been paid to eosinophils, a potent subset of pro-inflammatory innate immune cells. We aimed to elucidate the implication of eosinophils after MI in three different scenarios: 1) the time-course in whole blood of patients with MI. Histological and morphometric determination of eosinophils in 2) myocardial samples from a swine model of acute MI and 3) in myocardial autopsies from patients with chronic MI.

## MATERIAL Y MÉTODOS

A prospective study that involved 520 patients with a first ST-segment elevation MI was performed. Serial measurements of circulating eosinophil counts were analysed at admission and at 12, 24, 48, 72, and 96h. 2) Swine model of MI was performed by transitory 90-min occlusion followed by 3-days, 7-days and 1-month reperfusion. The presence of eosinophils in the infarcted myocardium was histologically quantified by immunohistochemistry using anti-major eosinophil cationic protein and by Luna's staining, specific for eosinophil granules. Eotaxin-1, a eosinophil-specific molecule implicated in eosinophil trafficking to the myocardium, was analysed. 3) In human samples of autopsies from chronic MI patients, eosinophils were also assessed.

## RESULTADOS

In patients eosinophil count dramatically decreased 12h after reperfusion in comparison to the arrival; afterwards, it progressively increased until reaching its maximum value 96h after reperfusion. 2) In porcine myocardial samples, the number of eosinophils peaked 3-days (312.78 cells/mm<sup>2</sup>) and 7-days (254.09 cells/mm<sup>2</sup>) after reperfusion, while being reduced 1-month after reperfusion (127.04 cells/mm<sup>2</sup> vs control: 60 cells/mm<sup>2</sup>). This process can be mediated by eotaxin-1 up-regulation. 3) In samples obtained from autopsies, the presence of eosinophils was also detected in the myocardium from chronic MI patients (305.51 cells/mm<sup>2</sup> vs. control: 35 cells/mm<sup>2</sup>).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Eosinophils might be involved in the pathophysiology of reperfused MI. The decrease in circulating eosinophil count after reperfusion mirrors their migration into the infarcted myocardium, as reflected by the presence of eosinophils in heart samples from swine and patients. Further studies are needed to understand the pathogenic role of eosinophils in this context.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Husser O., Bodi V., Sanchis J., Nunez J., Mainar L., Chorro FJ., Lopez-Lereu MP., Monmeneu JV., Chaustre F., Forteza MJ., Trapero I., Dasi F., Benet I., Riegger GAJ., Llacer A.. White blood cell subtypes after STEMI: temporal evolution, association with cardiac magnetic resonance – derived infarct size and impact on outcome. *Inflammation*. 2011; 34:73-84.
2. Bodí V., Sanchis J., Nuñez J., [Rumiz E.](#), Mainar L., Lopez-Lereu MP., Monmeneu JV., Oltra R., Forteza MJ., Chorro FJ., Llácer A.. Post-reperfusion lymphopenia and microvascular obstruction in ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62: 1109-17.
3. Davoine F., Lacy P.. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front Immunol*. 2014; 5:570.
4. Rios-Navarro C., Hueso L., Miñana G., Nuñez J., Ruiz-Sauri A., Sanz MJ., Canoves J., Chorro FJ., Piqueras L., Bodi V.. Coronary serum obtained after myocardial infarction induces angiogenesis and microvascular obstruction repair. Role of hypoxia-inducible factor-1A. *Rev Esp Cardiol*. 2017; pii: S1885-5857(17)30361-4.

# ESTUDIOS DE MEDICINA REGENERATIVA EN LA RECONSTRUCCIÓN ENDOMETRIAL COMO POSIBLE TRATAMIENTO EN LA INFERTILIDAD FEMENINA.

Yassmin Medina Laver.

## INTRODUCCIÓN

El endometrio es un tejido fundamental dentro del proceso reproductivo y participa en eventos importantes como el transporte espermático, la implantación del embrión y la nutrición fetal. A lo largo de estos últimos años se han identificado poblaciones de células madre en el endometrio implicadas en procesos del ciclo menstrual que influyen directamente a la fertilidad femenina. Sin embargo, existen una serie de patologías relacionadas con la actividad de las células madre endometriales que afectan a la función del tejido, conllevando a una infertilidad en el sexo femenino. Por ello es importante buscar un método alternativo, como puede ser la medicina regenerativa, que pueda paliar este tipo de problemas. El uso de la medicina regenerativa en patologías endometriales ha sido estudiado por numerosos investigadores en los últimos años, por lo que el objetivo de esta revisión es proporcionar una visión general del conocimiento actual de los avances en medicina regenerativa en la reconstrucción endometrial y su potencial aplicación terapéutica para la regulación de la fertilidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión exhaustiva de la literatura utilizando dos bases de datos, *PubMed* y *Google Scholar* para identificar y recuperar información relevante en el campo de la medicina regenerativa en la reconstrucción endometrial usando células madre, desde los estudios iniciales de reconstrucción *in vitro* del endometrio en 1994 (1) hasta los últimos estudios en 2017. Se realizó una revisión narrativa de las publicaciones en inglés utilizando las siguientes palabras clave: *feminine infertility*, *endometrium reconstruction*, *bioengineering uterus*, *stem cells endometrium*.

## RESULTADOS

Describimos los diferentes métodos de uso de la terapia celular y la ingeniería tisular, con células madre de diferente origen, en el tratamiento de patologías endometriales como el síndrome de Asherman, en modelos humanos, murinos y de rata (2, 3, 4). En la ingeniería tisular se han formado andamios de diferente composición derivados de endometrio descelularizado para, posteriormente, recelularizarlo usando células madre autólogas. No obstante, varios autores se han decantado por la terapia celular, donde se trasplantan células madre para regenerar el

endometrio atrofiado. Además, el campo de la medicina regenerativa se ha aplicado en otros tejidos reproductivos disfuncionales, más allá del endometrio, como el ovario y la vagina.

## CONCLUSIONES

La medicina regenerativa, basada en terapias celulares y bioingeniería, es una opción idónea cuando los problemas de infertilidad asociados con la pérdida completa de la estructura y/o función endometrial no pueden tratarse con medicamentos y deben ser tratados por células madres, ya que se han visto buenos resultados de la gestación en los diferentes estudios.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bentin-Ley U, Pedersen B, Lindenberg S, Larsen J, Hamberger L, Horn T. Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *Reproduction*. 1994; 101:327-332.
2. Miyazaki K, Maruyama T. Partial regeneration and reconstruction of the rat uterus through recellularization of a decellularized uterine matrix. *Biomaterials*. 2014; 35:8791–8800.
3. Nagori C, Panchal S, Patel H. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2011; 4:43-48.
4. Santamaria X, Cabanillas S, Cervelló I, Arbona C, Raga F, Ferro J, Palmero J, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. *Human Reproduction*. 2016; 31:1087-1096.

# ESTUDIO DE LA RESERVA OVÁRICA EN LA RECIÉN NACIDA.

María Fontal Carcel

## INTRODUCCIÓN

La reserva ovárica está determinada por la dotación de folículos primordiales presentes en la gónada femenina. Desafortunadamente, el ovario no puede generar nuevos óvulos tras el nacimiento. Esta reserva de folículos determinará en la mujer su vida fértil, existiendo una gran variabilidad entre mujeres adultas. Desconocemos si esta reserva viene determinada desde el nacimiento (número de folículos presentes) o si bien son fenómenos que acontecen en la vida post-natal (aceleren la pérdida de folículos) los que determinaran la longevidad de esta reserva. Por tanto el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la reserva ovárica en recién nacidas para ver si ya en el nacimiento existen diferencias significativas que condicionen la vida fértil de las mujeres.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo realizado en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Hemos estudiado la reserva ovárica de 100 niñas nacidas tras un embarazo de curso fisiológico y un parto a término eutócico. Para el estudio de la reserva ovárica hemos empleado dos técnicas no invasivas: una muestra de sangre del cordón umbilical para determinar la Hormona Anti-Mülleriana (HAM) y un estudio ecográfico tridimensional para establecer el recuento de folículos antrales (RFA) y el volumen ovárico.

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS 19.0 para Windows. Se consideró una significancia estadística cuando  $P < 0.05$ . Se empleó la distribución t (Student) para analizar los datos con una disposición normalmente distribuida, que se presentaron con media y desviación típica. Para los datos que no presentaban una disposición normalmente distribuida se analizaron con el test de Wilcoxon-Mann-Whitney. La prueba  $X^2$  de Pearson (prueba no paramétrica) se empleó para valorar la discrepancia entre grupos. El coeficiente de correlación de Spearman se usó para valorar la correlación entre variables aleatorias.

## RESULTADOS

Hemos determinado los niveles de HAM, RFA y volumen ovárico en todas las niñas estudiadas. Existe una correlación positiva entre los niveles de HAM, RFA y volumen del ovario. La cifra de media HAM en estas pacientes fue de 2.86 (0.1-5.37) ng/mL. Cinco mujeres presentaron cifras bajas de HAM, considerando un punto de corte  $< 0.5$  ng/mL. El RFA medio mediante ecografía

3D fue de  $6.4 \pm 0.7$ . El volumen ovárico medio en estas mujeres fue de  $1.8 \pm 0.9$  ml. Nuevamente, las cinco mujeres con HAM baja presentaron un RFA y volumen ovárico significativamente ( $P < 0.05$ ) inferior a la media.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

En el presente trabajo hemos constatado que ya en el nacimiento existen diferencias significativas en la reserva ovárica de las mujeres. Esto podría tener implicaciones futuras en aquellas niñas que nacen con una reserva inferior a la media, abriendo la puerta a su seguimiento y preservación de su fertilidad en una edad más avanzada si se precisa.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Donnez J, Dolmans MM. Fertility Preservation in Women. *N Engl J Med.* 2017 26;377(17):1657-1665.

Broer SL, Broekmans FJ, Laven JS, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update.* 2014;20(5):688-701.

Kim HH. Markers of ovarian reserve: is it possible to estimate an ovarian age? *Fertil Steril.* 2017;108(6):950-951.

Depmann M, Faddy MJ, van der Schouw YT, et al. The Relationship Between Variation in Size of the Primordial Follicle Pool and Age at Natural Menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(6):E845-51.

# LA INSEMINACIÓN INTRAUTERINA COMO TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN ESPAÑA.

*María Gabriela Trejo*

## INTRODUCCIÓN

La inseminación intrauterina (IIU) es uno de los tratamientos de reproducción asistida más utilizados en el mundo, es de baja complejidad y relativo bajo costo. Consiste en el depósito de espermatozoides previamente capacitados en la cavidad uterina en el período ovulatorio de la paciente con o sin hiperestimulación ovárica controlada. Este tratamiento tiene como objetivo aumentar la fundabilidad de la pareja infértil. Existen dos tipos de IIU: la inseminación homóloga, que se realiza con semen de la pareja de la paciente y la inseminación heteróloga, con semen de un donante. En España el 50.3% de los centros registrados por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad en el último año reportado reportaron 29.550 ciclos de IIU (22.025 de inseminación homóloga y 7.525 de inseminación heteróloga). Actualmente existe controversia en cuanto a sus indicaciones y protocolos, es por esto que el objetivo de esta revisión es recopilar la información publicada al día de hoy.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda exhaustiva en inglés y español sobre los aspectos relacionados a la inseminación intrauterina utilizando PubMed y la base de datos de Google Scholar. Se redactó una revisión bibliográfica narrativa que proporciona un trasfondo general del tema y sus controversias, seguido del conocimiento actualizado y de perspectivas futuras. Se incluyeron publicaciones desde la primera inseminación intrauterina en 1962 hasta los últimos artículos publicados en 2017.

## RESULTADOS

No es sencillo determinar las tasas de embarazo debido a las múltiples indicaciones existentes. Se considera que una pareja con una reserva ovárica normal, al menos una de las trompas permeable y una recuperación espermática de al menos 5 millones de espermias móviles totales debería de tener un rendimiento de 10-20% por intento y hasta de 75% en tasas de embarazo acumuladas luego de 4-6 intentos. La Sociedad Española de Fertilidad reportó una tasa global de gestación de 12.6 % para la inseminación homóloga y de 21% para la inseminación heteróloga. Existen varios factores que pueden mejorar el pronóstico mencionado anteriormente como por ejemplo la ausencia de cirugías pélvicas, la ausencia de patologías



como la endometriosis o un factor tubárico, la edad de la paciente, el número de folículos preovulatorios y la movilidad espermática.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

La inseminación intrauterina debe considerarse como un tratamiento de reproducción asistida de baja complejidad relativamente simple y poco invasivo. Está indicado para una amplia gama de casos de infertilidad; aunque aún no hay un consenso para las indicaciones que más se utiliza son cuando hay subfertilidad masculina, un factor cervical, fallo en la eyaculación e infertilidad de origen desconocido. En España, al igual que en el mundo, la IIU es uno de los tratamientos de reproducción asistida más utilizados. Las complicaciones y riesgos son mínimos, siendo los más graves el embarazo múltiple y el síndrome de hiperestimulación ovárica. Es uno de los tratamientos de menor costo y gran efectividad, tomando en cuenta que las tasas de embarazo acumulativas son aceptables al compararlo con otros tratamientos como la fertilización in vitro. Hoy en día no hay estudios aleatorizados controlados con suficiente poder para evaluar su eficacia y confirmar que pacientes son candidatas a este tratamiento y cual metodología será la mejor para corregir el mayor número posible de casos de infertilidad.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Duran HE, Morshedi M, Kruger T, Oehninger S. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Hum Reprod Update* 2002 Jul-Aug;8(4):373-384.
- (2) European IVF-monitoring Consortium (EIM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, de Mouzon J, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2017 Oct 1;32(10):1957-1973.
- (3) Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet* 2000 Jan 1;355(9197):13-18.
- (4) Prados F, Cuevas I, Vidal E, de Andrés M, Hernández J, Zamora S, et al. Registro de inseminación artificial de la Sociedad Española de Fertilidad de los años 2012 y 2013. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica* 2017 Oct;4:136-142.

# IMPLICACIÓN DE LA CDH2 Y LA AFADINA EN LA REGULACIÓN DE LA GENERACIÓN DE LAS NEURONAS DE PROYECCIÓN DE LA CORTEZA CEREBRAL

*Marta Nadal Muñoz*

## INTRODUCCIÓN

La neocorteza controla capacidades cognitivas como el procesado de la información y el lenguaje. A pesar de los grandes progresos alcanzados sobre el desarrollo de la neocorteza, se desconoce cómo los progenitores corticales generan toda la diversidad celular cortical. La teoría prevalente asumía la existencia de un único tipo de progenitor neural cuyo potencial cambia y se restringe a lo largo del tiempo para producir los diferentes tipos neurales corticales. No obstante, recientemente se ha descrito la existencia de unos progenitores neurales cuyo potencial está restringido para producir neuronas de proyección de capas altas, que son neuronas evolutivamente más recientes y cuyo número ha aumentado notablemente en primates (1). Otros trabajos recientes corroboran la existencia de diversidad de progenitores en la neocorteza en desarrollo (2,3).

La megalencefalia es un incremento en el tamaño del cerebro que se ha asociado con aumentos en la proliferación de progenitores neurales y afecta, entre otros, a una subpoblación de niños en el espectro autista. Mutaciones en diferentes moléculas de adhesión, incluida la Cdh2, han sido encontradas en pacientes con autismo. Resultados recientes, utilizando ratones mutantes condicionales, muestran que la perturbación de proteínas de adhesión celular (Cdh2 y Afadina) en todas las células corticales produce, entre otras alteraciones, megalencefalia por aumento de la corteza cerebral (4). El análisis más detallado de estos ratones mutantes muestra cómo dicho aumento en el tamaño de la corteza parece deberse a un incremento específico en el número de neuronas de proyección que expresan marcadores de capas altas.

Estos antecedentes han conducido a formular la hipótesis de que la **perturbación de Cdh2 y Afadina en un tipo concreto de progenitores corticales (los implicados en la producción de neuronas de capas altas) estaría implicada en el incremento del tamaño del cerebro en dichos animales**, donde básicamente se observan aumentos en el número de neuronas que expresan marcadores de capas altas. Esta alteración que implica aumento del tamaño de la neocorteza podría causar déficits sociales y cognitivos similares a los observados en pacientes de autismo con megalencefalia cuyo estudio se plantea a largo plazo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para probar nuestra hipótesis estamos investigando cómo la perturbación específica de estas proteínas de adhesión celular en los progenitores implicados en la producción de neuronas de capas altas afecta a su comportamiento proliferativo, así como si dicha alteración se traduce en incrementos en el número de neuronas de proyección de capas altas en cerebros postnatales. La utilización de la técnica de la electroporación en útero permite la inactivación en mosaico de la expresión de Cdh2 y Afadina en los progenitores neurales, utilizando plásmidos de DNA que expresan CRE-recombinasa y GFP en ratones floxeados para dichas proteínas. El uso de diferentes promotores regulando la expresión de la CRE-recombinasa permite alterar la expresión de nuestras proteínas de adhesión específicamente en progenitores implicados en la producción de neuronas de proyección de capas altas y compararlo con el uso de promotores generales. Para observar los resultados combinamos la técnica descrita con inmunohistoquímica y microscopía confocal.

## **RESULTADOS**

Experimentos preliminares muestran cómo la expresión de CRE-recombinasa mediante esta técnica en las células progenitoras de los ratones floxeados es suficiente para inactivar la expresión de nuestras proteínas de adhesión y cómo dicha inactivación utilizando esta estrategia parecen reproducir las alteraciones en proliferación observadas en los ratones mutantes condicionales de corteza cerebral. Experimentos para validar incrementos en la producción de neuronas de proyección de capas altas en individuos postnatales están en curso.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos durante esta investigación ayudan a aportar luz a un proceso que en la actualidad permanece todavía elusivo como es el control de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la generación de diversidad celular en la neocorteza, y cómo los progenitores corticales contribuyen a ello. Nuestros resultados, aunque preliminares, parecen indicar que la perturbación de nuestras proteínas de adhesión en estado de progenitor reproduce el fenotipo de sobreproliferación observado en los ratones condicionales y proporciona una herramienta para estudiar efectos en diferentes tipos de progenitores. Estos resultados servirán como prueba de concepto para un estudio detallado de los mecanismos implicados en la regulación específica de la producción de un tipo muy importante de neuronas de proyección como son las neuronas de capas altas. Estas neuronas están implicadas en la conexión cortico-cortical y alteraciones en dichas células se han encontrado en pacientes que sufren diferentes desórdenes neurológicos, incluyendo autismo, esquizofrenia o retraso mental.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Franco SJ, Gil-Sanz C, Martínez-Garay I, Espinosa A, Harkins-Perry SR, Ramos C, et al. Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science*. 2012 Aug 10;337(6095):746–9.
2. Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI, Obernier K, Romero R, Cepko CL, et al. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*. 2015 Jun 18;161(7):1644–55.
3. García-Moreno F, Molnár Z. Subset of early radial glial progenitors that contribute to the development of callosal neurons is absent from avian brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Aug 25.
4. Gil-Sanz C, Landeira B, Ramos C, Costa MR, Müller U. Proliferative defects and formation of a double cortex in mice lacking *mltt4* and *cdh2* in the dorsal telencephalon. *J Neurosci*. 2014 Aug 6;34(32):10475–87.