



**VII CONGRESO DE  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

# **LIBRO DE RESÚMENES**

**CIB2019**

**6, 7 y 8 de  
febrero de 2019**

Aula Magna, Facultat de  
Medicina i Odontologia de la  
Universitat de València

# PÓSTERES Y COMUNICACIONES ORALES

## PÓSTERES, TURNO 1

6 de febrero, 10.00-10.30h

- **TELOMERE LENGHT IN OVARIAN CORTEX CELLS OF PATIENTS WITH CANCER AND HEALTHY WOMEN.** *Mateu-Pascual JM, Soler I, Garcia-Velasco JA, Varela E, Diaz-García C.*
- **REPROGRAMACIÓN CARDIACA DIRECTA: EL GRAN RETO DE LA MEDICINA REGENERATIVA.** *Ribes L, González A.*
- **EFFECTO DE LA PRESENCIA DE GLIOBLASTOMA SOBRE EL PROCESO DE GENERACIÓN DE NUEVAS NEURONAS EN CEREBROS ADULTOS.** *Ripari LB, Bodoque Villar R, Guerrero Cazares H, de la Rosa Prieto C.*
- **LIPID BINDING PROPERTIES OF LRRK2.** *Martinez A, Ho F, Kortholt A, Poolman B.*

## COMUNICACIONES ORALES, TURNO 1

6 de febrero, 12.45-13.45h

- **NEW MODEL TO EXTRACT THE FINGERPRINT OF SIMULTANEOUS MULTIPLE INFECTIONS FROM THE GENETIC DATA** *Campo I and Vaughan Timothy.*
- **STUDY OF THE CONTRIBUTION OF GENETIC MATERIAL CHANGES IN PAIRED NEUROBLASTOMA TUMORS.** *Fernandez Blanco B, Berbegall AP, Martín Vañó S, Blanquer Maceiras M, Noguera R.*
- **CRONO-ONCOLOGÍA: NUEVO ABORDAJE DEL CÁNCER DE MAMA.** *Retuerta J, Jiménez C, Fajardo D, Martínez FJ, Sanfeliú N, González C, Bolado D.*
- **EFFECT OF MICROVASCULAR OBSTRUCTION ON THE CELLULAR MATRIX ON A SWINE MODEL OF REPERFUSED MYOCARDIAL INFARCTION.** *Anna Teruel-Sanchís, Maria Ortega, Cesar Rios-Navarro, Jose Gavara, Victor Marcos-Garces, Ana Diaz, Gema Miñana, Francisco J Chorro, Vicente Bodi, Amparo Ruiz-Sauri.*
- **EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA SUBUNIDAD Gal $\alpha$ 0 DE LA PROTEÍNA G EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.** *Roldán-Sastre A, Aguado C, Moreno-Martínez A, Martín-Belmonte A, Alfaro-Ruiz R, Luján R.*

## PÓSTERES, TURNO 2

6 de febrero, 18.15-18.45h

- **NO GENDER DIFFERENCES IN THE CORNEAL ENDOTHELIAL CELL DENSITY AND MORPHOLOGY OF YOUNG EMMETROPIC SUBJECTS.** *Bedoya-Jiménez EJ, Sanchis-Gimeno JA.*
- **THE DROSOPHILA NEPHROCYTE AS A MODEL FOR KIDNEY FAILURE IN TYPE 2 DIABETES.** *Ozinski LL, Artero R, Selma-Soriano E.*
- **APLICACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS RADIODIAGNÓSTICAS EN REUMATOLOGÍA. REVISIÓN DE 4 CASOS DE AORTITIS INFLAMATORIA NO INFECCIOSA.** *Urios Pastor GE, Pastor Cubillo MD, Campos Fernández C, Rueda Cid A, Molina Almela C, Lerma Garrido JJ, Calvo Catalá J.*
- **BACTEROIDES UNIFORMIS CECT 7771 COMBINED WITH FIBER-ENRICHED DIET AMELIORATES METABOLIC AND IMMUNE ALTERATIONS IN DIET-INDUCED OBESE MICE.** *Bullich Vilarrubias C, Romaní Pérez M, López Almela I, Isabel Campillo, Eva M. Gómez.*

## COMUNICACIONES ORALES, TURNO 2

6 de febrero, 18.45-20.00h

- **MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE DYNAMIC CHANGES OF THE INTERSTITIUM AFTER REPERFUSED MYOCARDIAL INFARCTION.** *Maria Ortega, Amparo Ruiz-Sauri, Cesar Rios-Navarro, Jose Gavara, Victor Marcos-Garces, Ana Diaz, Gema Miñana, Francisco J Chorro, Vicente Bodi.*
- **CHARACTERIZATION OF CELLS DISTRIBUTION ON NEUROBLASTOMA-ONCHIP BY MORPHOMETRIC TECHNIQUES.** *Vieco-Martí I, Martín-Vañó S, Monferrer E, Carretero A, Navarro S, Samitier J, Noguera R.*
- **INFLUENCIA DE LA MECANOTRANSDUCCIÓN EN LA PROGRESIÓN TUMORAL EN LA GLÁNDULA MAMARIA MURINA.** *Risueño-Merino C, Villarroya O, Costell M.*
- **CRONO-ONCOLOGÍA: NUEVO ABORDAJE DE LA LEUCEMIA.** *Martínez FJ, Bolado D, Jiménez C, González C, Sanfeliú N, Fajardo D.*
- **SIMULACIÓN CLÍNICA: PROYECTO DE INNOVACIÓN EDUCATIVA EN REANIMACIÓN CARDIOPULMONAR BÁSICA Y AVANZADA EN PEDIATRÍA Y NEONATOLOGÍA.** *Patiño Serra M, Tévar Jareño L, Tortajada Lohaces A, Balaguer López E.*

## PÓSTERES, TURNO 3

7 de febrero, 11.00-11.30h

- **CLONING AND TAGGING OF THE FULL-LENGTH O-LINKED N-ACETYLGLUCOSAMINE TRANSFERASE GENE INTO pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®.** Márquez Thibaut L, Colombo SL.
- **PAISAJES VASCULARES EN EL MENINGIOMA. ANÁLISIS DE MICROMATRICES TISULARES.** González M, Navarro L, Santonja N, Megías J, San-Miguel T.
- **ASOCIACIÓN ENTRE EL CONSUMO DE DETERMINADOS ALIMENTOS Y LA PERCEPCIÓN DE LA FELICIDAD EN HOMBRES Y MUJERES CON SÍNDROME METABÓLICO.** De la Cámara E, Fernández-Carrión R, Barragán R, Asensio EM, Ortega-Azorín C, Carrasco P, Portolés O, Sorlí JV, Martínez-Lacruz R, Giménez-Alba JI, Betancourt A, Corella D.
- **INESTABILIDAD GENÉTICA DEL CROMOSOMA 1. ESTUDIO DE 10 TRASLOCACIONES RECÍPROCAS, ANÁLISIS DE SUS PUNTOS DE RUPTURA Y CONSECUENCIAS CLÍNICAS.** DeVicente-Donderis A, Muñoz-Hidalgo L, Gil-Benso R, Cerdá-Nicolás M, López-Ginés C.

## PÓSTERES, TURNO 4

7 de febrero, 18.15-18.45h

- **PATRÓN DE ACTIVACIÓN MUSCULAR DURANTE LA ABDUCCIÓN DE CADERA EN DECÚBITO LATERAL.** Alba Cuerda del Pino, Rodrigo Martín San Agustín, Josep C. Benítez Martínez, Antonio Silvestre Muñoz.
- **STUDY OF GENES RELATED TO LIPID METABOLISM IN C2C12 CELL TREATED WITH RESVERATROL.** Parejo S., Sánchez-Morate E., Gimeno-Mallench L., Gambini J, Viña J.
- **ASSOCIATION OF KLOTHO GENE POLYMORPHISMS WITH APPEARANCE OF CARDIOVASCULAR DISEASE.** Ainhoa González Luis, Laura Ribes.

## COMUNICACIONES ORALES, TURNO 4

7 de febrero, 18.45-20.00h

- **CRONO-ONCOLOGÍA: NUEVO ABORDAJE DEL CÁNCER COLORRECTAL.** Bolado D, Jiménez C, González C, Martínez FJ, Sanfeliú N, Fajardo D.
- **SECUENCIACIÓN DE TERCERA GENERACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA).** Lapeña T.
- **INHIBITION OF AUTOPHAGY EXACERBATES INTESTINAL FIBROSIS AND EMT.** Ana Trescoli-Garcia, Dolores Ortiz-Masia, Francisco Canet, Sandra Coll, Sara Calatayud, Dolores Barrachina, Jesús Cosín-Roger.
- **PAPEL DE LA PROTEÍNA PrRP EN LA RESULACION NEUROENDOCRINA DE LA TERMOGENESIS.** Fajardo D, Fernández-Mateos P, Jiménez-Ortega V, Cano-Barquilla P, Bolado D, Pulido AD, Esquifino A.

- **EVALUACIÓN DE NUEVOS AGENTES ANTITUMORALES BASADOS EN RUTENIO (III) EN MODELOS CELULARES.** *Albanell M, Orts M, Oltra S, Gutierrez F, Mengual R, Ferrer A, Carrasco F, Castillo J, Martinez-Lillo FJ, Ribas G.*
- **STUDY OF CD5 AND CD6 EXPRESSION AS POTENTIAL PROGNOSTIC BIOMARKERS IN RESECTED NON-SMALL CELL LUNG CANCER.** *A. Moreno Manuel, S. Calabuig Fariñas, S. Gallach Garcia, Fernando Aranda, Ines Simoes, Esther Carreras, Marta Consuegra-Fernandez, A. Blasco, A. Cunguero Tomas, M. Martorell, C. Camps Herrero, Francisco Lozano, Rafael Sirera, Eloisa Jantus-Lewintre.*

## **PÓSTERES, TURNO 1**

### **TELOMERE LENGHT IN OVARIAN CORTEX CELLS OF PATIENTS WITH CANCER AND HEALTHY WOMEN.**

*Mateu-Pascual JM, Soler I, Garcia-Velasco JA, Varela E, Diaz-García C.*

Telomeres are nucleoprotein structures located at the ends of chromosomes. Its function is to protect the chromosomes from degradation or fusions (1). In each replicative cycle the telomeres shorten. Therefore, telomere length decreases with time, limiting the regenerative capacity of cells and affecting organ function (2). Therefore, telomeres are bona fide markers of biological age and aging associated diseases, such as diabetes mellitus (3), cardiovascular diseases (4), cancer (5), etc.

Cancer is a high-prevalence disease with a strong social impact. Breast cancer is the most frequently diagnosed tumor in reproductive-age women. In this study, 44 samples of ovarian tissue from both healthy women and cancer patients were analyzed, prior to cancer treatment. Q-FISH (quantitative FISH) technique followed by image acquisition with high resolution confocal microscope were applied to samples. CY3-fluorescent intensity corresponding to telomeres was analyzed with the software Definiens.

The objective of the study was to study if telomere length was altered in cancer patients, both in all cells from ovarian tissue and in granulosa cells and oocytes, separately.

Globally, there was not a significant difference in telomere length between healthy or cancer patients. However, healthy women showed a greater number of long telomeres. These results are in agreement with published data that highlight the differences in the number of very short and very long telomeres depending on the origin of the sample (4). We can conclude that telomere length is altered in cancer patient before they have been treated.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991; 350: 569-573.
- 2.- Donate, L.E. and Blasco, M.A. Telomeres in cancer and aging. *Phil. Trans. R. Soc.B.*, 2011; 366:76-84.
- 3.- Murillo-Ortiz B, Albarran-Tamayo F, Arenas-Aranda D, Benitez-Bribiesca L, Malacara-Hernandez J, Martinez-Garza S, et al. Telomere length and type 2 diabetes in males, a premature aging syndrome. *Aging Male*. 2011; 15: 54–58.
- 4.- Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Kimura M, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, et al. Leukocyte telomere length and mortality in the Cardiovascular Health Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011; 66: 421–429.
- 5.- Martinez-Delgado B, Yanowsky K, Inglada-Perez L, Domingo S, Urioste M, Osorio A, et al. Genetic anticipation is associated with telomere shortening in hereditary breast cancer. *PLoS Genet*.2011; 7: e1002182.

# REPROGRAMACIÓN CARDIACA DIRECTA: EL GRAN RETO DE LA MEDICINA REGENERATIVA.

Ribes L, González A.

## INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías representan la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, a pesar del avance de la tecnología médica. Los pacientes con cardiopatía presentan un aumento de la fibrosis miocárdica y pérdida de cardiomiocitos, lo que puede desencadenar en fallo cardíaco. El descubrimiento de las células madres pluripotentes inducidas (iPSCs) a partir de fibroblastos ha revolucionado la medicina regenerativa, haciendo de la reprogramación cardíaca un enfoque prometedor como terapia regenerativa del músculo cardíaco. Terapias anteriores basadas en células madre derivadas de médula ósea, mesénquima y progenitoras cardíacas han mostrado una baja capacidad regenerativa que no favorece la recuperación cardíaca. Las iPSCs pueden, teóricamente, renovarse de forma indefinida y diferenciarse a cardiomiocitos con gran eficiencia. Sin embargo, la medicina regenerativa basada en iPSCs aún necesita vencer algunos obstáculos, como el riesgo potencial de formación de tumores, la escasa supervivencia de las células trasplantadas, un posible rechazo inmunogénico y el alto costo de su producción a gran escala. Así, una nueva estrategia se está desarrollando en la cual se inducen fibroblastos cardíacos (CFs) a "cardiomyocyte-like cells" (iCMs) sin revertirlas a iPSCs, mediante factores cardíacos específicos: Gata4, Mef2c y Tbx5 (GMT). Esta reprogramación cardíaca directa se aplicaría *in vivo* incrementando la función cardíaca en estos pacientes evitando, además, parte de los riesgos mencionados que conlleva la utilización de iPSCs. Con este trabajo bibliográfico se pretende analizar esta nueva tecnología, valorando su estado actual y sus posibles aplicaciones clínicas futuras en medicina regenerativa en humanos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para elaborar esta revisión bibliográfica, se realizó una búsqueda de artículos en la base de datos PubMed, utilizando los términos "Direct Cardiac Reprogramming", "Engineering Cardiac Muscle Tissue" y "Stem Cells for Cardiomyocytes". Los criterios de búsqueda se ajustaron teniendo en cuenta que los artículos deberían haberse publicado en los últimos 5 años, teniendo especialmente en cuenta aquellos publicados del 2017 en adelante. Se seleccionaron aquellos artículos cuyo tema principal se basaba en la reprogramación cardíaca directa y cuya base incluyera células cardíacas diferenciadas con al menos los factores de transcripción específicos mencionados en la introducción. De esa selección, se extrajeron los resultados presentados en este trabajo. Las búsquedas se llevaron a cabo en inglés.

## RESULTADOS

Se probó que los factores GMT y GHMT son insuficientes *per se* para lograr la reprogramación cardíaca humana, siendo necesario agregar otros factores de transcripción y miRNAs. Fu et al. reportaron que inhibidores de las vías de señalización TGF- $\beta$  y Wnt incrementaban la eficiencia de reprogramación de fibroblastos, reduciendo los factores de transcripción necesarios a GMT y Myocd. Sin embargo, Nam et al. reportaron que una combinación de los factores Gata4, Hand2, Tbx5, Myocd y los miR-1 y miR-133 convertía los fibroblastos humanos (neonatos y adultos) en iCMs. Una pequeña porción de estas células mostró capacidad contráctil después de cultivarlas 11 semanas, siendo la eficiencia mucho menor que en modelos murinos. Christoforou et al. determinaron que la reprogramación cardíaca directa en humanos más eficiente se induce con la adición de los factores Gata4, Mef2c, Tbx5, Myocd, Nkx2-5, miR-1 y miR-133.

Estudios en ratones *in vivo* mediante vectores retrovirales GMT permitió observar como estos tienen preferencia para infectar células en proliferación (CFs) pero no cardiomiocitos totalmente diferenciados. La eficiencia fue del ~1%, siendo la mayoría cardiomiocitos inmaduros. La utilización de un único vector retroviral policistrónico expresando GMT resulta en la duplicación de generación de iCMs maduros.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Que la presencia de miRNA para la aplicación de la reprogramación cardíaca directa sea un requerimiento demuestra que la epigenética es un gran factor implicado en su mecanismo molecular. Así, será imprescindible silenciar las firmas celulares originales para convertir estas células.

Los vectores utilizados en modelos murinos son retrovirus o lentivirus, pero debido a su potencial mutagénico no son seguros para aplicarlo *in vivo* en humanos. Recientes ensayos clínicos muestran resultados prometedores con vectores virales adeno-asociados, siendo un posible sistema de administración genético eficiente y seguro.

Los resultados obtenidos *in vivo* hasta el momento son prometedores, pero la eficiencia de la reprogramación cardíaca directa, en particular la generación de iCMs contráctiles, sigue siendo baja, por lo que aún se requiere de futuras investigaciones para optimizar las técnicas y adquirir mejor conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes.

Los diversos autores han podido demostrar que los iCMs generados *in vivo* resultan funcionalmente más maduros que los generados *in vitro*, teniendo más capacidad de mejorar la función cardíaca y reducir la cicatriz fibrótica después de un infarto de miocardio.

Finalmente, aunque se ha avanzado mucho en este campo, también se requiere mejorar en la seguridad de estos procedimientos para poder aplicarlos en la práctica clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tani H, Sadahiro T, Ieda M. Direct cardiac reprogramming: A novel approach for heart regeneration. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Sep 5 [cited 2018 Dec 18];19(9):2629. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30189626>
2. Kurotsu S, Suzuki T, Ieda M. Direct Reprogramming, Epigenetics, and Cardiac Regeneration. *J Card Fail* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2019 Jan 10];23(7):552–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1071916417301471>
3. Kojima H, Ieda M. Discovery and progress of direct cardiac reprogramming. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2017 Jun 14 [cited 2019 Jan 10];74(12):2203–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28197667>
4. Talkhabi M, Zonooz ER, Baharvand H. Boosters and barriers for direct cardiac reprogramming. *Life Sci* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2019 Jan 10];178:70–86. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320517301613>



# EFFECTO DE LA PRESENCIA DE GLIOBLASTOMA SOBRE EL PROCESO DE GENERACIÓN DE NUEVAS NEURONAS EN CEREBROS ADULTOS.

*Ripari LB, Bodoque Villar R, Guerrero Cazares H, de la Rosa Prieto C.*

## INTRODUCCIÓN

El Glioblastoma Multiforme (GBM) es el tumor primario más común, agresivo y proliferativo en adultos (1). A pesar de estrategias terapéuticas actuales que combinan cirugía, radio y quimioterapia, la esperanza de vida media en estos pacientes es de solo 15 meses (2). Los pacientes que presentan los tumores ventrículo-proximales tienen peor pronóstico que los que lo presentan en otras zonas del cerebro, afectando negativamente a su supervivencia (3). Los ventrículos laterales son zonas clave de generación de nuevas células neurales en el cerebro de mamíferos. Incluso después del nacimiento y durante la edad adulta, se ha demostrado que son capaces de seguir generando neuronas que se integrarán en la circuitería preexistente de los bulbos olfativos (4). La hipótesis de partida es que, en presencia de GBM, al tratarse de un crecimiento neoplásico cercano a las paredes de los ventrículos, y al existir daño cerebral causado por el propio crecimiento, el proceso neurogénico podría verse alterado, y los neuroblastos ser reclutados por la zona de crecimiento tumoral. Tras realizar una estimación del tamaño de tumores, después de un mes de crecimiento, cuando se localizan cercanos o lejanos a los ventrículos, se está cuantificando el número de células madre neurales (NSCs) en proliferación y neuroblastos en migración en tres zonas clave del proceso neurogénico en cerebros adultos: las paredes de los ventrículos, cadena migratoria rostral y bulbos olfativos en ratones injertados con células GBM cerca y lejos de los ventrículos laterales. Los resultados se comparan con casos control injertados solo con vehículo. Por otro lado, estamos estimando el número de células que sufren apoptosis o muerte celular programada, tanto en el propio tumor como en el resto de las zonas mencionadas anteriormente. El objetivo es comprender cómo responde el proceso neurogénico en general y las células madre neurales en particular, al entorno generado por la presencia de estas células tumorales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Partimos de 3 grupos de ratones inmunodeprimidos (N=18, n=6) injertados con células humanas GBM en 3 regiones cerebrales, proximal, intermedio y distal a los ventrículos laterales. Tras un mes se sacrificaron y se procedió a la obtención de secciones cerebrales coronales. Un primer paso ha sido estimar el tamaño de los tumores en cada uno de los grupos. Una vez verificado que crecen más cuando se localizan cerca de los ventrículos laterales, se están realizando inmunofluorescencias múltiples para estimar el número de neuroblastos en migración en las propias paredes de los ventrículos y cadena migratoria rostral (RMS). También se están cuantificando las neuronas jóvenes recién generadas que alcanzan los bulbos olfativos. Además de DAPI para teñir los núcleos, se están utilizando anticuerpos contra Doblecortina (migración celular), Human Nuclei (células humanas), Ki67 (proliferación celular) y Caspasa 3 (muerte celular programada), entre otras. Una vez realizadas las inmunofluorescencias, se toman las imágenes necesarias bajo microscopía confocal, mediante la utilización del equipo Zeiss LSM 800.

Para la estimación estereológica se está utilizando el software de la casa Zeiss, denominado ZEN, con el que se puede delimitar fácilmente el área de estudio y estimar las células presentes en cada área. El análisis estadístico se realiza mediante el software estadístico SPSS y/o Graphpad Prism.

## RESULTADOS

Los resultados preliminares obtenidos indican que la densidad promedio de células positivas para el marcador de proliferación Ki67 en la ZSV del lado ipsilateral es similar a la del lado contralateral (44294,3 cél/ $\mu\text{m}^2$  vs 45058,8 cél/ $\mu\text{m}^2$ ).

## CONCLUSIONES

En estudios previos hemos determinado que la cantidad de células y la tasa de proliferación de glioblastomas localizados en la zona proximal a los ventrículos del cerebro de ratón es mayor que aquellos localizados lejos de los ventrículos, llevando además a una menor supervivencia comprobada con grupos experimentales de larga supervivencia. Por otro lado, la presencia de glioblastoma humano no parece afectar a la proliferación de células neuronales de ratón de la zona subventricular, ya sea ipsi- o contralateral. Estos estudios preliminares se complementarán añadiendo una mayor cantidad de casos, y pueden arrojar luz sobre el proceso que subyace a la mayor agresividad que presentan este tipo de tumores.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 1 de junio de 2016;131(6):803-20.
2. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma | NEJM [Internet]. [citado 10 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa043330>
3. Chen L, Guerrero-Cazares H, Ye X, Ford E, McNutt T, Kleinberg L, et al. Increased Subventricular Zone Radiation Dose Correlates With Survival in Glioblastoma Patients After Gross Total Resection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15 de julio de 2013;86(4):616-22.
4. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *J Neurosci.* 1 de febrero de 2002;22(3):629-34.

# LIPID BINDING PROPERTIES OF LRRK2.

Martinez A, Ho F, Kortholt A, Poolman B.

## INTRODUCCIÓN

Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease affecting 1-2% of the elderly population. Mutations in Leucine-rich repeat kinase2 (LRRK2), have been found to be the most common cause of hereditary and sporadic forms of late onset PD. PD mutations in LRRK2 have an increased kinase activity and a decreased GTPase activity. Activation of LRRK2 is a complex process that involves three different mechanisms: dimerization, subcellular localization and intramolecular signalling. LRRK2 binding to membranes is a recent research topic with few data available. Presumably, this interaction plays an important role in LRRK2 activation since it is shown that LRRK2 is more (kinase) active when it's bound to the membrane. The aim of this project is to study the lipid binding properties of LRRK2 in detail.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Protein purification:** Wild type Strep-tagged LRRK2 was expressed in HEK 293T cells and incubated with Strep-Tactin beads for its purification.

**PIP Strip:** For a first screening test, phosphoinositide-binding assays were performed using lipid strips. LRRK2 was incubated with the strip for 1h and bound protein was detected with antibodies.

**Liposome binding assay:** To test liposome binding, LRRK2 was incubated with freshly prepared liposomes for 1h and centrifuged for 30min. Supernatant and pellet were analysed by separation on SDS-PAGE and western blot.

## RESULTADOS

For the first assay, 1 µg of protein (LRRK2 and two positive controls) was incubated with rhodamine labelled liposomes for 1h and centrifuged at 228 000 x g and the supernatant was collected. We found that annexin V was being degraded, since it did not give any signal in the blot. Regarding LL5α-PH, we can see that the protein is present both in the supernatant and the pellet of the assay with PI(5)P liposomes, which is supposed to be pulling down the protein and therefore should be more abundant in the pellet fraction. We couldn't detect LRRK2 in most cases, probably because the amount of protein used in the assay was not enough. In order to optimize the experiment, we used 5 µg of protein, liposomes without R18 and centrifuged at 100 000 x g. If we analyze LL5α-PH bands, we can interpret that LL5α-PH was being pulled down by PI(5)P but also by the negative control liposomes, therefore, we can't get any valid information from this experiment either.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Pull down experiments still have to be optimized. For future experiments, lipids extracted from brain tissue could be used to prepare the liposomes in order to resemble physiological lipids compositions. Intracellular vesicles collected from cell lines such as HEK cells is another option for the pull down assay. If necessary, the addition of Rab29, which regulates the translocation of LRRK2 to the membranes in cells, should be considered. By last, when the LRRK2-lipid interaction is characterized, kinase and GTPase assays in the presence of vesicles could be performed in order to determine if this binding plays an important role on LRRK2 activation and functions.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lill CM. Genetics of Parkinson's disease \*. Mol Cell Probes. 2016;30(6):386–96.
2. Paisán-Ruiz, C., Lewis, P. A. & Singleton, A. B. LRRK2: cause, risk, and mechanism. J. Parkinsons. Dis. 3, 85 -103 (2013).
3. Rosenbusch KE, Kortholt A. Activation Mechanism of LRRK2 and Its Cellular Functions in Parkinson's Disease. 2016;2016.
4. Alessi BDR, Sammler E. LRRK2 kinase in Parkinson's disease. :1–3.

# **NEW MODEL TO EXTRACT THE FINGERPRINT OF SIMULTANEOUS MULTIPLE INFECTIONS FROM THE GENETIC DATA**

*Campo I and Vaughan Timothy.*

## **INTRODUCCIÓN**

The goal of viral phylodynamics is to study how the interactions between epidemiological, immunological and evolutionary processes shape viral phylogenies. Because in rapidly evolving viruses epidemiological and evolutionary dynamics are occurring on the same time scales, we can extract the fingerprint of epidemiological and ecological processes from the genetic data. Mathematical models for epidemics almost exclusively assume that transmission events produce a single new infectious individual. Even super-spreading, the production of a large number of secondary infections by a single infectious individual, is usually modeled as an elevated rate of such infectious.

In this project, we used molecular sequence data from rapidly evolving viruses such as Ebola virus, Zika virus and Influenza, to determine the extent to which the phylogenies of these viruses contain statistical signal for instantaneous superspreading events, where multiple new infections are produced almost instantaneously.

Such events may occur due to, for example, airborne infections in a populated enclosed space. Being able to detect this kind of infection may yield important clues as to how pathogens spread.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

To accomplish this we will firstly construct a mathematical model (a birth-death model) which includes the possibility of such events. Next, we will combine this model with a phylogenetic inference tool that allows for phylogenetic trees containing hard polytomies, allowing us to infer the rate of such events from real data. Finally, we will perform Bayesian model comparison to determine the support for the new model with respect to a model which does not support instantaneous superspreading events.

## **RESULTADOS**

After creating a simulated tree with a simulator that takes into account superspreading events we estimated with the new model the likelihood distribution of the burst rate of the tree. We see that the obtained values were close to the real ones. In the simulation, the fixed value for the burst rate was 0,2 and the maximum likelihood obtained with our model was 0,14.

We obtain the posterior distribution for the mean burst size and the number of polytomies inferred from Ebola virus genomes sampled from the 2014-2015 West African outbreak [Dudas et al., 2017]. Samples used were specific to Kailahun province, Sierra Leone. The mean for the superspreading event's probability distribution is 0,15. (I have still to analyzed Zika data and Influenza data and also calculate the Bayesian's factor for each epidemic. I will get this results in around 15 days)

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

We developed a model to extract the fingerprint of super-spreading events from molecular sequence data of rapidly evolving viruses. We have tested the model with Ebola's genetic data and we calculated the posterior probabilities of some epidemiological parameters such as the burst rate, the mean burst size or the effective and basic reproduction numbers.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1.-Stadler, T. (2010). Sampling-through-time in birth-death trees. Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C., Xie, D., Suchard, M., Rambaut, A. and Drummond, A. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis.

# STUDY OF THE CONTRIBUTION OF GENETIC MATERIAL CHANGES IN PAIRED NEUROBLASTOMA TUMORS.

*Fernandez Blanco B, Berbegall AP, Martín Vañó S, Blanquer Maceiras M, Noguera R.*

## INTRODUCTION

Neuroblastoma tumor (NBT) is a pediatric tumor of the sympathetic nervous system, affecting mainly children younger than age 5 years. Despite intensive treatment strategies 5-year survival probability within the high-risk (HR) patient group, which is associated with chemoresistance and relapse, remains poor. Segmental chromosomal alterations (SCAs) have prognostic impact in relapse and survival of NBT patients (1, 2). Relapsed NBT from HR patients present actionable aberrations as a result of clonal expansion but no concrete genetic marker able to predict tumor progression within these patients has been identified (3). We aimed to study the possible contribution to tumor progression of the net value of kilobases (Kb) or total genetic material altered in a group of primary and non-primary paired NBT.

## MATERIAL AND METHODS

The amount of altered genetic material was annotated for 30 paired SCA NBT cases analyzed with SNP array. Only SCAs (>2Mb) were considered to calculate the quantity of kilobases (Kb) of altered genetic material. The subtraction between kb gained and lost was calculated for each tumor and defined as net value kb. Cases were classified related to their net value Kb as: i) equivalent, ii) lesser and iii) extra, according to the equal, lower or higher net value Kb of the non-primary vs primary tumor. In addition, differences of the total amount of altered material between paired NBT was calculated as a different criterion to classify the cases into: i) equal, ii) lower and iii) higher, total value of kb in the SCAs. Tumors without SCAs but with focal segmental alterations (FSCA, <2Mb) were called FSCA.

## RESULTS

In 6 cases some SCAs may not have been detected due to a low percentage of neuroblasts either on primary tumor (2 cases) or non-primary tumor (4 cases). Considering the net value Kb, half of the cases (15) belonged to the lesser Kb group (mean 96 Mb) and two cases were classified into the equivalent kb group. Related to the differences of total value of kb in the SCAs, the cases were distributed equally on lower and higher groups (mean 118 Mb and 98 Mb, respectively). The number of SCAs was high except in 5 cases which profiles changed from SCA to FSCA or vice versa (mean 2,8 vs 5,6). Most frequently observed SCAs affected chromosomes 1 (19 cases), 17 (17), 2 (15) and 11 (13), followed by 7 (9) and 19 (9). Interestingly, breakpoints of gained 17q region were different between non-primary and primary tumors in the higher total value of kb in the SCAs group but not in the lower group.

## CONCLUSIONS

Extension of the study is needed to better define the genetic material changes in paired tumors, specially related with 17q gain, and to correlate results with clinical and histopathological features in order to evaluate their relevance in NBT from HR patients as a tool to predict tumor progression.

## GRANTS

CIBERONIC (CB16/12/00484) and FIS (PI17/01558), Institute of Health Carlos III (Madrid) cofounded with ERDF; Association NEN-NicoContraElCáncer 2017-19 (Spain).

## BIBLIOGRAPHY

1. Schleiermacher G, Mosseri V, London WB, Maris JM, Brodeur GM, Attiyeh E, et al. Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *British journal of cancer.* 2012;107(8):1418-22. Epub 2012/09/15.

2. Depuydt P, Boeva V, Hocking TD, Cannoodt R, Ambros IM, Ambros PF, et al. Genomic Amplifications and Distal 6q Loss: Novel Markers for Poor Survival in High-risk Neuroblastoma Patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2018;110(10):1084-93. Epub 2018/03/08.
3. Schulte M, Koster J, Rahmann S, Schramm A. Cancer evolution, mutations, and clonal selection in relapse neuroblastoma. *Cell and tissue research*. 2018;372(2):263-8. Epub 2018/02/27.

# CRONO-ONCOLOGÍA: NUEVO ABORDAJE DEL CÁNCER DE MAMA.

Retuerta J, Jiménez C, Fajardo D, Martínez FJ, Sanfeliú N, González C, Bolado D.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente se sabe los ritmos circadianos regidos por la existencia de los genes del reloj regulan numerosos procesos fisiológicos en el organismo. Además, en la mujer, se han confirmado que estos genes están implicados en el desarrollo de la mama o se modifica su expresión durante el embarazo [1]. Por ello, la desregulación de los ritmos circadianos (p.ej.: trabajos nocturnos, envejecimiento, mutaciones en genes del reloj) puede llevar al desarrollo de una neoplasia mamaria [1,2]. El alto impacto epidemiológico del cáncer de mama y sus mecanismos carcinogénicos, así como los recientes estudios acerca del reloj biológico y su papel en el desarrollo de este cáncer hace necesario la revisión de toda la maquinaria implicada en estos procesos.

## RESULTADOS

Mediante el estudio llevado a cabo por Lesicka & col., en el que se estudiaron 107 mujeres con cáncer de mama, se analizaron la expresión de todos los genes del reloj mediante técnicas de rt-PCR cuantitativa. Se encontró que, en general, los niveles de expresión de los genes *CLOCK* y *TIMELESS* estaba significativamente aumentada en comparación con el grado de expresión de los tejidos sanos adyacentes. Por otro lado, los niveles de RNA mensajero de los genes *CRY2*, *PER1*, *PER2*, *PER3* estaban disminuidos [2].

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El núcleo central regulador de los ritmos circadianos se encuentra en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, coordinando tanto los estímulos externos como los internos. Asimismo, se ha demostrado que en numerosos tejidos existe un control periférico del reloj biológico [2]. De forma fisiológica, todas las células se mantienen en homeostasis y, en parte, debido a la actuación de los ritmos circadianos [1,2]. No obstante, en el desarrollo de un proceso neoplásico, el reloj se altera en aquellas células con fenotipo maligno. Si bien se sabe que en los procesos malignos está afectado el ciclo celular, el cual está íntima e indirectamente ligado por los genes del reloj que rigen los ritmos circadianos [1,2]. En diversos estudios ha quedado plasmado que la desregulación del ciclo celular está precedida por la alteración de los ritmos circadianos, influenciados por factores de riesgo como la edad, las alteraciones genéticas o la exposición luminosa prolongada en periodos de noche (p.ej.: trabajos nocturnos) [2]. En este pretexto se ha confirmado porque existe una alteración a nivel de los genes del reloj, y esto se demuestra en hechos como las alteraciones del ciclo celular, la síntesis de melatonina, la tasa de apoptosis, etc.; factores estrechamente regulados por el reloj biológico [2]. En el estudio realizado por Blakeman & col., se revisaron diversos estudios sobre el tema que confirmaron que la aparición de distintas mutaciones en los genes del reloj hace que éstos puedan actuar como genes protectores o favorecedores del desarrollo del cáncer de mama en función de qué tipo de mutación afecte a un gen determinado. Asimismo, el estudio propuesto por Lesicka & col., donde se analizan los niveles de expresión de estos genes en función de diversos datos, se observa que las alteraciones del reloj en este tipo de cáncer son estadísticamente significativas como para correlacionarse con la patogenia de la neoplasia. Todo en conjunto, hace evidente que el reloj biológico y los ritmos circadianos toman una gran importancia en el mecanismo de desarrollo y progresión de una neoplasia mamaria.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Blakeman V, Williams JL, Meng Q, Streuli CH. *Circadian clocks and breast cancer*. *Breast Cancer Research* (2016); 18:89. DOI 10.1186/s13058-016-0743-z.
2. Lesicka M, Jablonska E, Seroczynska B, Siekierzycka A, Skokowski J, Kalinowski L, Wasowicz W, Reszka E. *Altered circadian genes expression in breast cancer tissue according to the clinical characteristics*. *PLOS ONE* (2018); 13(6): e0199622. DOI 10.1371/journal.pone.0199622.

# EFFECT OF MICROVASCULAR OBSTRUCTION ON THE CELLULAR MATRIX ON A SWINE MODEL OF REPERFUSED MYOCARDIAL INFARCTION.

*Anna Teruel-Sanchís, Maria Ortega, Cesar Rios-Navarro, Jose Gavara, Victor Marcos-Garces, Ana Diaz, Gema Miñana, Francisco J Chorro, Vicente Bodi, Amparo Ruiz-Sauri.*

## INTRODUCCIÓN

Myocardial infarction (MI) consists on a blockage of the coronary blood flow. Although this situation has to be rapidly resolved by reperfusion therapies, myocardial tissue is already damaged due to the lack of nutrients and oxygen. Despite a complete reperfusion of the coronary artery, a deficient perfusion persists in some regions, named microvascular obstruction (MVO). Extracellular matrix (ECM) is the non-cellular scaffold for the cellular constituents, playing an important role in tissue structure and functionality. The aim of this project is to compare the ECM components in areas with MVO and without MVO in a swine MI model.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Swine MI was induced by the blockage of the medial part of the coronary artery during 90 minutes followed by 1-week reperfusion (n=5). Prior to the sacrifice, intracoronary tyoflavin infusion was administrated in order to localize the areas where MVO was present. From each heart, samples from infarcted areas with macroscopic MVO and without macroscopic MVO were isolated for histological analysis. Traditional stainings were used to evaluate collagen type I, collagen type III, elastic fibers, and glycosaminoglycan. Immunohistochemistry was employed to determine the content of fibronectin and laminin as well as different cell types (myofibroblasts, small vessels, neutrophils, T lymphocytes, and monocytes). Five independent photographs were taken on each histological section and afterwards, they were morphologically quantified using Image ProPlus software. Data was analysed using R software: paired t-Student's test.

## RESULTADOS

When the amount of leukocyte subtypes were determined, the number of neutrophils and monocytes was elevated in the areas without MVO in comparison to areas with MVO ( $p=0.18$  and  $p=0.056$  respectively). The amount of collagen type I tends also to increased in areas without MVO ( $p=0.078$ ). Regarding the polysaccharides, we found an increased of glycosaminoglycan content in the ECM of MVO areas. No differences were detected in the rest of the ECM components studied.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

According to our results, some differences were observed in the ECM components depending the presence of MVO in the infarcted myocardium. Further studies are needed to continue exploring the role of ECM components in areas with MVO.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest.* 2007; 127(5):1600-1612.
- 2.- Lahoz C, Mostaza JM. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60(2):184-195.
- 3.- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):508-19.
- 4.- Elízaga J. La angioplastia primaria es la terapeutica de reperfusion de eleccion en el tratamiento del infarto agudo de miocardio. Argumentos a favor. *Rev Esp Cardiol.* 1998; 51(12):939-47.



# EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA SUBUNIDAD G $\alpha$ 0 DE LA PROTEÍNA G EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN.

Roldán-Sastre A, Aguado C, Moreno-Martínez A, Martín-Belmonte A, Alfaro-Ruiz R, Luján R.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales mecanismos de comunicación celular en el Sistema Nervioso Central (SNC) es el llevado a cabo por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), también denominados receptores metabotrópicos. Las proteínas G, compuestas por tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), presentan una gran diversidad en cuanto a familias. La familia G $\alpha$ i/o es la más abundante en el SNC y, en concreto, la subfamilia G $\alpha$ o. Dada la gran relevancia de G $\alpha$ o en la comunicación y modulación de la actividad celular, así como su implicación en diversas enfermedades como la de Alzheimer y la de Parkinson, y ante la ausencia de un consenso en la localización de la G $\alpha$ o en el hipocampo, este Trabajo pretende clarificar la distribución y localización celular y subcelular de dicha proteína en el hipocampo de ratón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para ello, se emplearon diversas técnicas histológicas como son la técnica de histoblot y las técnicas inmunohistoquímicas a nivel de microscopía óptica y electrónica.

## RESULTADOS

En primer lugar, mediante el uso de la técnica de histoblot observamos que G $\alpha$ o se encuentra ampliamente expresada en el SNC y en concreto, en el hipocampo, en el cual se encuentran los mayores niveles de expresión. Dentro de esta región, son las capas dendríticas las que predominan, con una expresión ligeramente superior en la subregión CA1, concretamente en el *stratum radiatum*. Este patrón de expresión en el hipocampo es solapable con el patrón de GABA $\beta$  observado en estudios previos de nuestro laboratorio. Mediante la técnica de inmunohistoquímica a nivel de microscopía óptica, observamos un intenso inmunomarcaje de G $\alpha$ o a lo largo del neuropilo de todas las capas dendríticas del hipocampo, indicando su localización en las células principales. En los cuerpos celulares de las células piramidales y las células granulares del giro dentado, G $\alpha$ o se distribuye en el contorno de los somas, quedando limitado su marcaje a la membrana plasmática. Por último, los estudios de inmunohistoquímica para microscopía electrónica, mostraron que G $\alpha$ o se localiza a nivel postsináptico intracelularmente y en la membrana plasmática extrasináptica de espinas dendríticas y de troncos dendríticos pertenecientes a las células piramidales. Presinápticamente, G $\alpha$ o se localizó también a nivel intracelular y en la membrana plasmática cercana a las zonas activas de los terminales axónicos. Estos resultados coinciden con la localización subcelular ya descrita del receptor de GABA $\beta$  en las sinapsis del hipocampo

## CONCLUSIONES

En su conjunto, los presentes resultados demuestran que la proteína G $\alpha$ o muestra una amplia expresión y distribución en el hipocampo y sugieren que dicha subunidad juega un papel importante en los procesos de señalización neuronal de los receptores de GABA $\beta$  en la mayoría de los compartimentos subcelulares de las células piramidales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aoki C, Go C.G., Wu K., Siekevitz P. Light and electron microscopic localization of alpha subunits of GTP-binding proteins, G(o) and Gi, in the cerebral cortex and hippocampus of rat brain. Brain Research. 1992;596:189–201.
2. Kulik A, Vida I, Luján R, Haas C.A, López-Bendito G, Shigemoto R, Frotscher M. Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1 $\alpha$ /b) and GABA(B2) in the rat hippocampus. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. 2003; 23:11026–11035.
3. Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. Neuroscience. 2005 130:567–580.

### **NO GENDER DIFFERENCES IN THE CORNEAL ENDOTHELIAL CELL DENSITY AND MORPHOLOGY OF YOUNG EMMETROPIC SUBJECTS.**

*Bedoya-Jiménez EJ, Sanchis-Gimeno JA.*

#### **INTRODUCCIÓN**

Anatomists consider emmetropic eyes as “normal anatomic eyes”.<sup>1</sup> On the other hand, an anatomist’s “definition of the normal eye” is different from an ophthalmologist’s. From an ophthalmologist’s point of view the normal eye is the non-pathological eye, not the emmetropic eye as accepted by anatomists.<sup>1</sup> The corneal endothelium is essential for the maintenance of normal corneal hydration, thickness, and transparency,<sup>1-3</sup> but currently, there is a lack of information about gender differences in corneal endothelial cell density and morphology of emmetropic eyes because studies are not usually performed in these eyes.<sup>1</sup> Following on from this, we aimed to test the possible gender differences in corneal endothelial cell density and morphology in a large sample of young emmetropic subjects.

#### **MATERIAL Y MÉTODOS**

We carried out a prospective study in order to analyze the gender differences in corneal endothelial cell density and morphology in a group made up of 202 young emmetropic subjects (n=202). One hundred and six (52.5%) were male and 96 (47.5%) were female. We recorded the mean of three consecutive measurements of the corneal endothelial cell density, the coefficient of variation in cell size, the percentage of hexagonal cells, and the cell area using the Topcon SP-2000P non-contact specular microscope (Topcon Corp., Tokyo, Japan). We analyzed only one eye per patient with a view to eliminating the possible intra-subject effect that would appear if both eyes of the same patient were studied.<sup>1</sup> The choice of analyzing the left or the right eye was random. Comparisons were performed using the unpaired Student’s t-test. A p value of less than 0.05 was considered to denote statistical significance.

#### **RESULTADOS**

We found no gender differences in age (male group 30.5±6.2 years old and female group 29.7±6.1 years old; p=0.375), tonometry (male group 15.3±2.1 mmHg and female group 15.7±2.4 mmHg; p=0.247) and central corneal thickness (male group 528±8.5 µm and female group 526.9±8.8 µm; p=0.258). In addition, we found no gender differences in corneal endothelial cell density (male group 2898±279 cells per mm<sup>2</sup> and female group 2919±277 cells per mm<sup>2</sup>; p=0.585), coefficient of variation in cell size (male group 32.9±4.0 % and female group 32.3±3.4 %; p=0.211), percentage of hexagonal cells (male group 59.4±6.6 % and female group 60.5±6.2 %; p=0.237), and cell area (male group 348.6±37.4 µm<sup>2</sup> and female group 352.1±32.3 µm<sup>2</sup>; p=0.479).

#### **CONCLUSIONES**

Our study has revealed for the first time that there are no gender differences in corneal endothelial cell density, coefficient of variation in cell size, percentage of hexagonal cells, and cell size in young healthy emmetropic subjects.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Sanchis-Gimeno JA, Lleó-Pérez A, Alonso L, Rahhal MS, Martínez Soriano F. Corneal endothelial cell density decreases with age in emmetropic eyes. *Histol Histopathol.* 2005;20(2):423-7.
2. Padilla MD, Sibayan SA, Gonzales CS. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Filipino eyes. *Cornea.* 2004;23(2):129-35.
3. Duman R, Tok Çevik M, Görkem Çevik S, Duman R, Perente İ. Corneal endothelial cell density in healthy Caucasian population. *Saudi J Ophthalmol.* 2016;30(4):236-9.

# THE DROSOPHILA NEPHROCYTE AS A MODEL FOR KIDNEY FAILURE IN TYPE 2 DIABETES.

Ozimski LL, Artero R, Selma-Soriano E.

## INTRODUCCIÓN

Type 2 Diabetes is a serious, lifelong condition which affects millions of people around the world. It has been proven that, as this disease progresses, it can cause chronic kidney disease complicating the lives of affected patients. To research this kidney failure, we have studied the nephrocyte, a part of the *Drosophila* excretory system which has been shown to be affected by diabetic conditions<sup>1</sup>. We chose this model because it shares functional, morphological and molecular features with podocytes, which form the glomerular filter in vertebrates<sup>2</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODOS

To carry out this study, we used the *GAL4/UAS* System<sup>3</sup> to express the *GFP* and *luciferase* genes in nephrocytes under specific drivers such as *Stick-and-stones* (*Sns*) and *Hand*. We measured luminescence levels and the number of nephrocytes. The quantification of luminescence emission was measured using a Tecan plate reader instrument and the number of nephrocytes was observed under a confocal microscope (Zeiss LSM800). All tests were carried out on both normal flies, fed with a sucrose concentration of 0.15 M, and diabetic flies, fed with a sucrose concentration of 1 M. The data was then analysed with a Student's t-test.

## RESULTADOS

We observed no changes to the number of nephrocytes between normal and diabetic flies. However, we observed significant differences in the luminescence signals, which we were able to link to changes in the expression of *Sns*, a specific and essential gene for the nephrocyte's filtration process. This allowed us to design an adequate screening method for diabetic kidney failure.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Our findings confirm that this model is suitable to perform a drug screening in *Drosophila*, in the hope of discovering a compound capable of reversing the signs of kidney failure that could potentially better the lives of patients with type 2 diabetes worldwide.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Na J, Sweetwyne M, Park A, Susztak K, Cagan R. Diet-Induced Podocyte Dysfunction in *Drosophila* and Mammals. *Cell Reports*. 2015.
2. Helmstädter M, Huber TB, Hermle T. Using the *Drosophila* Nephrocyte to Model Podocyte Function and Disease. *Frontiers in Pediatrics*. 2017.
3. Muqit M, Feany M. Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach? *Nature Reviews Neuroscience*. 2002.

# APLICACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS RADIODIAGNÓSTICAS EN REUMATOLOGÍA. REVISIÓN DE 4 CASOS DE AORTITIS INFLAMATORIA NO INFECCIOSA.

*Urios Pastor GE, Pastor Cubillo MD, Campos Fernández C, Rueda Cid A, Molina Almela C, Lerma Garrido JJ, Calvo Catalá J.*

## INTRODUCCIÓN

La aortitis es una inflamación de la pared aórtica, cuya etiología puede variar entre diversas entidades, desde procesos infecciosos hasta enfermedades autoinmunes, pasando por síndromes paraneoplásicos e idiopáticos. Por lo tanto, su pronóstico y tratamiento son variables. La clínica es inespecífica y variable: dolor abdominal, fiebre y pérdida de peso entre otros. Se trata de una enfermedad grave que puede degenerar en aneurisma torácico aórtico.

La tomografía por emisión de positrones (PET-TC) es una de las técnicas de imagen que permiten evaluar tanto la luz como la pared vascular, usándose cada vez más para el diagnóstico, además de utilizarse para el seguimiento de la enfermedad y el control de la respuesta al tratamiento. La PET-TC detecta el aumento del metabolismo en la pared aórtica representado por la acumulación de fluorodeoxiglucosa en fases agudas.

El objetivo del estudio es revisar la casuística de pacientes diagnosticados de aortitis en el Servicio en los últimos 3 años, valorando características clínicas, métodos diagnósticos utilizados y tratamiento recibido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Caso 1:** mujer de 29 años, en estudio por HTA. Angio-TAC: engrosamiento de aorta torácica y aorta abdominal, sugerente de Arteritis de Takayasu. PET-TC: signos inflamatorios en la pared aórtica, compatibles con la sospecha de aortitis. Se inicia tratamiento con corticoides y azatioprina (100 mg/día)

**Caso 2:** mujer de 47 años (20 años evolución de E. Crohn y espondiloartritis). En 2009 inicia tratamiento biológico (infliximab 3,5 mg/Kg cada 8 semanas). Acude a urgencias por dolor abdominal. Eco abdominal, signos de aortitis en aorta infrarrenal hasta bifurcación iliaca. PET-TC: signos inflamatorios en pared aórtica. La paciente responde a tratamiento con infliximab (5mg/Kg cada 8 semanas) y corticoides con recidiva al suspender corticoides por lo que se cambia a adalimumab (40mg cada 14 días).

**Caso 3:** mujer de 54 años con artralgias y reactantes de fase aguda elevados. En TC: dilatación de aorta ascendente. PET-TAC: captación del radiotrazador desde la raíz hacia cayado y aorta descendente y menos en aorta abdominal. Tratamiento con corticoides y 10mg /semanales de metotrexato.

**Caso 4:** mujer de 54 años con artralgias, anemia y reactantes de fase aguda elevados, sin otras alteraciones analíticas. Antecedentes de episodios de FOD con pérdida de peso resueltos con corticoides e IAM 2 años antes. Ecocardiograma: dilatación de aorta ascendente. Angio-TAC: engrosamiento aorta ascendente y aorta abdominal. PET-TAC: captación de radiotrazador en paredes de aorta ascendente, cayado aórtico, aorta descendente. Tratamiento con 15 mg/día de deflazacort y 10 mg/semanales de metotrexato. Todos los casos responden positivamente al tratamiento administrado en última instancia.

Todas las pacientes respondieron positivamente al tratamiento administrado, quedando clínicamente asintomáticas y con normalización analítica.

## RESULTADOS

Se valoran cuatro casos de aortitis, mujeres, edad media de 46 años. Dos pacientes presentaban aortitis primaria, una enfermedad de Crohn y espondilartropatía y una un Takayasu.

Aunque de inicio se realizaron otras pruebas, en los cuatro casos se realizó un PET-TC que mostró afectación de la pared de la aorta de carácter inflamatorio en distintos niveles. Respondieron al tratamiento con corticoides e inmunosupresores y/o terapia biológica. En los cuatro casos se realizó un PET-TC de control que mostró descenso de la actividad metabólica, coincidiendo con mejoría clínica y normalización de reactantes de fase aguda.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

La aortitis afecta más frecuentemente a mujeres de alrededor de 50 años (excepto el Takayasu que por definición es joven) y su presentación clínica es inespecífica y variable, por lo tanto, las técnicas de imagen son de ayuda en el diagnóstico.

El PET-TC se usa cada vez más para diagnosticar la aortitis, porque detecta el aumento del metabolismo en la pared aórtica.

El PET-TC también es útil para seguir la enfermedad y para controlar la respuesta al tratamiento. Se ha demostrado que cuando desciende la actividad metabólica de los vasos afectados se normalizan los marcadores de inflamación y mejoran los síntomas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Gornik HL, Creager MA. [Aortitis](#). Circulation. 2008;117(23):3039–3051
- 2.- Meller J., Strutz F., Siefker U., Scheel A., Sahlmann CO, Lehmann K. Early diagnosis and follow-up of aortitis with [(18)F]FDG PET and MRI Eur J Nucl Med Mol Im, 30 (2003), pp. 730-736
- 3.- Villa I., Agudo Bilbao M., Martínez-Taboada VM. Avances en el diagnóstico de las vasculitis de vasos de gran calibre: identificación de biomarcadores y estudios de imagen. 2011; 7(3), 1-46
- 4.- Restrepo CS, Ocazonez D, Suri R, Vargas D. [Aortitis: Imaging Spectrum of the Infectious and Inflammatory Conditions of the Aorta](#) RadioGraphics. 2011;31(2), 435-451

# BACTEROIDES UNIFORMIS CECT 7771 COMBINED WITH FIBER-ENRICHED DIET AMELIORATES METABOLIC AND IMMUNE ALTERATIONS IN DIET-INDUCED OBESE MICE.

Bullich Vilarrubias C, Romaní Pérez M, López Almela I, Isabel Campillo, Eva M. Gómez.

## INTRODUCCIÓN

Obesity is considered a major health challenge worldwide due to its high prevalence and associated comorbidities. Diet-induced alteration of gut microbiota composition (dysbiosis) contributes to the development of obesity by inducing intestinal inflammation and therefore impairing pathways regulating energy metabolism. Previously, our group has demonstrated that oral administration of the bacterial strain *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in diet-induced obese (DIO) mice; however, the underlying mechanisms of action remain to be elucidated. Therefore, in this study we have examined the mode of action of *B. uniformis* CECT 7771, either alone or combined with a dietary fiber, in order to assess nutritional strategies able to increase its effectiveness on the prevention of obesity at a reduced dose.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Mice were fed for 20 weeks with control diet or high-fat high-sugar diet (HFHSD). Three out of four groups of the HFHSD-fed mice received either a daily dose of *B. uniformis* CECT 7771 by oral gavage ( $5 \times 10^7$  CFU), the HFHSD enriched with 5% of wheat bran extract (WBE, the carbon source inducing the strongest *B. uniformis* CECT 7771 growth) or the *B. uniformis* CECT 7771 combined with the WBE to identify possible synergistic effects on the metabolic phenotype of DIO mice and intestinal immunity.

## RESULTADOS

The combination of *B. uniformis* CECT 7771 and the WBE-enriched HFHSD, but not separately, was effective in reducing body weight (Bw) gain and adiposity in epididymal white adipose tissue (WAT) of DIO mice. Regarding energy metabolism in WAT, the expression of carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1 $\alpha$ , an essential enzyme linked to the mitochondrial  $\beta$ -oxidation of long-chain fatty acids) was increased in all obese groups compared to control group, although this increase was lower in mice fed with *B. uniformis* CECT 7771 in combination with the WBE-enriched diet. Similarly, the expression of uncoupling protein 1 (UCP-1, a key gene in thermogenesis) was significantly higher for obese groups except for the above-mentioned group. In addition, there was a positive correlation between CPT1 $\alpha$  and UCP-1 expression. In beige adipose tissue, there was an interaction effect of *B. uniformis* CECT 7771 and the WBE fiber on the expression of the thermogenic genes Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  coactivator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ ). Regarding intestinal immunity, the reduced expression of occludin in ileon of DIO mice was normalized in the obese mice fed the combination of *B. uniformis* CECT 7771 and WBE fiber, which suggests an improvement of the gut barrier integrity. Additionally, immune cells involved in the regulation of gut barrier function were also affected by HFHSD as shown by reduced levels of type 3 innate lymphoid cells (ILC3) and an increase of induced intraepithelial lymphocytes (IEL) in DIO mice. Both ILC3 and induced IEL were normalized in mice receiving the combination of *B. uniformis* CECT 7771 and WBE.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Administration of *B. uniformis* CECT 7771 in combination with a WBE-enriched diet seems to increase its effectiveness in preventing diet-induced obesity in mice, probably by synergistic effects between this bacterial strain and the fiber. These effects include restoring the energy balance by reducing Bw gain and modulating thermogenesis, as well as restoring the intestinal barrier and immune function. However, more analyses have yet to be done in order to confirm our hypotheses and come to more direct evidence. Overall, using *B. uniformis* CECT 7771 combined with WBE fiber as a dietary strategy targeting gut microbiota may be an effective tool to ameliorate the metabolic phenotype of obesity.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Zou J, Chassaing B, Singh V, Pellizzon M, Ricci M, Fythe MD, et al. Fiber-Mediated Nourishment of Gut Microbiota Protects against Diet-Induced Obesity by Restoring IL-22-Mediated Colonic Health. *Cell Host & Microbe*. 2018;23(1).

Cano PG, Santacruz A, Moya Á, Sanz Y. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 Ameliorates Metabolic and Immunological Dysfunction in Mice with High-Fat-Diet Induced Obesity. *PLoS ONE*. 2012;7(7).

Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, et al. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*. 2012;150(2):366–76.

# MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE DYNAMIC CHANGES OF THE INTERSTITIUM AFTER REPERFUSED MYOCARDIAL INFARCTION

*Maria Ortega, Amparo Ruiz-Sauri, Cesar Rios-Navarro, Jose Gavara, Victor Marcos-Garces, Ana Diaz, Gema Miñana, Francisco J Chorro, Vicente Bodi.*

## INTRODUCCIÓN

The interstitial space is the major fluid compartment in the body. It is mainly composed by cells, fibers and gels of polysaccharides, which act as a compression buffer against the stress placed on the extracellular matrix (ECM). Following myocardial infarction (MI), the myocardium has to withstand higher mechanical stress due to injured cardiomyocytes. Since ECM composition notably influences the mechanical properties of the myocardium and participates in left ventricular remodeling, the histological characterization of ECM changes from ischemia onset until late phases after coronary reperfusion may be relevant.

## MATERIAL Y MÉTODOS

MI was induced in swine by transient 90-min coronary occlusion of the left anterior descending coronary artery using angioplasty balloons. Controls and four MI groups were defined: 1) without reperfusion, 2) 1-min, 3) 1-week, and 4) 1-month reperfusion. Myocardial samples from the infarcted and adjacent area were isolated. Histological staining was performed to evaluate the presence of collagen type I, collagen type III, elastic fibers, and proteoglycans. Moreover, the presence of laminin and fibronectin was determined by immunohistochemistry. Metalloproteases 2 and 9 have also been studied by immunohistochemistry. Four independent photographs were taken and the presence of the different components of the interstitium was morphometrically quantified using Image ProPlus software and then analysed with an ANOVA test using Graphpad software.

## RESULTADOS

The presence of collagen type I and type III was increased in the infarct area after 1-week and 1-month after reperfusion, whereas no changes were detected in the adjacent area. The number of elastic fibers was increased both in the infarcted and adjacent area after 1-week and 1-month post-MI. A reduced presence of proteoglycans was observed in the no reperfusion and 1-min reperfusion groups, while a sharp augmentation was detected in the infarct and adjacent areas isolated from the 1-week and 1-month reperfusion groups. However fibronectin and laminin levels were rapidly increased during ischemia and immediately after reperfusion (1-min reperfusion group) replacing in part the massive loss of cardiomyocytes (Escriba aquí los Resultados que ha obtenido con su estudio.)

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

ECM after MI display dramatic dynamic changes, which might be implicated in supporting the mechanical stress provoked after MI. Our results illustrate the potential of morphometry for since they could be implicated in the fibrotic scar formation and in the resultant cardiac structure.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Yabluchanskiy A, Li Y, Chilton RJ, Lindsey ML. Matrix metalloproteinases: drug targets for myocardial infarction. *Curr Drug Targets* 2013 March 01;14(3):276-286.
2. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol* 2015 September 20;5(4):1841-1875.
3. Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest* 2017 May 01;127(5):1600-1612.
4. Dobaczewski, Marcin|Gonzalez-Quesada, Carlos|Frangogiannis, Nikolaos G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009;48(3):504-511.



# CHARACTERIZATION OF CELLS DISTRIBUTION ON NEUROBLASTOMA-ONCHIP BY MORPHOMETRIC TECHNIQUES.

Vieco-Martí I, Martín-Vañó S, Monferrer E, Carretero A, Navarro S, Samitier J, Noguera R.

## INTRODUCTION

Three dimensional (3D) bioprinting and morphometric analysis are technologies that enables mechanical studies on cancer. Neuroblastoma (NB) is an embryonal tumour derived from neuroectodermal cells. The tumour appears mainly in the adrenal medulla, ganglia and paraganglia of sympathetic nervous system. Approximately 15% of childhood cancer related deaths are caused by NB. Due the huge mortality of the NB, the research of new mechano-therapeutic assay methods is crucial. Here we present the Neuroblastoma-OnChip (NB-Ch), a study on 3D printed matrix with NB cells. The matrix was composed by gelatin-methacryloyl (5%) and variable concentrations of alginate-methacrylate (Alg-M). Each NB-Ch contained approximately 150.000 malignant neuroblasts (SK-N-BE-2 cell line). The objective of this presentation is to show how we studied cells distribution in different stiffness and cultivation times using the Panoramic Viewer (3D HISTECH) software. To know more about 3D bioprinted matrix see [1]. To know more about other morphometric analysis, see [2], [3].

## MATERIAL & METHODS

(The NB-Ch were bioprinted using the 3D Discovery TM Biosafety, Switzerland; 365nm, 3W/cm<sup>2</sup>. The size established of NB-Ch was 6x6 mm. We bioprinted NB-Ch with different stiffness: 0%; 1%; 2% of Alg-M. Each one with approximately 150.000 malignant neuroblasts. After 2, 3 or 4 weeks (cultivation times), the NB-Ch were paraffin embedded and cuted in 3µm serial slides. Then Hematoxilin&Eosine staining were done. The slides were digitalized using the Panoramic Midi (3D HISTECH). The image analysis was done using the software Panoramic Viewer (3D HISTECH) following three steps: 1) zooming the image to locate the clusters (we denominate clusters to the cells aggrupation retained in the matrix); 2) annotate clusters and total sample (surrounding each cluster area and the total image area including clusters plus matrix plus empty spaces); 3) create a mask to select the solid area using HistoQuant module (we obtained the area of all clusters plus the matrix stained area, holes were not selected). With the data obtained by the annotation process and the HistoQuant tool, we were able to know the matrix area (total annotated area-solid area).

## RESULTS

We analysed 9 NB-Ch images (3 stiffness x 3 times). Three range of clusters (small, medium and large, from <400 to >2000 µm<sup>2</sup>) and multiples morphometric characteristics as percentage of occupation of clusters (cluster area/matrix area), porosity of the matrix (holes area/total area) and density of clusters (number of clusters/solid area) were established. This characteristics allowed us to quantify the moisture of the matrix and the cells distribution in each stiffness and cultivation time

## CONCLUSIONS

All the preliminary data obtained will allow us to improve pathological tumour microenvironmental NB-Ch tuning their composition, geometry and stiffness and using this revolutionary *in vitro* assays to the molecular mechanobiology research therapies

## BIBLIOGRAPHY

[1] García-Lizarribar A, ..., Samitier J, Ramon-Azcon J. Composite Biomaterials as Long-Lasting Scaffolds for 3D Bioprinting of Highly Aligned Muscle Tissue. *Macromol. Biosci.* 2018, 18, 1800167.

[2] Tadeo I, ..., Noguera R. A stiff extracelular matrix is associated with malignancy in peripheral neuroblastic tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2017; 64: e26449.

[3] Tadeo I, ..., Noguera R. Extracellular matrix composition defines an ultra-high-risk group of neuroblastoma within the high-risk patient cohort. *British Journal of Cancer.* 2016, 115, 480-489.

# INFLUENCIA DE LA MECANOTRANSDUCCIÓN EN LA PROGRESIÓN TUMORAL EN LA GLÁNDULA MAMARIA MURINA.

Risueño-Merino C, Villarroya O, Costell M

## INTRODUCCIÓN

La integrina  $\alpha 5\beta 1$  ha sido descrita como el único mecano-receptor capaz de sentir y transducir cambios de rigidez de la matriz extracelular al interior celular [1]. La adhesión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  al motivo RGD de la fibronectina (FN) se ve reforzada por la unión al motivo sinérgico de la FN. Nuestro objetivo principal es estudiar la importancia del sitio sinérgico en situaciones donde existe una alta tensión de la matriz extracelular, como puede ser la progresión neoplásica durante el cáncer de mama. Para ello y, basándonos en estudios previos en los que se ha observado que matrices extracelulares anormalmente rígidas conducen a una velocidad de crecimiento tumoral más rápida [2,3], hemos utilizado la cepa de ratones que tiene inactivado el sitio sinérgico de la FN cruzada con la cepa transgénica murina modelo de cáncer de mama *MMTV-PyMT*.

Nuestra hipótesis es que, incluso si la matriz extracelular (MEC) tumoral tiene una rigidez inusualmente alta, si la señal de mecano-transducción de la matriz hacia las células tumorales está inhibida esto puede influir en el crecimiento del tumor [3]. De modo que vamos a analizar las diferencia en el desarrollo tumoral en ratones *Fn1<sup>wt/wt</sup>PyMT<sup>+/-</sup>* y *Fn1<sup>syn/syn</sup>PyMT<sup>+/-</sup>* (que expresan FN con el sitio sinérgico inactivado) vírgenes hembra a los 60 y 100 días de edad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el estudio de la caracterización de la MEC y el estado del tejido neoplásico debemos seleccionar los ratones de la condición *Fn1<sup>wt/wt</sup>PyMT<sup>+/-</sup>* y *Fn1<sup>syn/syn</sup>PyMT<sup>+/-</sup>* y además un control de tejido normal de ambos genotipos de FN como control de tejido sano. Los ratones son genotipados previamente al sacrificio para identificar los ratones de interés. Con el sacrificio del ratón obtenemos cuatro pares de glándulas mamarias que son incluidas en parafinas para cortarlas en secciones con micrótopo. Las utilizaremos para caracterización del tumor y de la matriz con histoquímica. Además, usamos las secciones para realizar inmunohistoquímica para testar la distribución y cantidad de proteínas como FN y colágeno. Todas las imágenes obtenidas por el microscopio se han editado y analizado con Photoshop 6.0 e ImageJ, Los datos se representaron y trataron estadísticamente con GraphPad y Rstudio,

## RESULTADOS

Parte del peso de este proyecto está en la caracterización tumoral. Se han realizado las mediciones de una manera reduccionista en la que primeramente empezamos por medir las mamas en el tejido entero, para ver el tamaño de la afección tumoral, y luego se procede a analizar la afección tumoral y el estadio de los focos tumorales, el número de focos tumorales secundarios y la progresión neoplásica [4]. Se observa que hay una diferencia significativa en el número de focos secundarios y el área de estos focos, entre el genotipo *Fn1<sup>wt/wt</sup>PyMT<sup>+/-</sup>* y *Fn1<sup>syn/syn</sup>PyMT<sup>+/-</sup>*, teniendo el genotipo de interés, el mutante, un menor número y área de focos secundarios, indicativo de una ralentización en la progresión tumoral. Además, los estadios en los que estos se encontraban eran de un grado menor al del genotipo silvestre. Respecto, a la caracterización de la rigidez de la MEC se ve como el tejido con afección tumoral tiene mayor rigidez, y el genotipo *Fn1<sup>syn/syn</sup>PyMT<sup>+/-</sup>*, respecto al *Fn1<sup>syn/syn</sup>PyMT<sup>+/-</sup>*, se ha visto reducido la cantidad de colágeno en la MEC.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La mutación de la fibronectina en el sitio sinérgico sugiere que no afecta a la composición de fibronectina en la matriz extracelular [2]. Pero hay una disminución de tumores secundarios en los ratones de genotipo mutante que está asociado con una menor malignidad y un enlentecimiento en la progresión tumoral respecto al genotipo silvestre. Esta mutación está afectando al estado de rigidez de la MEC [3].

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.** N. Strohmeyer, M. Bharadwaj, M. Costell, R. Fässler, D. J. Müller, Fibronectin-bound  $\alpha 5\beta 1$  integrins sense load and signal to reinforce adhesion in less than a second. *Nature Materials* 2017 Nov 16,1262-1270
- 2.** Benito-Jardón M, Klapproth S, Gimeno-LLuch I, Petzold T, Bharadwaj M, Müller DJ, et al. The fibronectin synergy site re-enforces cell adhesion and mediates a crosstalk between integrin classes. *eLife* 2017 Jan 16,;6.
- 3.** Miroshnikova YA, Rozenberg GI, Cassereau L, Pickup M, Mouw JK, Ou G, et al. alpha5beta1-Integrin promotes tension-dependent mammary epithelial cell invasion by engaging the fibronectin synergy site. *Mol Biol Cell* 2017 Nov 01;28(22):2958-2977.
- 4.** Lin EY, Jones JG, Li P, Zhu L, Whitney KD, Muller WJ, et al. Progression to Malignancy in the Polyoma Middle T Oncoprotein Mouse Breast Cancer Model Provides a Reliable Model for Human Diseases. *American Journal of Pathology* 2003 Nov 1,;163(5):2113-2126.

# CRONO-ONCOLOGÍA: NUEVO ABORDAJE DE LA LEUCEMIA

Martínez FJ, Bolado D, Jiménez C, González C, Sanfeliú N, Fajardo D

## INTRODUCCIÓN

Se ha propuesto en los últimos años que la alteración en la expresión de los genes del reloj tiene un rol crítico en la aparición y severidad de distintos tipos de cáncer. Todavía es necesario un estudio más detallado que pueda aportar datos concluyentes, si bien se ha demostrado que su participación en el proceso de alteración de la proliferación celular es significativa. En la siguiente revisión se pretende resumir y recolectar algunos de los datos más relevantes sobre la relación entre los genes del reloj biológico y la leucemia.

## RESULTADOS

Se ha visto una relación entre la alteración del patrón de expresión de tres de los genes del reloj (*BMAL1*, *PER* y *CRY*) y los cuatro tipos principales de leucemia: leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (AML) y leucemia linfocítica aguda (ALL). Un estudio sugirió que *BMAL1* presenta una expresión menor en AML [1]. También se observó una expresión disminuida de *BMAL1* en CML y CLL [2][3], si bien no se detectó una reinducción de la expresión tras la recuperación de los pacientes. Además de *BMAL1*, se encontró también una expresión menor de *CRY1/2* y *PER1/2/3* en CML y AML, que junto a *BMAL1*, mostraron correlación entre el grado de disminución de la expresión y la fase clínica de la leucemia, habiendo menos expresión cuanto más avanzado se encontrase el cáncer [2][4]. *PER1/2* también parece expresarse menos en CLL [3]. No se ha estudiado de manera profunda el mecanismo por el que los genes del ciclo se ven afectados en su expresión, aunque se tienen ciertos datos: por ejemplo, un estudio vio que *PER3* se encontraba metilado en todas las muestras de CML que se analizaron [2]. *PER3* y *CRY1* también mostraron una expresión reducida en ALL [4]. Es especialmente relevante el efecto que parece tener la expresión alterada de *PER3* en la leucemia aguda, donde se vio correlación entre el índice de mejora de los pacientes y una recuperación de la expresión del gen. Un estudio sugirió que *CLOCK*, otro gen del reloj importante con relación con otros tipos de cáncer no muestra una alteración de su expresión en pacientes con CML, AML y ALL, además de no presentar un patrón de expresión rítmico en leucocitos.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Los genes del reloj, exceptuando *CLOCK*, son uno de los factores a tener en cuenta en el estudio de la leucemia, de cualquier tipo. Por lo general se ve en todos una disminución de la expresión, lo que puede llevar a alteraciones en la expresión de otros genes relacionados con la proliferación celular. De forma destacable, *PER3* se postula como una de las dianas clave para encontrar nuevas terapias contra la leucemia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Yang MY, Ling SF. The role of circadian clock genes in leukemia. *Transl Cancer Res* (2016); 5(Suppl2):196-198. doi: 10.21037/tcr.2016.07.46
2. Yang MY *et al.* Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: Alternative methylation pattern of hPER3. *Cancer Sci* (2006); 97(12):1298–1307. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00331.x
3. Rana S *et al.* Deregulated expression of circadian clock and clock-controlled cell cycle genes in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Biol Rep* (2014); 41(1):95-103. doi: 10.1007/s11033-013-2841-7
4. Yang MY *et al.* Up-regulation of PER3 Expression Is Correlated with Better Clinical Outcome in Acute Leukemia. *Journal of Biological Rhythms* (2015); 26(2):136–148. doi: 10.1177/0748730410395527

# **SIMULACIÓN CLÍNICA: PROYECTO DE INNOVACIÓN EDUCATIVA EN REANIMACIÓN CARDIOPULMONAR BÁSICA Y AVANZADA EN PEDIATRÍA Y NEONATOLOGÍA.**

*Patiño Serra M, Tévar Jareño L, Tortajada Lohaces A, Balaguer López E.*

## **INTRODUCCIÓN**

Hoy en día la simulación clínica podría ser un eslabón clave en la enseñanza y aprendizaje de distintos procedimientos, el aprendizaje correcto de las maniobras y secuencia de la Reanimación Cardiopulmonar (RCP) puede salvar muchas vidas por ello la importancia de que este proceso se aprenda de la mejor forma posible.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se trata de un estudio cuasiexperimental, utilizando tres cuestionarios de evaluación como método para recoger la información respectiva a la adquisición de competencias y satisfacción del alumnado referente a una formación teórico - práctica sobre RCP pediátrica y neonatal a alumnos/as de 2º curso de Enfermería. Para comprobar que este tipo de enseñanza era adecuada se evaluaron sus conocimientos previamente y posteriormente a la simulación, mediante los cuestionarios pre-test y post-test. Las preguntas fueron tipo test con cuatro posibles respuestas, donde solamente una era la correcta. Además, se pasó un cuestionario de satisfacción al alumnado tras la simulación. Para llevar a cabo estas simulaciones se contó con la participación de 3 alumnos de 4º curso y 3 alumnas de 3º curso de enfermería que ejercieron de monitores de RCP básica. Además, se contó con 16 enfermeros/as ya titulados/as como monitores/as de RCP avanzada

## **RESULTADOS**

El total de la muestra fue 228 de los 240 matriculados en la asignatura (los 12 restantes no acudieron a la práctica o no realizaron las encuestas). La nota media otorgada por los/las 228 encuestados/as es de 8,82 (DE 0,42) sobre 10. El ítem más valorado por el alumnado fue el relacionado con la recomendación del laboratorio. Respecto a los resultados del pre-test y post-test se produjo una mejora en 7 de las 11 preguntas tipo test. La que más aciertos obtuvo en el pretest fue la que relacionaba el número de compresiones y ventilaciones en un lactante. Por el contrario, en post test la que más aciertos tuvo fue la que preguntaba por el material utilizado en una RCP instrumentalizada.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Actualmente nos encontramos en un momento dónde la innovación educativa es clave en la formación de futuros/as profesionales.

Las simulaciones tuvieron un gran nivel de satisfacción y a pesar de que se vivieron situaciones de estrés muchos/as de los/las alumnos/as dijeron que era la mejor forma de aprender. Además, también sirvió para reforzar los conocimientos de los/las alumnos/as de 3º y 4º del grado de Enfermería.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Miller GE. The assessment of clinical skills/competence/performance. Acad Med 1990; 65 Supl 9:S63 -S67.
2. European Resuscitation Council. Mission of European Resuscitation Council. 2018. Disponible en: <https://www.erc.edu/about> [acceso: 02/10/2018].
3. García-Molina, Pablo, Blasco, José, Balaguer-López, Evelyn, Tortajada Lohaces, Alejandro, Sanchis-Sánchez, Enrique, Georgieva, Sylvia y Montserrat Sánchez-Lorente, María. Educational innovation in basic and advanced cardiopulmonary resuscitation in pediatrics and neonatology in a realistic context. 2018 10.4995/HEAD18.2018.7945.

## **PÓSTERES, TURNO 3.**

### **CLONING AND TAGGING OF THE FULL-LENGTH O-LINKED N-ACETYLGUCOSAMINE TRANSFERASE GENE INTO pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®.**

*Márquez Thibaut L, Colombo SL.*

#### **INTRODUCCIÓN**

O-GlcNAc modification (O-GlcNAcylation) is mainly controlled by O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) and consists in the transfer of a single N-acetylglucosamine to serine or threonine residues in O-glycosidic linkage. Previous studies have found that O-GlcNAc modification is frequently related to epigenetic regulation and in consequence, in the development of diseases such as diabetes. The specific role of OGT in epigenetic processes is under study these days. Here we show the creation of a genetic tool which can be used to characterize the role of OGT in epigenetics.

#### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Amplification of full-length OGT gene by PCR was carried out, followed by a TOPO cloning reaction to insert the gene in a TOPO plasmid. A bacterial transformation and screening were made using the resulting plasmid, which was later purified and concentrated in order to sequence it. A cell transfection of the plasmid was made with HEK293 cells and subsequently a protein extraction from these cells. Finally, a western blot was developed to test the functionality of our OGT gene.

#### **RESULTADOS**

PCR products were of expected length (3000 bp) which suggests we amplified OGT gene. Both TOPO cloning reaction and bacterial transformation were successful for some colonies (#6 and #8), as shown in the screening results. However, once the resulting plasmid was sequenced from them, we found two mutations in its sequence that slightly change the catalytic domain of OGT. Despite this, the plasmid was successfully transfected, and we found by a western blot that the final vector generates OGT efficiently (tagged with V5).

#### **DISCUSIÓN**

Our results show that the OGT gene was successfully subcloned into pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® vector. We have also found two mutations in the catalytic domain sequence of OGT. These mutations are surely due to Taq DNA polymerase used in all PCRs, which has an error rate of 1 in 9,000 nucleotides. To improve the amplification, another polymerase could be used, as Q5High-Fidelity DNA Polymerase. Despite these mutations, we have found that the final vector generates OGT efficiently. In conclusion, the work presented here describes how to subclone the OGT full-length gene in the vector pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®V5, giving a plasmid able to produce the enzyme OGT. From this work, it is expected to continue improving the pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® OGT FL vector as a tool, for example, correcting the previous mutations and checking if the OGT generated is functional. And beyond, making use of this vector to investigate the function of OGT in epigenetic changes.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Hanover JA, Krause MW, Love DC. Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Molecular cell biology*. 2012; 13: 312-321.
- (2) Ma J, Hart GW. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics*. 2011; 10 (4): 365-380.
- (3) Wu D, Cai Y, Jin J. Potential coordination role between O-GlcNAcylation and epigenetics. *Protein cell*. 2017; 8 (10): 713-723.
- (4) Yang X et al. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*. 2008; 451: 964-969.

# PAISAJES VASCULARES EN EL MENINGIOMA. ANÁLISIS DE MICROMATRICES TISULARES

González M, Navarro L, Santonja N, Megías J, San-Miguel T.

## INTRODUCCIÓN

El meningioma (MN) es el tumor del SNC más frecuente en adultos y con predilección por afectar a las mujeres. Aunque habitualmente es benigno y curable por cirugía, hasta un 20% de los casos recidivan. La OMS caracteriza 3 grados en función de su agresividad. Los MN grado I son en principio benignos pero su elevada frecuencia y su delicada localización justifican la necesidad de mejorar la predicción de esta agresividad. El MN es un tumor muy vascularizado. Diferentes trabajos han abordado su vascularización y la neoangiogénesis vinculada al crecimiento tumoral si bien los resultados hasta la fecha no aportan de manera constante, valor significativamente pronóstico. En este trabajo nos proponemos iniciarnos en Patología Digital mediante el uso de Sistemas Automatizados de Escaneado, desarrollar protocolos para la manipulación de imágenes, analizar la vascularización en el MN y relacionarla con los datos clínicos e histopatológicos de los pacientes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de 130 pacientes del HCUV. Tras la fijación, procesamiento y diagnóstico histológico, se construyeron micromatrices tisulares (TMA) que fueron seccionados y teñidos con HE. Se realizó la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-CD34 humano (Agilent Spain). Las TMAs se escanearon con Ventana iScan HT (Roche Diagnostics). Para el manejo de las imágenes se testearon los programas: FIJI, CellProfiler, ImageMagickDisplay, GIMP, Adobe Photoshop, CaseViewer, Pathomation y QuPath. La vascularización se valoró manualmente considerando intensidad, focalidad y heterogeneidad de los vasos. El análisis estadístico se realizó con SPSS Statistics (IBM España).

## RESULTADOS

Entre los programas testeados, QuPath permitió abrir archivos de tamaño >1 GB y cooperar con FIJI. Permitted extraer los cores de las TMAs conservando tamaño de píxel y escala y proporcionó imágenes compatibles con otros softwares. Tras la observación de las imágenes, identificamos 4 paisajes vasculares fácilmente distinguibles, presentes en un 23.1% de las 130 muestras analizadas. Sorprendentemente, el 80% de los casos que encajaban en estos paisajes fueron tumores primarios (TP) de grado I no recidivantes ( $p=0.021$ ). De hecho, al dicotomizar los grupos en TP grado I que no recidivaron (A) y resto de MNs -grados superiores y tumores recidivantes- (B, encontramos estos paisajes “benignos” en el 39.3% del grupo A y sólo en el 8.6% del B ( $p<0.001$ ).

## DISCUSIÓN/CONCLUSIONES

La morfología del MN es muy heterogénea, como se observa en sus patrones histológicos. La morfología de su sistema vascular es también muy variable, pero ni la cantidad de vasos ni la superficie vascularizada se asocian con la evolución de los pacientes o con el grado histopatológico. El MN presenta paisajes vasculares reconocibles visualmente en microfotografías de alta calidad. La mayor parte de ellos corresponden a tumores clasificados histológicamente como benignos (grado I). También son estadísticamente más frecuentes en tumores de comportamiento benigno sin considerar el grado. Las siguientes etapas consisten en: automatizar el análisis de imágenes vasculares para identificar parámetros morfométricos diferenciales entre los casos con estos paisajes y el resto; analizar la neoangiogénesis tumoral con marcadores específicos (CD105) y aplicar los protocolos desarrollados hasta el momento para su asociación con el pronóstico de los pacientes.

Proyecto GV/2018/130.

## BIBLIOGRAFÍA

Karsy M, Burnett B, Di Ieva A, Cusimano M, Jensen RL. Microvascularization of Grade I Meningiomas: Effect on Tumor volume, Blood loss, and Patient outcome. *J Neurosurg.* 2018; 128(3):657-666  
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.



# ASOCIACIÓN ENTRE EL CONSUMO DE DETERMINADOS ALIMENTOS Y LA PERCEPCIÓN DE LA FELICIDAD EN HOMBRES Y MUJERES CON SÍNDROME METABÓLICO

*De la Cámara E, Fernández-Carrión R, Barragán R, Asensio EM, Ortega-Azorín C, Carrasco P, Portolés O, Sorlí JV, Martínez-Lacruz R, Giménez-Alba JJ, Betancourt A, Corella D.*

## INTRODUCCIÓN

Varios estudios han mostrado que las situaciones de ansiedad o de tristeza pueden estar relacionadas con el consumo de determinados alimentos como chocolate, dulces, bebidas azucaradas, etc. Por otra parte, también existen estudios que han propuesto que el consumo de alimentos más saludables está relacionado con una mejor salud y calidad de vida que a su vez pueden dar lugar a una mayor percepción de la felicidad. Sin embargo, son muy escasos los estudios que hayan analizado directamente la relación entre consumo de alimentos y felicidad. Nuestro objetivo es conocer las asociaciones entre la felicidad percibida y el consumo de grupos de alimentos y de alimentos concretos en personas con síndrome metabólico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos estudiado 238 personas con síndrome metabólico (110 hombres y 128 mujeres) con medias de edad de  $64 \pm 5$  y  $66 \pm 4$  años, respectivamente. La felicidad percibida la hemos medido mediante el Oxford Happiness Questionnaire (OHQ) que consta de 29 ítems que se agrupan en una escala likert global. El consumo de alimentos y de energía y nutrientes se ha estimado mediante un cuestionario validado. Mediante modelos lineales multivariantes generalizados hemos estudiado la asociación entre alimentos y felicidad.

## RESULTADOS

No hubo diferencias ( $P=0,505$ ) de medias de felicidad por sexo ( $4,6 \pm 0,1$  en hombre y  $4,5 \pm 0,1$  en mujeres en un rango de 1-6, en un modelo ajustado por edad e índice de masa corporal (BMI). Al estudiar la asociación de los grandes grupos de alimentos (frutas, verduras, carnes, lácteos, aceites, legumbres, pescados, frutos secos) con la felicidad en un modelo multivariante, sólo se observaron asociaciones estadísticamente significativas para el consumo de verduras en hombres (mayor consumo de verduras se asoció con mayor felicidad  $P=0,014$ ). Al estudiar alimentos específicos como chocolates, jamón serrano, aceite de oliva, yogures, refrescos, zumos, cafés y snacks, solo observamos una asociación estadísticamente significativa entre mayor consumo de snacks y menor felicidad en hombres ( $P=0,047$ ), pero no en mujeres ( $P=0,734$ ). En cambio, el mayor consumo de jamón serrano se encontró al límite de la significación estadística con mayor felicidad en mujeres ( $P=0,080$ ), pero no en hombres ( $P=0,854$ ).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

En conclusión, la relación entre consumo de alimentos y felicidad percibida es compleja, y con algunas diferencias entre hombres y mujeres.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mujcic R, J Oswald A. Evolution of Well-Being and Happiness After Increases in Consumption of Fruit and Vegetables. *Am J Public Health.* 2016;106(8):1504-10.
2. Galilea-Zabalza I, et al., PREDIMED-PLUS Study Investigators. Mediterranean diet and quality of life: Baseline cross-sectional analysis of the PREDIMED-PLUS trial. *PLoS One.* 2018;13(6): e0198974.
3. Mejía-Lancheros C, et al., PREDIMED Study Investigators. Impact of psychosocial factors on cardiovascular morbimortality: a prospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014; 14:135.
4. Bailey A, Bailey S, Bernoth M. "I'd rather die happy": residents' experiences with food regulations, risk and food choice in residential aged care. A qualitative study. *Contemp Nurse.* 2017;53(6):597-606.



# INESTABILIDAD GENÉTICA DEL CROMOSOMA 1. ESTUDIO DE 10 TRASLOCACIONES RECÍPROCAS, ANÁLISIS DE SUS PUNTOS DE RUPTURA Y CONSECUENCIAS CLÍNICAS.

*De Vicente-Donderis A, Muñoz-Hidalgo L, Gil-Benso R, Cerdá-Nicolás M, López-Ginés C.*

## INTRODUCCIÓN

El fin último de la división celular es el de duplicar con precisión el genoma y posteriormente dividirlo en dos células hijas. La inestabilidad genética representa una probabilidad aumentada de cambios en el genoma durante el ciclo celular y está asociada a una incapacidad de replicar el genoma correctamente y de dividirlo. Una traslocación recíproca se define como el cambio de posición relativa de un fragmento cromosómico dentro del genoma sin pérdida ni ganancia neta de material genético. Estos cambios producen una clínica variada que abarca desde anomalías en el patrón de desarrollo físico e intelectual hasta problemas reproductivos, entre muchos otros. El objetivo de este trabajo es estudiar la inestabilidad genética del cromosoma 1, analizando sus puntos de rotura, los genes implicados y sus consecuencias clínicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Presentamos el estudio citogenético de diez translocaciones recíprocas con implicación del cromosoma 1, obtenidas de un total de 50 translocaciones en una población de estudio de 15.000 pacientes. Para el estudio citogenético se ha utilizado la técnica estándar de bandeado cromosómico Bandas-G, tripsina y Giemsa, y la técnica de Hibridación In Situ de Fluorescencia (FISH). Para el estudio de los genes implicados se ha utilizado el repositorio OMIM.

## RESULTADOS

Se analizan las 10 traslocaciones recíprocas, de las cuales 6 corresponden a mujeres y 4 a varones. Se valora el fenotipo (7 presentan rasgos patológicos) y se lleva a cabo un estudio familiar. Se escogen 3 traslocaciones para profundizar en su estudio siendo representativa la 1ª de esterilidad, la 2ª de segregación anómala y la 3ª de fenotipo patológico.

El primer caso de estudio fue un varón de 29 años que presentaba esterilidad, con fórmula **46, XX, t(1;7) (p11;q11)**. Durante la meiosis, de las seis combinaciones gaméticas posibles se seleccionarían tanto la adyacente 1 como la adyacente 2, todos ellos no viables al ser de gran tamaño los fragmentos que se han intercambiado, dando como resultado trisomías y monosomías parciales con una gran carga genética.

El segundo caso fue una mujer de 26 años que no presentaba ninguna característica clínica relevante. Su fórmula cromosómica fue: **46, XX, t(1;20) (q43;q13)**. Su hijo presentó al nacer un fenotipo patológico con las siguientes características: Microcefalia, Epicantus, Hipertelorismo o Estrabismo entre otros. El análisis cromosómico reveló el siguiente cariotipo: **46, XY, der(1)t(1;20)**. El hijo heredó un gameto anómalo con con monosomía parcial del cromosoma 1 y trisomía parcial del cromosoma 20.

El tercer caso de estudio hace referencia a un niño varón, al que a los dos años de edad se le diagnostica una **Distrofia muscular facio-escápulo-humeral**. El estudio citogenético reveló el siguiente cariotipo: **46, XY, t(1;15)(q43;q21)**. La traslocación estuvo presente en la madre y en la hermana sin rasgos clínicos y se ha identificado el **gen inositol 1'4'5'-trifosfato 3 quinasa A** en la región afectada.

Finalmente, se correlacionan los puntos de ruptura de las regiones 1p11, 1p32, 1q25, 1q32, 1q42, 1q43 y 1q44 con los genes más representativos allí ubicados, abarcando sus funciones desde el transporte vesicular hasta la apoptosis pasando por la codificación de miRNA o de ribosomas mitocondriales entre muchos otras.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

El cromosoma 1 presenta una gran inestabilidad genética, existiendo un gran número de alteraciones cromosómicas donde está implicado. La mayor parte de sus regiones son muy ricas en genes codificantes con un número de funciones de muy distinta naturaleza. En nuestros resultados, al igual que en la bibliografía consultada, la segregación gamética se produce tanto de forma alternante como adyacente, sin embargo será muy frecuentemente de ésta última manera con lo que se producen gametos desequilibrados. Además, es frecuente que como resultado de la segregación se produzcan trisomías y monosomías parciales no compatibles con la vida, dando como resultado problemas de infertilidad o abortos recurrentes. Cuando los gametos desequilibrados son viables, los niños afectados nacen con patología diversa. Y es que aunque las translocaciones recíprocas no suponen ni pérdida ni ganancia de material genético (lo que en principio no supondría patología para el portador), en el caso de que el punto de rotura fragmentara un gen codificante podría tener como consecuencia un fenotipo anómalo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. *Genomic instability-an evolving hallmark of cancer*, Nat Rev Mol Cell Biol. 2005; 11(3):220.
- 2.- Warburton D. *De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints*, Am J Hum Genet. 1991; 49(5):995.
- 3.- Wilch ES, Morton CC. *Historical and Clinical Perspectives on Chromosomal Translocations*. In Springer, editor. *Chromosome Translocation*. Singapore: 2018. p.1-14.

## **PÓSTERES, TURNO 4.**

# **PATRÓN DE ACTIVACIÓN MUSCULAR DURANTE LA ABDUCCIÓN DE CADERA EN DECÚBITO LATERAL.**

*Alba Cuerda del Pino, Rodrigo Martín San Agustín, Josep C. Benítez Martínez, Antonio Silvestre Muñoz.*

## **INTRODUCCIÓN**

Dentro de los test de evaluación funcionales, existen pruebas básicas que reproducen patrones de activación de actividades de la vida diaria. Un ejemplo de ello es el test de extensión de cadera en prono, el cual reproduce la extensión de cadera durante la marcha. Mediante tal test se ha evidenciado que el glúteo mayor se activa con mayor retardo que el semitendinoso o erectores espinales en gente sana (Sakamoto et al., 2009). Otro test utilizado en el ámbito clínico es la abducción de cadera en decúbito lateral (ACDL), el cual evalúa el equilibrio en la activación de los músculos implicados en tal gesto (Lee et al., 2014). Aun así, el patrón de activación en gente sana no ha sido explorado anteriormente como si ocurre en otros tests, ya que la literatura existente es en población afecta (Sutherlin et al., 2015). Por ello, el objetivo principal fue examinar el patrón de activación en la ACDL. Un objetivo secundario fue examinar diferencias entre sexos en los tiempos de activación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

10 estudiantes sanos, 5 hombres (22.0 años; 86.0 kg; 173.0 cm) y 5 mujeres (21.4 años; 55.2 kg; 166.4 cm), fueron evaluados en este estudio. Los sujetos se colocaron en decúbito lateral en una camilla. Los electrodos de electromiografía (EMG) se colocaron siguiendo las recomendaciones del SENIAM. Los músculos evaluados fueron el bíceps femoral (BF), tensor de la fascia lata (TFL), glúteo medio (GMed) y longísimo (Long). La activación de los músculos se registró mediante EMG en 3 ensayos de la prueba ACDL. La señal se filtró y se realizó el promedio de los 3 intentos para cada músculo. Los tiempos de retardo de los músculos fueron relativizados por el tiempo de activación del primer músculo en activarse (Tateuchi et al., 2013). La prueba t de Student de muestras dependientes fue utilizada para comparar los tiempos de retardo. La prueba t de Student de muestras independientes fue utilizada para analizar las diferencias de sexo entre los músculos. Los valores fueron expresados en medias desviaciones estándar.

## **RESULTADOS**

BF fue el primer músculo en activarse. La figura muestra el patrón de activación para la abducción de cadera con los tiempos de inicio del TFL, GMed y Long relativizados por el tiempo de inicio del BF. No existieron diferencias significativas entre los tiempos de inicio del TFL ( $1.760,3 \text{ ms} \pm 1.523,8$ ), GMed ( $802,4 \text{ ms} \pm 487$ ) y Long ( $1.626,7 \text{ ms} \pm 2.232$ ). No existieron diferencias entre sexo para ninguno de los tiempos de inicio.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

El principal hallazgo de nuestro estudio fue que el BF fue el primer músculo en activarse en el test de ACDL, seguido del GMed. Las no diferencias significativas existentes entre los retardos pueden ser debidas a la pequeña muestra utilizada. Aun así, los 802 ms de retardo del GMed podrían sugerir una falta de estabilización lumbopélvica, debido a su implicación en esta función. No obstante, se requieren futuros estudios que aborden esta relación con una mayor muestra. Además, según nuestro conocimiento, este estudio es el primero en explorar diferencias entre sexos en el test de ACDL, sin hallar diferencias significativas. Este hallazgo podría indicar que un movimiento libre de carga los tiempos de activación no se alteran entre hombres y mujeres.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Sakamoto A, Teixeira-Salmela L, de Paula-Goulart F, de Moraes Faria C, Guimarães C. Muscular activation patterns during active prone hip extension exercises. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 2009;19(1):105-112.

2. Lee J, Cynn H, Kwon O, Yi C, Yoon T, Choi W et al. Different hip rotations influence hip abductor muscles activity during isometric side-lying hip abduction in subjects with gluteus medius weakness. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 2014;24(2):318-324.
3. Sutherlin M, Hart J. Hip-Abduction Torque and Muscle Activation in People with Low Back Pain. *Journal of Sport Rehabilitation*. 2015;24(1):51-61.
4. Tateuchi H, Tsukagoshi R, Fukumoto Y, Akiyama H, So K, Kuroda Y et al. Pelvic instability and trunk and hip muscle recruitment patterns in patients with total hip arthroplasty. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 2013;23(1):151-158.
5. Park K, Kim S, Oh D. Effects of the pelvic compression belt on gluteus medius, quadratus lumborum, and lumbar multifidus activities during side-lying hip abduction. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 2010;20(6):1141-1145.

# STUDY OF GENES RELATED TO LIPID METABOLISM IN C2C12 CELL TREATED WITH RESVERATROL.

*Parejo S., Sánchez-Morate E., Gimeno-Mallench L., Gambini J, Viña J.*

## INTRODUCCIÓN

Optimal levels of macronutrients in our body, such as fatty acids or glucose, are critical to properly regulate appetite and energy balance. Moreover, micronutrients ingested through dietary antioxidants can contribute to regulate energy metabolism. There is evidence that resveratrol, a natural polyphenol compound, present in some plants and fruits, especially in grapes, peanuts and red wine. Resveratrol have many biological properties, including metabolic effects on lipid and glucose metabolism (1). Therefore, we studied the metabolic effects of resveratrol and its role in one of the key pathways in the regulation of lipid metabolism.

## MATERIAL Y MÉTODOS

For this purpose, we used mouse myoblast C2C12 cells. These cells were cultured in normal growth medium consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose supplemented with 10% Fetal Bovinum Serum (FBS), 1% penicillin and streptomycin (P/S) in 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Once the cells have reached approximately 80% confluence the myogenic differentiation were induced with the differentiation medium (DM) composed by DMEM high glucose supplemented with 2% horse serum to initiate the differentiation of myoblasts into myotubes (2). The medium was replaced with fresh DM every 2 days for 9 days. After the differentiation, we treated 6 plates of differentiated cells with resveratrol 1 nM, using dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.001% as control, two consecutive days. After 24 hours, we analysed the expression of different genes involved in lipid metabolism by PCR.

## RESULTADOS

The results show that cell treated with resveratrol overexpressed AMP activated kinase (AMPK), which inhibits acetyl CoA carboxylase 1 (ACC1). This entails an increase in the expression of fatty acid transporters, trough the increment of carnitine palmitoyl-transferase-1 (CPT1), into the mitochondria leading to higher  $\beta$ -oxidation through overexpression of enoyl CoA hydratase-1 (Echs1).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

These data show that resveratrol induces lipid catabolism in C2C12 differentiated cells, by inducing changes in expression of the limiting enzymes of lipid metabolism.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015:837042.
2. Hwang SY, Kang YJ, Sung B, Jang JY, Hwang NL, Oh HJ, et al. Folic acid is necessary for proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. *J Cell Physiol.* febrero de 2018;233(2):736-47.

# ASSOCIATION OF KLOTHO GENE POLYMORPHISMS WITH APPEARANCE OF CARDIOVASCULAR DISEASE.

*Ainhoa González Luis, Laura Ribes.*

## INTRODUCCIÓN

Cardiovascular diseases (CVD) comprises a group of disorders that affect the heart and the blood vessels. These diseases are one of the leading causes of death worldwide. It has been shown that people suffering from kidney diseases are more likely to develop CVD, like atherosclerosis or coronary disease. This may be caused by Klotho, an anti-aging protein related to vascular protection which is mainly produced by the kidneys. Decreases in serum Klotho levels are related to the appearance and severity of CVD. So, particular Klotho polymorphisms could be related to cardiovascular risk. Klotho is codified in the gene KL in the 13q12 chromosome in humans with an extension of 50 Kb. It was discovered in 1997 by Makoto Kuro-o, who by inactivation of the gene in mice observed a shortened lifespan and multi-organ affections in these animals. Kuro-o was the first person to link Klotho with cardiovascular risk after observing that mice with protein deficiency suffered from endothelial dysfunction and arterial calcification. After this discovery, a new field of investigation has started to analyse Klotho polymorphisms in humans and its relationship to CVD. There are ten known Klotho polymorphisms and recent investigations have observed that three of them are related to cardiovascular risk. The principal aim of this work is to develop a bibliographic review to know and find out more about this protein and its influence on the progression of cardiovascular disease.

## MATERIAL Y MÉTODOS

In order to elaborate this bibliographic compilation, a search of articles in the PubMed database was executed, using terms “klotho”, “cardiovascular disease”, “klotho polymorphism” and “chronic kidney disease”. In the same database, a search based on authors with “Makoto Kuro-o” as the input was run. The inclusion criteria were based on the following aspects: the articles should have been published in the last fifteen years, because it is a relative unexplored field and the language was English or Spanish. A thorough reading of the abstracts was made and those articles whose main topic was Klotho gene polymorphisms were selected. From that final selection, results of experiments performed by different research groups were extracted.

## RESULTADOS

The search provided up-to-date information about different Klotho polymorphisms associated to cardiovascular risk. The G-395 A polymorphism is located in the promoter region of KL gene and could modify the expression and functionality of the protein. Thus, the allelic variant A is associated with lower vascular protein expression which would promote the development of endothelial dysfunction. So, subjects with the 395A allele show an increased risk as compared with that of 395G allele, who show no increase for the risk of CVDs. Interestingly, another perception was the higher incidence of diabetes mellitus in subject with the allele A variant, a difference that could be related to the lower levels of Klotho expression.

Another Klotho polymorphism linked to the cardiovascular risk is the SNP rs495392, that is located in an intron sequence of the Klotho gene, where allele T could contribute to a higher protection of cardiovascular system.

Finally, certain articles mention the C1818T, F352V and C370S located in KL exon four which is associated to hypertension and coronary disease. And, C181T is linked to a higher hypertension and coronary disease protection.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

The results provided by different articles introduce that variability of Klotho genotype could be related to vascular protein expression and suggest that Klotho levels has been proposed as a main factor in the progression of endothelial dysfunction, which is involved in the progression of vascular affections like atherosclerosis. In currently works, different scientist related cardiovascular risk with lower vascular Klotho expression. However, an important factor to be considered is the limited information and results about the effect of the polymorphism on KL gene expression and protein levels within different countries or ethnic groups. In conclusion, the aspect of Klotho gene in vascular tissues is an element of discussion and wide discrepancies.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Akbari H, Asadikaram G, Aria H, Fooladi S, Vakili S, Masoumi M. Association of Klotho gene polymorphism with hypertension and coronary artery disease in an Iranian population. *BMC Cardiovasc Disord* [Internet]. 2018 Dec 14 [cited 2019 Jan 9];18(1):237. Available from: <https://bmccardiovascdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12872-018-0971-5>.
2. Valdivielso JM, Bozic M, Galimudi RK, Bermudez-López M, Navarro-González JF, Fernández E, et al. Association of the rs495392 Klotho polymorphism with atheromatosis progression in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2018 Jul 13 [cited 2019 Jan 9]; Available from: <https://academic.oup.com/ndt/advance-article/doi/10.1093/ndt/gfy207/5053970>.
3. Donate-Correa J, Martín-Núñez E, Martínez-Sanz R, Muros-de-Fuentes M, Mora- Fernández C, Pérez-Delgado N, et al. Influence of Klotho gene polymorphisms on vascular gene expression and its relationship to cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2016 Jan [cited 2019 Jan 9];20(1):128–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538295>.
4. Rhee E-J, Oh K-W, Lee W-Y, Kim S-Y, Jung C-H, Kim B-J, et al. The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease. *Metabolism* [Internet]. 2006 Oct 1 [cited 2019 Jan 9];55(10):1344–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049506001879>.

## **COMUNICACIONES ORALES, TURNO 4.**

# **CRONO-ONCOLOGÍA: NUEVO ABORDAJE DEL CÁNCER COLORRECTAL.**

*Bolado D, Jiménez C, González C, Martínez FJ, Sanfeliú N, Fajardo D.*

### **INTRODUCCIÓN**

En los últimos años el diagnóstico precoz y los estudios predictivos de los pacientes con cáncer han evolucionado de forma notable. Un punto de vista diferente que puede ser muy útil tanto para la predicción de la respuesta a fármacos como para el estudio del pronóstico es el análisis de la expresión de los genes del reloj CLOCK, BMAL, PER y CRY, los cuales, fueron causa del Premio Nobel de Medicina o Fisiología del año 2017 y cuya participación ha sido demostrada en diferentes tipos de cáncer como el de mama o el colorrectal. En esta revisión se pretende realizar un análisis cronobiológico del cáncer colorrectal que relacione algunas de sus características con los genes del reloj biológico, y, además, se pretende incorporar un nuevo concepto en la clínica oncológica denominado crono-oncología.

### **RESULTADOS**

En el año 2002, un estudio realizado por Fu & cols. demostró que una mutación inhabilitante del gen PER2 causaba una disminución de la expresión del gen BMAL1 con un aumento en la expresión del oncogen c-myc y disminución de p53, lo cual favorece en gran medida al desarrollo de procesos tumorales [1]. De manera fisiológica, la elevación de la expresión de CLOCK y BMAL1 supone el incremento de la formación de dímeros Clock-Bmal1 que se unen al dominio E-box del promotor del gen WEE1 e incrementa su transcripción, lo cual hace que la célula supere el checkpoint G2/M del ciclo celular [1]. La disminución de expresión del gen PER2 y PER1 produce una elevación en la cantidad de  $\beta$ -catenina no fosforilada capaz de inducir la transcripción del oncogen c-myc que activa a la ciclina-B y, por lo tanto, genera crecimiento, división celular, angiogénesis, diferenciación, adherencia, motilidad celular y progresión del ciclo celular. La disminución de PER1 y PER2, además, aumenta la sensibilidad a rayos gamma e incrementa la resistencia al tratamiento con cisplatino y etopóxido [2]. La disminución de la expresión de los genes CRY1 y CRY2 produce un aumento en la tasa de transcripción del gen WEE1, lo cual se traduce en un mayor bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M. El problema que presenta esto es que en la mayoría de cánceres colorrectales WEE1 se encuentra alterado, por lo que no responde a la disminución de la expresión de CRY1/2 y se mantiene siempre inactiva, activando así el ciclo celular [3]. Una elevada expresión de BMAL1 hace que la proteína se una al promotor del gen CTNNB1 e induce un incremento en la transcripción de las  $\beta$ -cateninas. Además, BMAL1 produce una supresión del proto-oncogen c-myc y estimula la vía del gen supresor WEE1 [2]. Cuando se produce la delección del gen CLOCK, se puede observar cómo disminuye la expresión del gen WEE1 y la proteína CDK1 se mantiene activa de forma permanente haciendo que la célula supere el checkpoint G2/M sin ningún problema y de forma descontrolada [2].

### **DISCUSIÓN**

Los pacientes que presenten elevado grado de expresión de los genes CLOCK y PER1/2 junto con expresión disminuida de los genes CRY1/2 y BMAL1 tienen un buen pronóstico de la enfermedad al contrario que los que presenten disminución de la expresión de CLOCK y PER1/2 junto con una elevación de la expresión de CRY1/2 y BMAL1. Esto se podrá correlacionar con altos niveles de  $\beta$ -catenina fosforilada y elevado grado de ubiquitinación de BMAL1.

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*. 2002;111:41–50. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01223-0.
2. Mazzoccoli G, Vinciguerra M, Papa G, Piepoli A. Circadian clock circuitry in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* (2014); 20(15): 4197-4207. doi: 10.3748/wjg.v20.i15.4197.



# SECUENCIACIÓN DE TERCERA GENERACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

Lapeña T.

## INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es un grupo de enfermedades neurológicas caracterizadas por la degeneración progresiva y posterior muerte de las neuronas motoras, que controlan los músculos voluntarios. La incidencia de la enfermedad es de 1/50.000, siendo el 10% de los casos familiares.

Actualmente se conocen más de 25 genes con mutaciones asociadas a la enfermedad entre los que destacan por su frecuencia de aparición C9orf72, SOD1, TARDBP, o FUS. El diagnóstico actual se basa en la observación de los signos y los síntomas, y en el descarte de otras patologías. Se hace necesario, por tanto, un sistema de diagnóstico más preciso, e idealmente precoz. Con este objetivo, en este trabajo se ha diseñado y desarrollado un panel de genes que incluye las principales zonas del genoma en las que se han descrito mutaciones causantes de la enfermedad, y que permite confirmar o descartar la presencia de dichas mutaciones de forma rápida mediante secuenciación de tercera generación con nanoporos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo del método de diagnóstico mediante secuenciación de tercera generación se amplificaron las regiones de interés donde se habían descrito mutaciones relacionadas con la enfermedad mediante PCR multiplex con primers específicos; se midió la concentración de ADN utilizando para ello métodos fluorométricos (Qubit) o electroforesis capilar (Bioanalyzer); se prepararon las librerías de secuenciación según los protocolos de Nanopore (reparación de extremos, ligación de adaptadores...); se secuenció utilizando el dispositivo MinION; y se llevó a cabo el análisis bioinformático de las lecturas con diversos programas.

## RESULTADOS

Se obtuvieron amplicones de los exones de interés, que podían diferenciarse entre sí en una electroforesis debido a la diversidad de tamaños, confirmando así la presencia de todos los fragmentos incluidos en el diseño. Las librerías obtenidas a partir de los amplicones presentaban una concentración de ADN adecuada (~1 µg) para ser secuenciadas. Tras la secuenciación de los fragmentos y el basecalling, se consiguió un total de 1,5 millones de lecturas de un tamaño correspondiente al de los exones, lo que permite confirmar o descartar la presencia de los principales cambios relacionados con la enfermedad.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La secuenciación mediante nanoporos de paneles de genes supone un método preciso, rápido, flexible, y asequible de diagnóstico de enfermedades con componente genético, como es el caso del ELA, evitando los diagnósticos erróneos y permitiendo un tratamiento más precoz y personalizado.

## BIBLIOGRAFÍA

Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P., Simmons, Z. and van den Berg, L. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, p.17071.

Leggett, R. and Clark, M. (2017). A world of opportunities with nanopore sequencing. *Journal of Experimental Botany*, 68(20), pp.5419-5429.

# INHIBITION OF AUTOPHAGY EXACERBATES INTESTINAL FIBROSIS AND EMT.

Ana Trescoli-Garcia, Dolores Ortiz-Masia, Francisco Canet, Sandra Coll, Sara Calatayud, Dolores Barrachina, Jesús Cosín-Roger.

## INTRODUCCIÓN

Intestinal fibrosis is a common complication of Crohn's Disease (CD) patients which requires surgery. GWAS studies have identified several polymorphisms in genes involved in autophagy, that predispose to CD. It has been reported that this process is impaired in IBD patients but the relevance of autophagy in intestinal fibrosis remains unclear. We aim to analyze the effect of pharmacological inhibition of autophagy in the development of murine intestinal fibrosis.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Intestinal fibrosis was induced in vivo using the heterotopic transplant model. Segments of 1cm colon from mice were subcutaneously transplanted into the neck of a recipient mice and collected after 7 days. Recipient mice were treated with a daily injection of 3-MA (10mg/kg). Expression of intestinal inflammation, fibrosis and EMT markers were analyzed by qPCR and protein levels of autophagy markers by Western Blot. Collagen layer was evaluated by Sirius Red Staining. Intestinal resections from CD patients were obtained and expression of p62, Col1a1,  $\alpha$ -SMA, Snail1 and Snail2 was analyzed by qPCR. Results are expressed as fold induction (mean $\pm$ SEM, n $\geq$ 5). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. Correlations were analyzed with the Spearman coefficient.

## RESULTADOS

Grafts obtained 7 days after surgery from 3-MA treated mice vs vehicle-treated mice exhibited: a) a significant increase in the expression of proinflammatory genes such as TNF- $\alpha$  (102.90 $\pm$ 22.94 vs 50.46 $\pm$ 7.47), IL-1 $\beta$  (425.4 $\pm$ 84.92 vs 243.70 $\pm$ 35.85), IL-6 (735.7 $\pm$ 235.0 vs 339.90 $\pm$ 137.5) and INOS (325.7 $\pm$ 75.85 vs 166.2 $\pm$ 23.64); b) an increase in the expression of profibrotic genes such as Col1a1 (74.21 $\pm$ 9.18 vs 41.27 $\pm$ 9.34), Vimentin (9.98 $\pm$ 4.54 vs 6.73 $\pm$ 0.64) and TGF- $\beta$  (6.69 $\pm$ 1.91 vs 6.62 $\pm$ 0.60); c) a significant increase in the expression of EMT genes such as Snail1 (21.10 $\pm$ 4.60 vs 11.61 $\pm$ 1.49), Snail2 (7.32 $\pm$ 1.87 vs 3.70 $\pm$ 0.73) and Itgb6 (7.70 $\pm$ 1.89 vs 2.65 $\pm$ 0.43); d) a significant thicker collagen layer after Sirius Red Staining. Autophagy inhibition by 3-MA was confirmed by Western Blot showing an increase of p62 and phospho-mTOR and a reduction in LC3. In intestinal resections from CD patients, the expression of p62 positively correlates with the expression of Col1a1 (r Spearman =0.6098, P=0.004),  $\alpha$ -sma (r Spearman =0.5168, P=0.041), Snail1 (r Spearman =0.4112, P=0.0003) and Snail2 (r Spearman =0.4410, P=0.0009).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Pharmacological inhibition of autophagy exacerbates murine intestinal inflammation, fibrosis and EMT. In intestinal resections from CD patients the expression of autophagy markers correlates with the expression of pro-fibrotic and pro-EMT genes, which led us to suggest that pharmacological modulation of autophagy might be a new therapeutic option for intestinal fibrosis.

# **PAPEL DE LA PROTEÍNA PrRP EN LA REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DE LA TERMOGÉNESIS.**

*Fajardo D, Fernández-Mateos P, Jiménez-Ortega V, Cano-Barquilla P, Bolado D, Pulido AD, Esquifino A.*

## **INTRODUCCIÓN**

El péptido regulador de la secreción de prolactina (PrRP) está implicado en la regulación del apetito y regula la secreción de prolactina, aunque no se conocen con certeza los mecanismos por el que lo realiza. Esta molécula se descubrió como un ligando de los receptores huérfanos GRP10/hGR3 en el hombre y UHR1 en la rata en el año 1998 por Hinuma et al. y fue muy importante para identificar una nueva vía de regulación neuroendocrina. Existen varios autores que cuestionan su papel como regulador de la secreción de prolactina, pero sí que está ampliamente aceptada su influencia sobre diversas hormonas hipofisarias como la ACTH o la oxitocina. Por ello, este trabajo pretende revisar los efectos del PrRP como una molécula novedosa que regula un gran número de funciones fisiológicas y, para ello, se ha revisado la literatura pertinente.

## **RESULTADOS**

Esta molécula se sintetiza en el hipotálamo ventromedial, ventrolateral y en el núcleo del tracto solitario y está involucrada en la regulación del gasto energético mediante un incremento en el consumo de oxígeno, generando un descenso del peso o impidiendo su aumento mediante una disminución de la ingesta. El incremento del gasto energético estaría relacionado con el aumento en el grado de expresión de UCP1 en el tejido adiposo pardo (BAT). El PrRP interacciona con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal ejerciendo un efecto anorexigénico debido a su interacción con la melanocortina alfa y beta (MSH), las cuales son moléculas procedentes de la POMC.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

La administración intra-cerebro-ventricular (ICV) de PrRP a una concentración de 4 nmolar genera una hipertermia que se correlaciona con la elevación de la expresión del gen de UCP1 [1]. Asimismo, la ingesta alimentaria de ratas tratadas con PrRP se encuentra disminuida notablemente, lo que confirmaría su efecto anorexigénico, siendo sus efectos máximos en las primeras 24 horas tras su administración y, posteriormente, produciendo una refractariedad gradual a la administración de este péptido [2]. Esta desensibilización parece estar mediada por los cambios neuroendocrinos producidos por el PrRP sobre colecistoquinina y la leptina. También es posible que, debido a las inyecciones continuas para administrar el PrRP, el ratón eleve su nivel del estrés de forma notable y cualquier modificación mínima generada por la hormona podría haber sido enmascarada [3]. Además, de forma fisiológica, en situaciones de estrés la disminución de la secreción de PrRP desde el núcleo del tracto solitario atenúa las respuestas de ACTH/corticosterona, prolactina y oxitocina, por una falta de interacción con la amígdala y por tanto de su efecto anorexigénico. Este efecto podría potenciarse porque se atenúa su efecto estimulador sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, ya que la ACTH produce un efecto anorexigénico. Hay que poner de manifiesto, que además de las hormonas anteriormente mencionadas, se ha observado la existencia de mecanismos de interacción entre leptina y PrRP [4]. Ello se debe, a que tanto la leptina, de igual forma que el PrRP, producen un efecto anorexigénico y están involucradas en la regulación de las repuestas al frío y al calor. El bloqueo del gen del PrRP anula el efecto termorregulador de la leptina por lo que su presencia es fundamental para que la leptina ejerza su papel termorregulador. En estos efectos, hay que tener en cuenta las interacciones entre los mecanismos de secreción de colecistoquinina, leptina y PrRP para el control de la ingesta y la termorregulación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Catherine B. Lawrence, Yong-Ling Liu, Michael J. Stock, and Simon M. Luckman. Anorectic actions of prolactin-releasing peptide are mediated by corticotropin-releasing hormone receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R101-R107, 2004.
2. Garrot T. Dodd, Amy A. Worth, Nicolas Nunn, Aaron K. Korpai, David A. Bechtold, Margaret B. Allison, Martin G. Myers, Michael A. Statnick and Simon M. Luckman. The thermogenic effect of leptin is dependent on a distinct population of prolactin-releasing peptide neurons in the dorsomedial hypothalamus. *Cell Metab*, 20(4):639-649, 2014.
3. Kate L.J. Ellacott, Catherine B. Lawrence, Lynn E. Pritchard, and Simon M. Luckman. Peptides that regulate food intake. Repeated administration of the anorectic factor prolactin-releasing peptide leads to tolerance to its effects on energy homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R1005-R1010, 2003.
4. Masahide Yoshida, Yuki Takayanagi, and Tatsushi Onaka. The Medial Amygdala Medullary PrRP-Synthesizing Neuron Pathway Mediates Neuroendocrine Responses to Contextual Conditioned Fear in Male Rodents. *Endocrinology* 155: 2996-3004, 2014.

# EVALUACIÓN DE NUEVOS AGENTES ANTITUMORALES BASADOS EN RUTENIO (III) EN MODELOS CELULARES.

*Albanell M, Orts M, Oltra S, Gutierrez F, Mengual R, Ferrer A, Carrasco F, Castillo J, Martinez-Lillo FJ, Ribas G.*

## INTRODUCCIÓN

La quimioterapia es ampliamente usada para tratar tumores, sin embargo, estos fármacos suelen presentar toxicidades elevadas en tejidos sanos. El agente quimioterápico, cis-platino es el más común, pero cuenta con importantes efectos secundarios que limitan su efectividad. En la búsqueda de nuevos agentes antitumorales más eficaces y con menos efectos adversos, han destacado los basados en metales de transición, entre los que se encuentran los basados en Rutenio. Hemos obtenido una familia de compuestos basados en Ru(III) y nucleobases dinucleares, característica con los que se ha estudiado su posible actividad antitumoral en 9 líneas celulares.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han empleado 9 líneas celulares: 6 de cáncer de mama (MCF-7, HCC1806, BT474, MDA-MB-231, HCC1937 y HCC1500), una de cáncer de colon (HCT116), una de cáncer gástrico (AGS) y una no tumoral de glándula mamaria. Se ha calculado la velocidad de crecimiento, la proliferación celular mediante estudios de MTT, migración celular "Cierre de la brecha" y análisis de la expresión de proteínas de la apoptosis celular (Bax y Caspasa-3, Bcl-2) mediante qPCR. La significación estadística de los resultados obtenidos se ha analizado con los tests Anova, Tukey y Wilcoxon.

## RESULTADOS

El compuesto estudiado ha demostrado efectos favorables en la reducción tanto de la viabilidad, migración celular y expresión de genes apoptóticos en las líneas celulares HCT116, AGS, HCC1806. En las otras líneas su efecto no es significativo en ningún parámetro estudiado, lo que hace suponer un mecanismo de acción intercalante dependiente de la replicación celular. Este agente ha mostrado un efecto selectivo por no afectar ni a la viabilidad ni migración de MCF10A, línea no tumoral de glándula mamaria.

La síntesis química del compuesto está formada por una mezcla de isómeros conformacionales, que parecen tener diferente capacidad anti-tumoral, estos resultados dejan la puerta abierta a futuras investigaciones para averiguar el mecanismo de acción de estos isómeros.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El compuesto evaluado, Runat-BI ha demostrado ser un buen candidato en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales, donde su actividad destaca frente a cánceres agresivos. El Rutenio presenta unas ventajas que podrían corregir los actuales efectos adversos del Platino, el cual se emplea en la práctica clínica. Su estado de oxidación es más estable, por lo que su semivida es mayor y requiere menos dosis, presenta un mecanismo de interacción con el DNA más sencillo y su química se asemeja más a la del hierro, bioelemento que se encuentra en el cuerpo humano.

Los resultados positivos que ha mostrado Runat-BI in vitro, demuestran que puede ser un potente candidato para estudiar en modelos in vivo, lo que contribuiría a reforzar su papel como nuevo agente antitumoral.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Kostova I. Ruthenium complexes as anticancer agents. *Curr Med Chem.* 2006;13(9):1085-107.
2. Meier-Menches SM, Gerner C, Berger W, Hartinger CG, Keppler BK. Structure–activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents – towards clinical development. *Chem Soc Rev.* 5 de febrero de 2018;47(3):909-28.
3. Popolin CP, Reis JPB, Becceneri AB, Graminha AE, Almeida MAP, Corrêa RS, et al. Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells. *PLOS ONE.* 2017 Sep 12;12(9): e0183275.

# STUDY OF CD5 AND CD6 EXPRESSION AS POTENTIAL PROGNOSTIC BIOMARKERS IN RESECTED NON-SMALL CELL LUNG CANCER.

*A. Moreno Manuel, S. Calabuig Fariñas, S. Gallach García, Fernando Aranda, Inés Simoes, Esther Carreras, Marta Consuegra-Fernández, A. Blasco, A. Cunguero Tomas, M. Martorell, C. Camps Herrero, Francisco Lozano, Rafael Sirera, Eloisa Jantus-Lewintre.*

## INTRODUCCIÓN

Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) represents an 80% of lung cancer cases and is the main cancer-related cause of death. It is known that the immune system plays a key role in cancer development and treatment, thus tumour microenvironment should be studied to find new biomarkers and therapeutic targets. Therefore, this research analyses the expression of the immunoregulatory genes *CD5* and *CD6* as potential prognostic biomarkers in early-stage NSCLC.

## MATERIAL Y MÉTODOS

This work was performed in two independent patient cohorts. First, a training cohort, composed of 186 paired fresh frozen tumour and normal tissue samples of resected NSCLC was used to analyse *CD5* and *CD6* expression by RTqPCR. Relative gene expression was calculated by *Pfaffl* formula using *ACTB*, *CDKN1B* and *GUSB* as endogenous controls. Afterwards, The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to obtain an independent validation patient cohort (n=97) with available gene expression data for tumor and normal tissue. Relapse Free Survival (RFS) and Overall Survival (OS) were assessed using Cox regression and Kaplan-Meier curves (log-rank test), considering statistically significant  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Our training cohort consisted of 186 patients, which were mainly men and current or former smokers. Survival analyses revealed that higher *CD5* expression levels were associated with improved prognosis (RFS, 44.30 vs. 29.2 months,  $p=0.076$  and OS, 99.90 vs. 49.63 months,  $p=0.013$ ). Furthermore, a multivariate analysis was conducted and determined that *CD5* could be established as an independent prognostic biomarker for OS (HR, 0.554; 95% IC 0.360-0.853;  $p=0.007$ ).

Survival analyses conducted on our validation cohort confirmed that higher expression levels of both *CD5* and *CD6* had a significant prognostic value for RFS (34.98 vs. 75.57 months,  $p=0.033$ ; 25.31 vs. 75.57 months,  $p=0.020$ , respectively) and OS (40.49 vs. 77.97 months,  $p=0.038$ ; 39.02 vs. 77.97 months,  $p=0.034$ , respectively).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

*CD5* and *CD6* are two immune-modulatory molecules that co-localize with the TCR in the immune synapse. *CD5* and *CD6* have been proposed as two novel immune-checkpoints, which play both co-stimulatory and co-inhibitory effects [1-3]. The present study has analyzed their potential prognostic role in NSCLC, demonstrating that higher expression levels of *CD5* and *CD6* are associated with prolonged survival.

In conclusion, our study suggests a role of *CD5* and *CD6* in NSCLC prognosis, supporting previous findings in our lab, which reported that inflamed tumours are associated with a stronger immune response, which is correlated with better patient prognosis [4]. In conclusion, our data have allowed the establishment of *CD5* as an independent prognostic biomarker for early-stage NSCLC.

Supported from Fundació La Marató TV3 (201319-30), ISCIII (PI12-02838 and PI15-00753), and MEC (SAF2016-80535-R) -co-financed by European Development Regional Fund. FA and IS are recipients of

fellowships from ISCIII (Sara Borrell Program; CD15/00016) and Portuguese FCT (SFRH/BD/75738/2011), respectively.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Gimferrer I, Farnós M, Calvo M, Mittelbrunn M, Enrich C, Sánchez-Madrid F et al. The Accessory Molecules CD5 and CD6 Associate on the Membrane of Lymphoid T Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;278(10):8564-8571.
2. Tabbekh M, Mokrani-Hammani M, Bismuth G, Mami-Chouaib F. T-cell modulatory properties of CD5 and its role in antitumor immune responses. *Oncolimmunology*. 2013;2(1):e22841.
3. de Wit J, Souwer Y, van Beelen A, de Groot R, Muller F, Klaasse Bos H et al. CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation. *Blood*. 2011;118(23):6107-6114.
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.