



**VIII CONGRESO DE  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

# **LIBRO DE RESÚMENES**

**CIB2020**

**5, 6 y 7 de febrero de 2020**

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

# PÓSTERES Y COMUNICACIONES ORALES

## PÓSTERES, TURNO 1

5 de febrero, 09.45-10.30h

- **IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MARCADORES PARA EL CÁNCER PULMONAR BASADOS EN EL ESTUDIO DEL ESTROMA TUMORAL.** *Carreres C, Chuliá L, Tamayo E, Aparisi S, Carretero J, Pereda J.*
- **EL FACTOR DE ELONGACIÓN TRADUCCIONAL eIF5A COMO POSIBLE DIANA EN EL TRATAMIENTO PARA LA FIBROSIS HEPÁTICA.** *Calatayud E, Alepuz P, Blas-García A, Apostolova N.*
- **LOS GENES IMPRONTADOS IGF2 Y CDKN1C INTERACTÚAN PARA INDUCIR LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE NEURALES.** *Laura Lázaro-Carot, Anna Lozano-Ureña, Irene Martínez-Gurrea, Martina Kirstein y Sacri R. Ferrón*
- **STUDY OF THE PHYSICAL AND FUNCTIONAL INTERACTIONS BETWEEN MOG1 AND HISTONES.** *Serrano-Martín, L; Serrano-Quílez, J; Rodríguez-Navarro, S.*
- **ALTERACIÓN DE PRKN EN TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SU RELACIÓN CON LA BIOPATOLOGÍA TUMORAL.** *Quesada-Simó A, Santoja N, Navarro L, Calabuig-Fariñas S, Megías J, San-Miguel T.*

## COMUNICACIONES ORALES, TURNO 1

5 de febrero, 12.30-14.00h

- **SEMILUNAR GRANULE CELLS, AN HIPPOCAMPAL ACTIVITY SWITCH.** *Vieco-Martí I, Blasco-Ibáñez JM.*
- **BIOMARCADORES LIPÍDICOS PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL ALZHEIMER EN MUESTRAS MÍNIMAMENTE INVASIVAS.** *Casas-Fernández E, Salvador-Palmer R, Jiménez-Somoano K, Cháfer-Pericás C.*
- **LA AUTOFAGIA COMO MECANISMO IMPLICADO EN LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES INDUCIDAS POR EL ALCOHOL DURANTE LA ADOLESCENCIA.** *Hernández-Cortés MI, Montagud-Romero S, López-Hidalgo R, Rodríguez-Arias M, Guerri C, Pascual M.*
- **DISEÑO Y DESARROLLO DE UN MÉTODO DE SUPERRESOLUCIÓN EN IMÁGENES DE RM USANDO DEEP LEARNING.** *Carlos Andreu Vilarroig.*
- **CÁNCER EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN.** *Soriano VV, Ballester MP, Marti-Aguado D, Capilla M, Gómez C, Minguez M.*

- **LA PROGERIA: EL PARADIGMA DE UN ENVEJECIMIENTO PRECOZ.** *Bugeda Gómez, Patricia*
- **VALIDACIÓN DE DOS POSIBLES SUSTRATOS DEL COMPLEJO LAFORINA-MALINA EN LA ENFERMEDAD DE LAFORA.** *Rivera, P.*

## PÓSTERES, TURNO 2

5 de febrero, 18.15-19.00h

- **EFFECTOS NEUROINFLAMATORIOS DE LA DIETA RICA EN GRASA EN RATONES ADOLESCENTES.** *González-Portilla M., Montagud-Romero S., Rodríguez-Arias, M.*
- **HÁBITOS ALIMENTICIOS Y CALIDAD ESPERMÁTICA.** *García Z.*
- **INFORME DE UN CASO CLÍNICO: OLIGODENDROGLIOMA CON CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS NEURALES Y MARCADORES DE INDIFERENCIACIÓN.** *MJ. Ulloa Navas, J. Peña Peña, A. Saurí Tamarit, V. Herranz Perez, JM. García Verdugo, J. Ferrer Lozano.*

## COMUNICACIONES ORALES, TURNO 2

5 de febrero, 19.00-20.00h

- **INFLUENCIA DE LOS NIVELES SÉRICOS DE PROGESTERONA EL DÍA DE LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN LA TASA DE GESTACIÓN EVOLUTIVA DE PACIENTES SOMETIDAS A CICLOS CON PREPARACIÓN ENDOMETRIAL ARTIFICIAL.** *Rodríguez C.*
- **GENETIC VARIABILITY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ANTIGENS.** *Paula Ruiz and Mireia Coscolla.*
- **CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DE AUTOFOSFORILACIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA  $\alpha$  DE PKA.** *Pizarro DS.*
- **IMPLICACIONES PRONÓSTICAS DE LA 8ª EDICIÓN DE LA AJCC EN MELANOMA MALIGNO.** *Ortiz Salvador, P.*
- **REGULATION OF THE DECISION BETWEEN STEM CELL MAINTENANCE AND DIFFERENTIATION IN THE CEREBRAL CORTEX.** *Fabra-Beser J, Mateos-white I, de Agustín-Durán D, Gil-Sanz C.*
- **IDENTIFICATION OF RESISTANCE MECHANISMS FOR MITOTIC CANCER DRUGS WITH A GENOME-WIDE CRISPR-CAS9 SCREENING STRATEGY.** *Monfort-Vengut A, Ortigosa-Fernández B, de Cárcer G.*

## PÓSTERES, TURNO 3

6 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

6 de febrero, 17:00-17.45h

- **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

6 de febrero, 17:45-19.00h

- **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, Martínez-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.*

## **IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MARCADORES PARA EL CÁNCER PULMONAR BASADOS EN EL ESTUDIO DEL ESTROMA TUMORAL.**

*Carreres C, Chuliá L, Tamayo E, Aparisi S, Carretero J, Pereda J.*

*Facultat de Farmàcia, Universitat de València.*

### **INTRODUCCIÓN**

El cáncer de pulmón, por su alta prevalencia y mal pronóstico, es la principal causa de muerte relacionada con cáncer en el mundo. Presenta una gran heterogeneidad morfológica y molecular, siendo el carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM) la histología más frecuente. El microambiente tumoral (MAT) favorece la transición epitelio mesénquima (TEM), y está constituido por las células cancerosas, endoteliales, inmunitarias y fibroblastos/miofibroblastos (FACs, fibroblastos asociados al cáncer) del estroma productores de matriz extracelular (MEC), proporcionando un entorno favorable para la progresión tumoral y la metástasis (1).

Nuestro objetivo ha sido caracterizar los FACs pulmonares e identificar nuevos marcadores protumorales que nos permitan mejorar los utilizados actualmente, como la  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (2). La importancia de la proteína Nicotinamida N-metiltransferasa (NNMT) en estudios desarrollados por nuestro grupo de investigación, y en los FACs (3), sugiere que esta proteína podría ser un nuevo marcador de FACs e incluso una diana terapéutica en el contexto del CPNM.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se han aislado y estudiado *in vitro* los fibroblastos del tejido pulmonar normal y tumoral procedentes de biopsias quirúrgicas de pacientes de CPNM. Ha sido analizada la capacidad migratoria y la expresión de marcadores del fenotipo miofibroblasto como  $\alpha$ -SMA, NNMT o la proteína activadora de fibroblastos (FAP) en condiciones basales y en respuesta TGF- $\beta$ 1 mediante *Western blotting* e inmunofluorescencia. Para ello, la prueba estadística utilizada ha sido la t-Student, rechazándose la hipótesis nula cuando los valores del test presentan un valor P superior a 0,05, aceptándose la hipótesis alternativa.

### **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos sugieren que los FACs presentan una menor capacidad migratoria respecto a los fibroblastos normales. Los estudios por *Western blotting* e inmunofluorescencia muestran una mayor expresión de los marcadores NNMT y  $\alpha$ -SMA en caso de los FACs. Asimismo, se observa una elevada coexpresión entre ambos marcadores en los FACs a diferencia de los fibroblastos normales. Por último, los estudios preliminares mediante inmunohistoquímica de las biopsias de pacientes correlacionan con dicha coexpresión obtenida en los análisis *in vitro*.

### **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Estudios recientes en el cáncer de ovario postulan la NNMT como una enzima reguladora de los FACs (3). Del mismo modo, nuestros resultados muestran como los niveles elevados de esta enzima podrían estar implicados el fenotipo miofibroblástico. En conclusión, nuestras investigaciones sugieren que la NNMT podría ser un marcador diferencial de los FACs y, además, una diana molecular cuya inhibición podría revertir el fenotipo miofibroblástico y, por tanto, bloquear el papel protumoral del estroma asociado al CPNM.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bremnes RM, et al. The Role of Tumor Stroma in Cancer Progression and Prognosis: Emphasis on Carcinoma-Associated Fibroblasts and Non-small Cell Lung Cancer. *JTO*. 2011;6(1):209-17.
2. Kim HM, Jung WH, Koo JS. Expression of cancer-associated fibroblast related proteins in metastatic breast cancer: an immunohistochemical analysis. *JTM*. 2015;13(1):222.
3. Eckert MA, et al. Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts. *Nature*. 2019;1.

## EL FACTOR DE ELONGACIÓN TRADUCCIONAL eIF5A COMO POSIBLE DIANA EN EL TRATAMIENTO PARA LA FIBROSIS HEPÁTICA.

Calatayud E<sup>1</sup>, Alepuz P<sup>2</sup>, Blas-García A<sup>3</sup>, Apostolova N<sup>1</sup>.

*1 Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universitat de València. 2 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València. 3 Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universitat de València.*

## INTRODUCCIÓN

La fibrosis hepática constituye un problema de salud por su elevada prevalencia en la población, y más aún en pacientes con VIH, siendo una de las principales causas de mortalidad. Estudios sobre los efectos de fármacos antirretrovirales, como la rilpivirina, inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido, mostraron efectos beneficiosos de este fármaco sobre la progresión de la enfermedad, promoviendo por un lado la regeneración tisular, e inhibiendo la función de las células estrelladas hepáticas (CEH) a partir de la vía JAK-STAT, lo que reduce los efectos inflamatorios y fibróticos de la enfermedad. Uno de los marcadores principales para la fibrosis hepática es el colágeno, principal componente de los depósitos en la matriz extracelular en el hígado, cuya mayor fuente de producción son las CEH. La traducción de esta proteína es mediada por el factor de elongación, eIF5A, que es esencial para el proceso traduccional de proteínas implicadas en la proliferación celular, crecimiento y metabolismo, entre ellos del colágeno. La correcta funcionalidad de eIF5A requiere de una modificación postraduccional en la proteína, la hipusinación. En este proyecto se ha llevado a cabo el estudio del efecto de la hipusinación de eIF5A sobre la capacidad de las CEHs de sintetizar colágeno in vitro.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se empleó la línea celular LX2 de CEH humanas que se trató 48h con 2.5 µg/mL de TGF-β como activador de las CEH en presencia o ausencia de GC7, inhibidor de la hipusinación (30 µM). Se evaluó la expresión proteica con la técnica de Western Blot de los marcadores fibróticos CollA1 (Colágeno), STAT3/pSTAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) y la expresión del factor de elongación traduccional eIF5A utilizando extractos de proteínas totales.

## RESULTADOS

La expresión proteica del marcador fibrótico CollA1 mostró una disminución significativa en células tratadas con GC7, inhibidor de la hipusinación en el factor traduccional eIF5A. El efecto se observó tanto en los niveles de colágeno basales, como sobre el colágeno inducido por el tratamiento con TGF-β. Del mismo modo, el tratamiento con GC7 también produjo una disminución en la expresión de STAT3 y su isoforma activa p-

STAT3 tanto en las células sin activación como con las células activadas con TGF- $\beta$ , resultado de especial relevancia teniendo en cuenta el efecto proliferativo de STAT3 en CEHs en presencia de TGF- $\beta$ .

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Se demuestra el papel de eIF5A como proteína necesaria para la síntesis de proteínas como el colágeno, implicadas en la fibrosis hepática, y la esencialidad de la hipusinación como modificación postraduccional para que se produzca la traducción con la máxima eficiencia. En levaduras se ha demostrado que esta modificación no es esencial, el factor eIF5A sigue funcionando si se inhibe la enzima, pero se observa una acumulación de los ribosomas en residuos consecutivos de prolina y otros aminoácidos cargados, demostrando así su importancia para la traducción. Que los niveles de proteína en los marcadores estudiados hayan disminuido en condiciones de inhibición de la hipusinación, lleva al estudio de si la proteína eIF5A funciona de forma constitutiva o de forma inducida ante ciertas proteínas no esenciales en procesos vitales para la célula, siendo esta cuestión de gran relevancia para su estudio como diana para el tratamiento de la fibrosis hepática.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pelechano V, Alepuz P. eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(12):7326–7338.
- [2] Martí-Rodrigo A, Alegre F, Moragrega ÁB, et al. Rilpivirine attenuates liver fibrosis through selective STAT1-mediated apoptosis in hepatic stellate cells. *Gut.* 2019;gutjnl-2019-318372.
- [3] Saini P, Eyster DE, Green R, Dever TE. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature.* 2009;459(7243):118–121.
- [4] Turpaev KT. Translation Factor eIF5A, Modification with Hypusine and Role in Regulation of Gene Expression. eIF5A as a Target for Pharmacological Interventions. *Biochemistry (Mosc).* 2018;83(8):863–873.

# LOS GENES IMPRONTADOS *IGF2* Y *CDKN1C* INTERACTÚAN PARA INDUCIR LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ANDRE NEURALES.

Laura Lázaro-Carot, Anna Lozano-Ureña, Irene Martínez-Gurrea, Martina Kirstein y Sacri R. Ferrón

Universidad de Valencia

## INTRODUCCIÓN

La neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos se debe a las células madre neurales (NSCs), caracterizadas por su capacidad de auto-renovación y multipotencialidad. El control de la dosis génica durante este proceso de neurogénesis en los nichos neurogénicos (SVZ: zona subventricular y SGZ: zona subgranular del giro dentado) es controlado por el fenómeno epigenético de impronta genómica (1). El factor de crecimiento similar a la insulina 2 (*IGF2*) es un regulador neurogénico en la vida adulta. *Igf2* es un gen improntado de expresión paterna durante el desarrollo, pero se expresa bialélicamente en la vasculatura del nicho y en el plexo coroideo, actuando de forma paracrina en las NSCs de la SVZ (2). Por otro lado, el gen *Cdkn1c*, inhibidor de ciclinas dependiente de quinasas (CKI), es un gen improntado expresado por el alelo materno y que codifica para la proteína p57 que tiene un papel crucial en el desarrollo de la corteza cerebral (3). Se ha demostrado la interacción entre estos dos genes en algunos tipos de células (4), pero no se ha estudiado dicha interacción en la neurogénesis adulta. Por este motivo, decidimos estudiar el papel de estos dos genes y su relación en la diferenciación de NSCs del cerebro de ratón adulto.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este estudio, se generó un modelo de ratón condicional cuyas NSCs eran deficientes en p57, obtenido mediante el cruce de ratones con el gen *Cdkn1c* floxeado con ratones con la Cre recombinasa bajo el promotor GFAP (específico de NSCs). Para determinar la regulación de IGF2 sobre el gen *Cdkn1c*, se infundió IGF2 (o PBS) durante 7 días mediante la colocación de bombas osmóticas en los ventrículos laterales de estos ratones deficientes en p57 y sus ratones control. A estos mismos ratones, 15 días antes, se le realizaron inyecciones intraperitoneales de BrdU cada dos horas durante 12 horas seguidas. Pasados los 7 días de la colocación de las bombas osmóticas, los ratones fueron sacrificados y perfundidos. Los cortes de cerebro (40 µm) fueron analizados mediante inmunohistoquímica. El nivel de significación entre grupos se evaluó mediante t-test one-tailed, en comparaciones dos a dos (p-valor <0.05 significativo).

## RESULTADOS

Los efectos observados tras la infusión intraventricular con IGF2 en animales control son un aumento de la proporción de cadenas de neuroblastos en la corriente migratoria rostral (RMS) DCX+, aumento en la diferenciación de las NSCs a astrocitos GFAP/S100β+ y nueva generación de oligodendrocitos LRC/Olig2+ que alcanzan el cuerpo calloso (CC), en comparación con animales infundidos con PBS. Pero estos efectos de diferenciación tras la infusión con IGF2 están alterados en ratones deficientes en p57, donde el aumento de diferenciación astrocitaria se debe a una diferenciación terminal en la SVZ (GFAP/S100β/LRC). La infusión de IGF2 en animales control aumenta el número de neuronas que llegan al bulbo olfativo (OB), efecto que no se observa en ratones deficientes en p57.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Por homología con otros estudios como en el sistema hemotopoyético, donde se vio el efecto de IGF2 en la regulación de las células madre hematopoyéticas (HSC) mediante la inducción de la expresión de p57 (4), decidimos estudiar el efecto de IGF2 y p57 en la NSCs de la SVZ. Previamente el laboratorio demostró que IGF2 regulaba la proliferación y auto-renovación de las NSC en la SVZ (2), pero no se había estudiado todavía su efecto en diferenciación. En este estudio encontramos que IGF2 media efectos de diferenciación en la SVZ, aumentándola en NSC y viéndose su efecto en diferenciación disminuido en ausencia de p57. Además, en ausencia de p57 encontramos un mayor porcentaje de astrocitos terminalmente diferenciados. Esto nos hace plantear que IGF2 estaría mediando efectos de diferenciación en las NSCs de la SVZ a neuroblasto para la generación de neuronas, involucrando a p57. Como CKI que es, proponemos que p57 esté implicado en la regulación de la quiescencia celular y, su eliminación, causa una salida de ciclo celular hacia una diferenciación pro-glial, acumulándose los astrocitos en la SVZ y parénquima. Esto explica, además, que en los ratones deficientes en p57 tratados con IGF2 no se incrementa el número de nuevos neuroblastos y oligodendrocitos que llegan al OB y el CC respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Montalbán-Loro R. Epigenetic regulation of stemness maintenance in the neurogenic niches. *World J Stem Cells*. 2015;7(4):700.
2. Ferrón SR, Radford EJ, Domingo-Muelas A, Kleine I, Ramme A, Gray D, et al. Differential genomic imprinting regulates paracrine and autocrine roles of IGF2 in mouse adult neurogenesis. *Nat Commun*. 2015;6.
3. Tury A, Mairet-Coello G, Dicicco-Bloom E. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2 regulates cell cycle exit, differentiation, and migration of embryonic cerebral cortical precursors. *Cereb Cortex*. 2011;21(8):1840–56.
4. Thomas DD, Sommer AG, Balazs AB, Beerman I, Murphy GJ, Rossi D, et al. Insulin-like growth factor 2 modulates murine hematopoietic stem cell maintenance through upregulation of p57. *Exp Hematol [Internet]*. 2016;44(5):422-433.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2016.01.010>

# STUDY OF THE PHYSICAL AND FUNCTIONAL INTERACTIONS BETWEEN *MOG1* AND HISTONES.

Serrano-Martín, L; Serrano-Quílez, J; Rodríguez-Navarro, S

Unidad de Expresión Génica y Metabolismo del RNA, Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC)

## INTRODUCTION

Mog1 was first discovered as a Ran-GTPase binding protein involved in nuclear protein import both in humans and yeast [1]. Later, it was found that human Mog1 also regulates the traffic of the cardiac sodium channel Nav1.5 that has been associated with Brugada syndrome, a cardiac disease characterised by an abnormal electrocardiographic pattern leading to sudden death [2]. Recently, it has been discovered that Mog1 regulates mRNA transcription and export to the cytoplasm by modulating H2B monoubiquitylation on lysine 123 in yeast and likely, on lysine 120 in mammals. Because of the crosstalk between histone modifications, Mog1 also participates in H3 trimethylation on lysine 4 and lysine 79 on yeast. Previous work has suggested that this novel function of Mog1 is independent of Ran-GTPase binding [3]. Therefore, there seems to be two cellular pools of Mog1 protein.

## MATERIAL AND METHODS

For studying the interaction between Mog1 and the methylation complex COMPASS through Shg1, *mog1Δ* and *set1Δmog1Δ* *S. cerevisiae* mutant strains were transformed with plasmids containing different mutations in the putative Shg1 interaction domain of Mog1p. Then, effects on yeast growth were studied by growth assays at two conditions, 30 °C and 37 °C.

To reveal a possible direct interaction between Mog1 and H2B, we performed a protein-protein interaction assay. For that, expression of both proteins was induced with IPTG and purified in parallel by affinity chromatography. Mog1 was GST tagged at the N terminal and H2B was His tagged at the C terminal.

## RESULTS

We show that Mog1W145A single point mutation causes a slower growth phenotype when transformed into *mog1Δ* and *set1Δmog1Δ* mutant strains. However, in case of the Mog1p mutants containing E65KW145A double mutation, a slow growth phenotype is observed at 30 °C while a positive effect at 37 °C. On the other hand, the protein-protein interaction assay revealed that Mog1 and H2B co-eluted. In addition, it seemed that the stoichiometry of the interaction was not 1:1.

## DISCUSSION / CONCLUSIONS

According to our results and a previous study about E65K Mog1 mutant[3], we suggest that at 37 °C, which is a stress condition for the yeast cells, pushing the balance to one of the Mog1 pools by the E65KW145A double mutant does not help the yeast because protein import and mRNA transcription and export might not be important at that moment. However, releasing Mog1 from these functions might allow Mog1 to fully participate in stress mechanism which at the end means that Mog1 might participate in other pathways from the ones we know [1, 2, 3].

The protein-protein interaction assay revealed that Mog1 and H2B seem to interact directly in a stoichiometry different than 1:1, likely interacting several units of H2B with a unit of Mog1. However, these results must be contrasted in further experiments.

## BIBLIOGRAPHY

- [1] Oki, M., & Nishimoto, T. (1998). A protein required for nuclear-protein import, Mog1p, directly interacts with GTP-Gsp1p, the *Saccharomyces cerevisiae* Ran homologue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15388-15393.
- [2] Kattygnarath D, Maugendre S, Neyroud N, Balse E, Ichai C, Denjoy I, Dilanian G, Martins RP, Fressart V, Berthet M et al (2011) MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet* 4: 261 – 268
- [3] Oliete-Calvo, P, Serrano-Quílez, J, Nuño-Cabanes, C, Pérez-Martínez, M. E, Soares, L. M, Dichtl, B, ... & Rodríguez-Navarro, S. (2018). A role for Mog1 in H2Bub1 and H3K4me3 regulation affecting RNAPII transcription and mRNA export. *EMBO reports*, 19(11), e45992

## ALTERACIÓN DE *PRKN* EN TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SU RELACIÓN CON LA BIOPATOLOGÍA TUMORAL.

*Quesada-Simó A, Santoja N, Navarro L, Calabuig-Fariñas S, Megías J, San-Miguel T*

*Universitat de València, Facultat de Medicina i Odontologia, Departament de Patologia.*

### INTRODUCCIÓN

El gen *PRKN* codifica la proteína parkina, que se asocia a diferentes procesos por su función E3 ubiquitinasa. También destaca recientemente su posible papel en el cáncer. Su relación inicial en una patología del sistema nervioso central (SNC) como el Parkinson, unida a la dualidad sugerida en cáncer, tanto como oncogén como supresor tumoral, justifican su estudio en diferentes tumores del SNC. En este trabajo se revisa, tras una minuciosa revisión bibliográfica, se pretende estudiar la variación en el número de copias (VNC) de *PRKN* en los tumores del SNC más frecuentes en adultos para, en último término, establecer la relación entre su papel en el SNC y la tumorigénesis y/o agresividad tumoral.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudian una colección de meningiomas y una de glioblastomas *IDH wild-type* sobre las cuales se recopila información clínica. Se realiza el estudio histopatológico mediante hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de marcadores de proliferación. Se estudian las características moleculares por PCR y amplificación de múltiples sondas dependientes de ligación (MLPA) para determinar la VNC de *PRKN*. Para el análisis estadístico se utilizan diversos estadísticos según las características de las variables a estudio, empleando un intervalo de confianza del 95%.

### RESULTADOS

Meningiomas: El 72.8% eran mujeres y el 27.2% hombres. Hubo más delección de *PRKN* en hombres que en mujeres. Los meningiomas de grado II presentaban mayor delección de *PRKN* que los de grado I. Aquellos meningiomas que recidivaban tenían mayor proporción de delección de *PRKN*, de forma global y estratificando por grados. Glioblastomas: El 37.0% eran mujeres y el 63.0% eran hombres. Hubo más alteraciones de *PRKN* en mujeres que en hombres. Aquellas muestras con alteración de *PRKN* presentaban mayor amplificación de *EGFR*.

### DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La VNC de *PRKN* es un evento frecuente en estos tumores del SNC. En meningioma destaca que las pérdidas de *PRKN* son más frecuentes en los tumores de mayor grado y en aquellos que recidivan. También, esta pérdida se relaciona con otras alteraciones genéticas. En el glioblastoma, la alteración de *PRKN* se ha relacionado con la amplificación de *EGFR* en nuestra serie. La sobreexpresión de parkina produce la protección de neuronas frente a tóxicos. Este mecanismo podría justificar la influencia negativa del aumento en el número de copias que se detectan en los GB. Nuestros resultados apoyan el hecho que el desequilibrio,

por exceso o por defecto, parece ser fundamental en la adquisición de agresividad. Las pérdidas de *PRKN* son más frecuentes conforme aumenta la agresividad. Las ganancias y pérdidas de *PRKN* son más frecuentes en GB con amplificación de *EGFR*, lo que podría potenciar la activación de la vía EGFR/Akt/mTOR. Dada la frecuencia de cambios en parkina, podría ser interesante continuar la caracterización de su influencia en sobre esta vía y sobre otras en las que también se ha descrito su acción, como EGFR/Akt/Wnt/beta-catenina (GB) y NFkB/JNK (MN).

Trabajo realizado con la colaboración de la Generalitat Valenciana (GV/2018/130) y el Ministerio de Educación y Formación Profesional (Beca Colaboración 2019-2020)

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Lin D-C, Xu L, Chen Y, Yan H, et al. Genomic and Functional Analysis of the E3 Ligase PARK2 in Glioma. *Cancer Res.* 2015;75(9):1815-27.
2. Yeo CWS, Ng FSL, Chai C, Tan JMM, et al. Parkin Pathway Activation Mitigates Glioma Cell Proliferation and Predicts Patient Survival. *Cancer Res.* 2012;72(10):2543-53.
3. Seirafi M, Kozlov G, Gehring K. Parkin structure and function. *Febs J.* 2015;282(11):2076-88.
4. Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. Parkinson's disease-associated protein Parkin: an unusual player in cancer. *Cancer Commun.* 2018;38:40-54.

## **COMUNICACIONES ORALES, TURNO 1**

### **SEMILUNAR GRANULE CELLS, A HIPPOCAMPAL ACTIVITY SWITCH.**

*Vieco-Martí I, Blasco-Ibáñez JM*

*University of Valencia, Spain.*

## **INTRODUCCIÓN**

The dentate gyrus gates the entrance of cortical information into the hippocampal formation. The dentate gyrus has been one of the most studied parts of the brain due to its role in the formation of memories, spatial navigation and to the fact that is a most common focus of epileptic activity of the brain. Nevertheless, the mechanisms that control its function in the entrance of information into the dentate gyrus are not fully understood yet.

The principal neurons of the dentate gyrus are the granule cells, whose axons are the mossy fibers. The mossy fibers have glutamatergic terminals characterized by an unusual high content of chelatable ionic zinc in their synaptic vesicles. Recently, a sub-population of granule cells located in the supra-granule cell layer that have a semilunar morphology has been shown to engage into repeating reciprocal firing [1] with the principal neurons of the hilus of the dentate gyrus (the mossy cells). On the other hand, dentate gyrus parvalbumin interneurons (that perisomatically inhibit semilunar and common granule cells) seem to be preferentially controlled by semilunar cells [2]. Therefore, there exists a double reciprocal connection between semilunar granule cells and parvalbumin interneurons [2] and excitatory mossy cells [3] respectively, that could be the basis of the control of the dentate gyrus since they also control normal granule cells.

Our objective was to demonstrate if we could coactivate these three types of neurons to show that they could form a functional intrinsic microcircuitry that facilitates the gating of the cortical information through the dentate gyrus.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

We followed cell activation using the marker of cell activity c-Fos and identified the cell types using immunocytochemistry for specific cell markers (S-100, Calretinin, Parvalbumin, Calbindin) in an YFP expressing transgenic mice under confocal microscopy. To elicit the response of this circuitry without extensive granule cell activation we used a low dose of a zinc chelator (DEDTC 150 mgr/Kg ip) that it is known to overexcite transitorily the mossy cells preferentially [4].

## **RESULTADOS**

After DEDTC treatment, in addition to hilar astrocytes, three different types of neurons activates (express c-Fos): hilar mossy cells, fast-spiking parvalbumin cells of the hilus and granule cell layer and a subpopulation of granule cells, including semilunar cells.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Our results confirm that the hilar mossy cells, the fast-spiking parvalbumin cells and the semilunar granule cells could be co-activated under our conditions and could be of functional significance in the function of the dentate gyrus. We propose that this micro-circuitry with the semilunar granule cells controlling the activation of parvalbumin basket cells (inhibitory) and mossy cells (excitatory) simultaneously can facilitate the passing of the cortical information through the granule cells and at the same time synchronize them. The control of this micro-circuitry (probably through extrinsic projection onto the semilunar granule cells) can determine the way in which the dentate gyrus works.

Our preliminary data using anterograde tracing with BDA 10kD and immunocytochemistry for VGLUT2 under electron microscopy suggest that the supramammillary nucleus provides the subcortical excitatory input on the somata of the semilunar granule cells that could control this microcircuitry and consequently the dentate gyrus activity.

Our experiments suggest that the semilunar granule cells (which are less than 1% of the granule cells) could be working as a switch that would control the feed of cortical information into the hippocampus.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Larimer P, Strowbridge BW. Representing information in cell assemblies: persistent activity mediated by semilunar granule cells. *Nat Neurosci.* 2010;13(2):213–22.
- [2] Rovira-Esteban L, Hájos N, Nagy AG, Crespo C, Nacher J, Varea E, Blasco-Ibáñez JM. Semilunar granule cells are the primary source of the perisomatic excitatory innervation onto parvalbumin-expressing interneurons in the dentate gyrus. Submitted to *eNeuro*.
- [3] Blasco-Ibáñez JM, Freund TF. Distribution, ultrastructure, and connectivity of calretinin-immunoreactive mossy cells of the mouse dentate gyrus. *Hippocampus.* 1997;7(3):307–20.
- [4] Poza-Aznar J, Crespo C, Marques-Marí AI, García-Llanes FJ, Martínez-Guijarro FJ. Chelation of synaptic zinc induces overexcitation in the hilar mossy cells of the rat hippocampus. 2004;355:101–4.

# BIOMARCADORES LIPÍDICOS PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL ALZHEIMER EN MUESTRAS MÍNIMAMENTE INVASIVAS.

Casas-Fernández EI, Salvador-Palmer RI, Jiménez-Somoano KI, Cháfer-Pericás C2

1 Máster en Fisiología, Universitat de València; 2 Instituto Investigación Sanitaria La Fe, Valencia.

## INTRODUCCIÓN

Alrededor de 26 millones de personas sufren Alzheimer en todo el mundo y su prevalencia aumenta con la edad. Aproximadamente el 95% de los casos corresponden al Alzheimer espontáneo de aparición tardía. Numerosos estudios genómicos, transcriptómicos y proteómicos se han publicado para entender los mecanismos moleculares implicados (1). Actualmente cobra fuerza el papel del metabolismo lipídico en el cerebro, ya que su alteración podría contribuir a la patogénesis del Alzheimer (2). Por tanto, han aumentado los estudios basados en la lipidómica y técnicas como cromatografía y espectrometría de masas (1). Así, el objetivo será estudiar el potencial de diferentes lípidos como posibles biomarcadores de esta enfermedad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para contrastar y responder a la hipótesis se realizará una revisión sistemática mediante el método PRISMA utilizando la base de datos Pubmed y como términos MeSH: “alzheimer disease”, “biomarkers” y “lipid compounds”.

## RESULTADOS

Se han encontrado lípidos ubicuos en placas amiloides que pueden modular la agregación de péptidos A $\beta$  o tau hiperfosforilada. El péptido A $\beta$  puede interactuar con numerosos lípidos y balsas lipídicas (gangliósidos, fosfolípidos y colesterol) promoviendo agregación en membrana celular, pérdida de integridad, alteración de homeostasis intracelular de Ca<sup>2+</sup> y disparando cascadas neurotóxicas en Alzheimer (2).

Esto puede provocar un aumento del estrés oxidativo asociado a membrana, factor clave que promueve la vía amiloidogénica de la proteína precursora amiloide y las perturbaciones lipídicas observadas en Alzheimer (3).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Existe una fuerte relación entre la alteración de la homeostasis lipídica en el cerebro como causa o consecuencia en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Los niveles lipídicos varían según la etapa de la enfermedad y pueden suponer un factor de riesgo que facilita su progresión. Por ello, podrían emplearse como biomarcadores para así anticipar la progresión de la enfermedad, además de facilitar su diagnóstico a partir de muestras obtenidas por técnicas mínimamente invasivas (4), convirtiéndose así en un área emergente de interés biomédico, dado que las técnicas “gold standard” actuales son muy invasivas, caras y suponen graves riesgos para los pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Touboul D, Gaudin M. Lipidomics of Alzheimer's disease. *Bioanalysis* 2014;541–61.
2. El F, Jing P, Xia J, Cai D. Alzheimer's Disease Risk Genes and Lipid Regulators. *J Alzheimers Dis* 2016;53:15–29.
3. Mattson MP, Cutler RG, Jo D. Alzheimer peptides perturb lipid-regulating enzymes. *Nat Cell Biol* 2005;7(11):1045–7.
4. Grasso G. Mass spectrometry is a multifaceted weapon to be used in the battle against Alzheimer's disease: Amyloid beta peptides and beyond. *Mass Spectrom Rev* 2018;(March):1–15.

# LA AUTOFAGIA COMO MECANISMO IMPLICADO EN LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES INDUCIDAS POR EL ALCOHOL DURANTE LA ADOLESCENCIA.

Hernández-Cortés M11, Montagud-Romero S3, López-Hidalgo R2, Rodríguez-Arias M4, Guerri C2, Pascual M1,2.

1 Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València. 2 Departamento de Patología Molecular y Celular del Alcohol, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia. 3 Departamento de Psicología y Sociología, Facultad de Ciencias Sociales y Humanas, Universidad de Zaragoza. 4 Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de València.

## INTRODUCCIÓN

Estudios previos demuestran que el alcohol durante la adolescencia disminuye la autofagia, mecanismo que regula la poda sináptica a través de la proteína mTOR, y aumenta la expresión de proteínas sinápticas (1). Por tanto, se propone evaluar si la inhibición de mTOR mediante la rapamicina es capaz de revertir tanto las alteraciones conductuales de memoria y aprendizaje como en la plasticidad sináptica producidas por el consumo de alcohol durante la adolescencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado ratones C57BL/6 WT (Harlan Ibérica, Barcelona) machos adolescentes, a los que se les ha inyectado intraperitonealmente 8 dosis intermitentes de etanol (3 g/kg) entre los días postnatal 30 y 43 (2). Siguiendo el mismo patrón, se administró solución salina al grupo control, rapamicina (3 mg/kg) y rapamicina+etanol a otros grupos. Una cohorte de los animales realizó pruebas comportamentales (reconocimiento del objeto novedoso (NOR): memoria explícita; evitación pasiva (EP): memoria implícita); y otra cohorte fue sacrificada para diseccionar el hipocampo de los cerebros.

## RESULTADOS

Resultados nuestros (3) mostraron que el etanol producía un deterioro de la memoria, tanto en NOR como en EP. La rapamicina es capaz de revertir los efectos negativos del etanol (incrementando la latencia de cruce entre compartimentos en el grupo rapamicina+etanol respecto al grupo etanol) en la EP ( $F(1,33) = 8,995$ ;  $p < 0,01$ ). En la prueba NOR no hay diferencias estadísticamente significativas en el índice de discriminación entre los grupos. Además, estudios de microscopía confocal muestran que el etanol tiende a aumentar la densidad de las espinas sinápticas en el hipocampo, efecto que no se presenta en el grupo rapamicina+etanol ( $F(3,14) = 5,197$ ;  $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La rapamicina revierte parcialmente las alteraciones cognitivas producidas por el consumo de alcohol en la adolescencia, efectos que estarían asociados con una alteración de la densidad sináptica en hipocampo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Montesinos J, Pascual M, Millán-Esteban D, Guerri C. Binge-like ethanol treatment in adolescence impairs autophagy and hinders synaptic maturation: Role of TLR4. *Neurosci Lett*. 2018;682:85-91.

2. Pascual M, Blanco AM, Cauli O, Miñarro J, Guerri C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci.* 2007;25(2):541-50.

3. Montesinos J, Pascual M, Pla A, Maldonado C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, et al. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain Behav Immun.* 2015;45:233-44.

## **DISEÑO Y DESARROLLO DE UN MÉTODO DE SUPER-RESOLUCIÓN EN IMÁGENES DE RM USANDO DEEP LEARNING.**

*Carlos Andreu Vilarroig.*

*Universitat Politècnica de València (UPV).*

### **INTRODUCCIÓN**

La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas que mayor prevalencia presenta en la población de edad avanzada, y que mayor impacto económico y social genera a nivel mundial. A pesar de que su etiología aún es desconocida y no existe tratamiento curativo, un diagnóstico precoz resulta fundamental para poder iniciar cuanto antes el tratamiento de los síntomas y retrasar el avance de la enfermedad. Actualmente, existen numerosas líneas de investigación que buscan nuevas pruebas diagnósticas más fiables, robustas y precoces. De entre ellas, las técnicas de imagen médica, como la Resonancia Magnética (RM), han supuesto un verdadero adelanto en el diagnóstico médico. Estas técnicas, unidas a los recientes avances en el campo de la computación, como la Inteligencia Artificial o el aprendizaje automático profundo (*Deep Learning*), han abierto un campo de investigación muy prometedor: los sistemas de ayuda al diagnóstico y a la toma de decisiones. Dichos sistemas se basan en algoritmos de aprendizaje automático, como las redes neuronales artificiales, que extraen información de los datos y “aprenden” de ellos para realizar tareas específicas. En este contexto, el objetivo del proyecto es diseñar y desarrollar un método de superresolución en imágenes de RM y, adicionalmente, un sistema de detección automática de la enfermedad de Alzheimer, basados en algoritmos de redes neuronales artificiales.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Este estudio parte de un primer conjunto de 25 individuos sanos con imágenes de RM de modalidades T1 y T2 de la región del hipocampo y la corteza entorrinal, y de un segundo conjunto de 226 sujetos sanos (grupo control) y 186 pacientes con Alzheimer con imágenes de RM de modalidad T1. Desde el punto de vista metodológico, el proyecto se ha abordado en dos fases: fase de superresolución y síntesis, y fase de clasificación. En la primera fase, las redes neuronales incrementan la resolución de las imágenes T1 por encima de la resolución de adquisición (superresolución) y generan imágenes T2 de superresolución a partir de las imágenes T1 (síntesis). En la segunda fase, las redes clasifican a los pacientes en sanos o enfermos de Alzheimer con una determinada probabilidad a partir de las características de sus imágenes de RM de superresolución. Los algoritmos desarrollados en ambas fases se han evaluado mediante una serie de métricas cuantitativas para comprobar su eficiencia. En la fase de superresolución se han calculado tres métricas sobre las imágenes: coeficiente de correlación, similitud estructural (SSIM) y relación señal-ruido (PSNR). Sobre las métricas se han aplicado el test de normalidad de Saphiro-Wilk y, dependiendo de si es posible asumir normalidad o no, los test de medias pareadas o t-test (paramétrico) o el test de rango y signo de Wilcoxon (no paramétrico). Los test estadísticos garantizan que las mejoras en superresolución con respecto a la referencia son significativas. En la fase de clasificación, se han empleado las métricas habituales en las pruebas diagnósticas: precisión, sensibilidad, especificidad, área bajo la curva ROC (AUC ROC), así como matrices de confusión y curvas ROC para la representación gráfica de los resultados. Por último, el método propuesto se ha comparado con los métodos actuales del estado del arte.



## RESULTADOS

En la fase de superresolución, la ganancia o mejora de las métricas que consiguen las redes neuronales ha sido de (media  $\pm$  desviación típica)  $4.923 \pm 0.004$  dB de PSNR,  $0.010 \pm 0.002$  de coeficiente de correlación y  $0.055 \pm 0.007$  de SSIM para las imágenes T1 de superresolución con respecto a las imágenes T1 de baja resolución, y de  $17.370 \pm 1.459$  dB de PSNR,  $1.55 \pm 0.080$  de coeficiente de correlación y  $0.854 \pm 0.036$  de SSIM para las imágenes T2 de superresolución con respecto a las imágenes T1 de superresolución. Los test estadísticos realizados indican que dicha ganancia es significativa ( $p$ -valor  $< 0.01$ ) en los tres aspectos evaluados sobre la imagen. Cualitativamente, las imágenes de superresolución presentan una mayor definición en sus estructuras anatómicas. En la fase de clasificación, la mejor red neuronal obtiene un 87,8% de precisión, 94,6% de sensibilidad, 81,1% de especificidad y 95,8% de AUC ROC con imágenes T1 de baja resolución, y un 89,2% de precisión, 94,6% de sensibilidad, 83,7% de especificidad y 95,9% de AUC ROC con imágenes T1 de superresolución. En ambas fases se han obtenido resultados similares a los de los métodos del estado del arte.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El presente estudio se ha conseguido diseñar y desarrollar un método automático, fiable y robusto de superresolución de imágenes de RM y de detección del Alzheimer basado en redes neuronales artificiales. Los resultados de nuestro estudio muestran una ganancia significativa de la resolución, tanto cuantitativa como cualitativamente. Por otro lado, también indican que una mejora en la resolución de la imagen ofrece un mejor resultado en la fase de clasificación de las imágenes, tal y como se pretendía demostrar. Asimismo, cabe destacar la elevada sensibilidad del método (del 94.6%), teniendo en cuenta que en un sistema diagnóstico es deseable reducir al máximo el número de falsos negativos. En base al método desarrollado, y como posible línea futura del proyecto, se propone la implementación en los hospitales de un sistema de ayuda al diagnóstico del Alzheimer sencillo e intuitivo orientado a los profesionales de la salud. Con ello, se espera facilitar su labor hacia el paciente en su día a día.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Andreu Vilarroig C. Diseño y desarrollo de un método de superresolución en imágenes de RM usando Deep Learning [Trabajo Final de Grado]. Valencia: Repositorio Institucional de la Universitat Politècnica de València (RiuNet), Universitat Politècnica de València; 2019.
2. Confederación Española de Alzheimer. Estado del arte de la enfermedad de Alzheimer en España [Internet]. 2014. Disponible en: [https://www.ceafa.es/files/2014/06/estado\\_del\\_arte-2.pdf](https://www.ceafa.es/files/2014/06/estado_del_arte-2.pdf).
3. Chen Y, Shi F, Christodoulou A, Xie Y, Zhou Z, Li D. Efficient and Accurate MRI Super-Resolution Using a Generative Adversarial Network and 3D Multi-level Densely Connected Network. Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018. 2018;;91-99.
4. Coupé P, Eskildsen S, Manjón J, Fonov V, Collins D. Simultaneous segmentation and grading of anatomical structures for patient's classification: Application to Alzheimer's disease. NeuroImage. 2012;59(4):3736-3747.

# CÁNCER EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN

Soriano VV, Ballester MP, Marti-Aguado D, Capilla M, Gómez C, Minguez M.

Hospital Clínico Universitario de Valencia, Universidad de Valencia.

## INTRODUCCIÓN

Los pacientes con Enfermedad de Crohn (EC) presentan una mayor prevalencia de cáncer<sup>1-4</sup> que la población general, tanto extracolónico<sup>1-2</sup> en relación con la inmunosupresión como colónico<sup>3</sup> (CCR) asociado a la actividad inflamatoria. En nuestro medio no disponemos de estudios epidemiológicos que describan la prevalencia de neoplasia maligna ni sus factores predictivos.

Los objetivos de este estudio son describir la prevalencia de neoplasia maligna en la EC. Evaluar los factores asociadas a la aparición de la misma y su impacto en la evolución del paciente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio analítico, retrospectivo, de la cohorte de pacientes con EC en seguimiento en el HCUV registrados en la base de datos ENEIDA. El estudio analizó, en función de la presencia y tipo de neoplasia maligna, variables demográficas (edad y sexo), factores de riesgo (tabaquismo, antecedentes familiares de EII y CCR), fenotípicas (localización, patrón, manifestaciones extraintestinales -MEI- y complicaciones) y tratamientos recibidos (monoterapia o biterapia).

Se realizó un análisis univariante, multivariante y de supervivencia (Kaplan-Meyer) utilizando el SPSS, considerándose estadísticamente significativo una  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Se incluyeron 782 pacientes con EC siendo el 49.9% hombres, con una edad mediana al diagnóstico 30 de años (RIQ 22-42). La prevalencia de neoplasia maligna fue de 5,2% (0,4% de CCR). El patrón de la enfermedad (inflamatorio 29.3% vs estenosante 31.7% vs fistulizante 39%,  $p < 0.001$ ) y el antecedente de cirugía como tratamiento de la EC (operados 70.7% vs no operados 29.3%,  $p < 0.000$ ; OR 6.659 IC 95% 1.806-7.414) se asociaron a un mayor riesgo de neoplasia maligna en global. En cuanto al riesgo de CCR no se encontró ninguna asociación significativa. En el análisis multivariante, el antecedente de cirugía como tratamiento de la EC se mantuvo como factor predictivo ( $p < 0.014$ ). Las medias de supervivencia en los grupos de pacientes sin y con neoplasia maligna fueron de 87 (IC 95% 83.7-90.3) y 77.5 años (IC 95% 71.8-83.3) respectivamente ( $p$ -valor 0.000).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La prevalencia de neoplasia maligna en nuestra población es ligeramente superior a la hallada en otras cohortes de EC (3.8% vs 5.2%). La cirugía como tratamiento de la EC se asoció con un mayor riesgo de cáncer global. No se encontraron resultados que apoyasen otros factores descritos previamente como el tabaquismo, el diagnóstico de colangitis esclerosante primaria o la afectación colónica extensa. La aparición de enfermedad neoplásica se asoció con una menor supervivencia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Chaparro, M., Ramas, M., Benítez, J. M., López-García, A., Juan, A., Guardiola, J., ... Gisbert, J. P. (2017). Extracolonic Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Data from the GETECCU Eneida Registry. *American Journal of Gastroenterology*, 112(7), 1135–1143.
2. Scharl S, Barthel C, Rossel J-B, Biedermann L, Misselwitz B, Schoepfer AM, et al. Malignancies in Inflammatory Bowel Disease: Frequency, Incidence and Risk Factors—Results from the Swiss IBD Cohort Study. *The American Journal of Gastroenterology*. enero de 2019;114(1):116-26.

3. Keller DS, Windsor A, Cohen R, Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Tech Coloproctol.* enero de 2019;23(1):3-13.

4. Nadeem, M. S., Kumar, V., Al-Abbasi, F. A., Kamal, M. A., & Anwar, F. (2019). Risk of colorectal cancer in inflammatory bowel diseases. *Seminars in Cancer Biology*, (April), 0–1.

## **LA PROGERIA: EL PARADIGMA DE UN ENVEJECIMIENTO PRECOZ.**

*Bugeda Gómez, Patricia.*

*Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia.*

### **INTRODUCCIÓN**

El síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (SPHG) es una enfermedad rara que forma parte de las laminopatías y se caracteriza por un envejecimiento prematuro. El desconocimiento de algunos de los mecanismos fisiopatológicos implicados, y de sus diferencias con el envejecimiento natural, motivó la realización del presente trabajo con el objetivo de comprender mejor esta condición genética.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

En esta revisión bibliográfica se realizó una búsqueda de información en la base de datos Pubmed. Aplicando unos criterios de selección se analizaron varios artículos, publicados en los últimos 6 años, que trataban sobre diferentes aspectos del SPHG, relacionados con la patología cardiovascular.

### **RESULTADOS**

En el SPHG se afecta principalmente el sistema cardiovascular debido al acúmulo de progerina, forma anómala de lámina A nuclear, en las células vasculares. Mientras tanto el cerebro, entre otros órganos, apenas se ve alterado, a diferencia de lo que ocurre en el envejecimiento fisiológico. Se han estudiado diversos fármacos como los inhibidores de la farnesiltransferasa (IFT) y el receptor de Vitamina D (RVD) que, aunque aumentan levemente la esperanza de vida, no curan la enfermedad.

### **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en el mundo occidental. Los pacientes con SPHG fallecen por arteriosclerosis en ausencia de los factores de riesgo clásicos, sugiriendo la existencia de mecanismos celulares todavía desconocidos responsables de acelerar la senescencia celular. Se ha visto que la progerina se expresa tanto en esta entidad como en el envejecimiento fisiológico, por lo que el estudio del SPHG podría ser de gran relevancia de cara a comprender mejor otras laminopatías para las que aún no existe cura, así como la enfermedad cardiovascular, dada su alta prevalencia en la actualidad.

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Walther Brandon K., Li Yanhui, Thandavarayan Rajarajan Amirthalingam, Cooke John P. Progeria and Accelerated Cardiovascular Aging. *Cardiol Plus* 2018; 3: 81-90.
2. Nickolay K. Isaev, Elena V. Stelmashook, Elisaveta E. Genrikhs. Neurogenesis and brain aging. *Rev. Neurosci.* 2019; 30(6): 573-580
3. Ahmed Muhammad Saad, Ikram Sana, Bibi Nousheen, Mir Asif. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease. *Mol Neurobiol* 2018; 55: 4417-4427

# VALIDACIÓN DE DOS POSIBLES SUSTRATOS DEL COMPLEJO LAFORINA-MALINA EN LA ENFERMEDAD DE LAFORA.

Rivera, P.

Universidad Politécnica de Valencia.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Lafora (LD) es un trastorno neurodegenerativo autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen de la proteína laforina o en el de malina. Ambas forman un complejo funcional relacionado con la regulación de la síntesis de glucógeno, y por ello mutaciones en cualquiera de ellas causan la acumulación de inclusiones de glucógeno en cerebro y tejidos periféricos (cuerpos de Lafora (LB)). Puesto que la malina es una E3-ubiquitina-ligasa, LD puede asociarse al sistema de ubiquitina, aunque se desconocen los mecanismos por los que un defecto en la malina desencadena LD. Para identificar posibles sustratos del complejo se realizó un estudio proteómico de ubiquitinación a partir de células HEK293, unas expresando la versión silvestre del gen de malina y, otras, una versión patológica. En este trabajo se pretende confirmar que dos de los posibles sustratos obtenidos en este estudio realmente presentan una ubiquitinación diferencial, en concreto HSPH3 y HSPA1L (heat shock proteins o chaperonas). El objetivo es confirmar si están diferencialmente ubiquitinadas en condiciones patológicas y determinar si existe interacción entre las mismas y el complejo laforina-malina, con el fin de profundizar posteriormente en la posible implicación de dichas proteínas en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Obtención de pGADT7-HSPA1L, pBTM116-HSPA1L, pCMV-HA-HSPH3 y pCMV-HA-HSPA1L.**

En primer lugar, se subclonó mediante restricción-ligación la CDS de HSPA1L obtenida de EGFP-HSPA1L (Addgene) en pGADT7 y pBTM116, para expresar las proteínas de fusión a GAD y a LexA respectivamente. Con la ligación se transformaron células de E. Coli DH5 $\alpha$  electrocompetentes, después sembradas en placas LB/Ampicilina. Finalmente, los plásmidos fueron recuperados mediante NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel).

En segundo lugar, se obtuvieron las CDS de HSPA1L y HSPH3 de pGADT7-HSPA1L y EGFP-HSPH3, respectivamente, y se subclonaron en el vector pCMV-HA mediante restricción-ligación.

### **Ensayo de interacción en levaduras (yeast-two-hybrid).**

Para probar la interacción de HSPA1L con el complejo, se realizaron diversas transformaciones en levaduras THY-AP-4. En total, se diseñaron 9 transformaciones distintas: (1) pBTM116-HSPA1L y pGADT7, (2) pBTM116 HSPA1L y pACT2-laforina, (3) pBTM116-HSPA1L y pACT2-malina, (4) pGADT7-HSPA1L y pBTM116, (5) pGADT7-HSPA1L y pBTM116-laforina, (6) pGADT7-HSPA1L y pBTM116-malina, (7) pBTM116-laforina y pACT2-malina, (8) pACT2-laforina y pBTM-malina

Las construcciones de pBTM116 expresarán una proteína de fusión con el dominio de unión al DNA del represor LexA, y los vectores pACT y pGADT7 lo harán con el dominio de activación de GAL4. Así, si se produce interacción entre HSPA1L y laforina/malina, ambos dominios se unirán permitiendo la transcripción del gen beta-galactosidasa. Se han creado dos tipos de construcciones, una donde HSPA1L esté fusionada al dominio de unión, como 1, 2 y 3, o fusionado al dominio de activación, como 4, 5 y 6. Así, se asegura que la

falta de interacción no es debida a que el epítipo interfiera en la unión. 1 y 4 son controles negativos, y 7 y 8 son controles positivos, puesto que la laforina dimeriza y también se une con la malina.

## **RESULTADOS**

El ensayo de doble híbrido está en proceso, y se espera que para las fechas del congreso se pueda presentar el resultado final. Hasta ahora, se ha observado un cambio de coloración en el transformante número 2 de rosa claro a blanco (restablecimiento de la ruta de síntesis de la adenina debido a la interacción), lo cual nos da una ligera pista de la interacción entre HSPA1L y laforina, aunque se espera confirmarlo con los ensayos beta-gal que se están llevando a cabo. Por otro lado, para la fecha del congreso, se espera haber realizado un ensayo de ubiquitinación con los plásmidos comerciales EGFP-HSPA1L y EGFP-HSPH3, y más adelante se utilizarán también pCMV-HA-HSPA1L y pCMV-HA-HSPH3.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- García-Gimeno M, Knecht E, Sanz P. Lafora Disease: a ubiquitination-related pathology. *Cells*. 2018 Aug;7(8):87.
- Parihar R, Rai A, Ganesh S. Lafora disease: from genotype to phenotype. *Journal of genetics*. 2018 Jul 1;97(3):611-24.

## **PÓSTERES, TURNO 2.**

### **EFECTOS NEUROINFLAMATORIOS DE LA DIETA RICA EN GRASA EN RATONES ADOLESCENTES.**

*González-Portilla M., Montagud-Romero S., Rodríguez-Arias, M.*

*Universitat de València.*

## **INTRODUCCIÓN**

La adolescencia es un periodo crítico del desarrollo en el que el sistema nervioso central se remodela tanto a nivel estructural como funcional, para acabar conformando el cerebro adulto. En las últimas décadas la incidencia de la obesidad ha ascendido a proporciones epidémicas en los países desarrollados. Este incremento ha sido especialmente drástico entre los niños y adolescentes; en la última década en el rango de edad de 13-19 años la incidencia se ha duplicado (WHO, 2019). Las consecuencias de la ingesta en exceso de alimentos ricos en grasa no se limitan a la obesidad y las condiciones asociadas (diabetes tipo 2, hipertensión arterial, accidentes cardiovasculares) sino que también afectan al funcionamiento del cerebro. Estudios realizados en humanos muestran que el consumo de una dieta rica en grasa produce un estado de neuroinflamación. Estudios clínicos han confirmado un incremento de las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$  en pacientes obesos (Dutheil et al., 2016). De la misma forma, estudios animales han observado un incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  tras tres días de exposición a una dieta rica en grasa (Thaler et al., 2013). El consumo de alimentos ricos en grasa puede darse en forma continuada, cuyo principal resultado es la aparición de obesidad o puede concentrarse en episodios breves en los que se realiza una sobreingesta de este tipo de alimentos. Esta última conducta puede desembocar en el desarrollo del trastorno por atracón (Corwin, 2004). En este trabajo nos preguntamos si es posible que la respuesta neuroinflamatoria no sea solo resultado de la composición nutricional de la dieta sino también de su patrón de consumo. Por lo tanto nuestro objetivo fue estudiar si la exposición a una dieta rica en grasa bajo un patrón de consumo continuado o intermitente induce un incremento en la neuroinflamatoria. Para ello evaluamos en ratones macho adolescentes la respuesta neuroinflamatoria mediante la medición de los niveles de la citoquina interleucina 6 (IL-6) en el estriado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 72 ratones machos adolescentes llegaron en el día post natal 21 y tras una semana de habituación los ratones fueron divididos en 3 grupos en función de su dieta. Los animales controles recibieron (1) una dieta estándar (13% grasa, 67% carbohidratos, 19% proteínas); los animales alimentados con una dieta alta en grasa (45% grasa, 36% carbohidratos, 19% proteínas) recibieron esta dieta de forma continuada *ad libitum* (2) o (3) de forma intermitente. En este último grupo, los ratones pudieron acceder ilimitadamente a comida grasa durante dos horas, tres veces por semana, simulando una conducta de atracón.

Un día después del último atracón de comida rica en grasa (24h después de la exposición) se realizó la extracción de los cerebros para su posterior análisis mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

## RESULTADOS

Tras realizar un ANOVA de una vía (programa de análisis estadístico SPSS), los resultados indicaron un efecto en la variable dieta  $F(47,2)=3,883$ ,  $p=0.028$  sobre los niveles de IL-6. Las pruebas post-hoc revelaron que el grupo de dieta grasa continuada presentó niveles superiores de IL-6, con respecto al grupo control ( $p<0.05$ )

Este estudio pone de relieve que el consumo de dieta grasa continuado durante la adolescencia produce efectos neuroinflamatorios en el estriado.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Los resultados indican que una exposición continuada a alimentos ricos en grasas incrementan uno de los biomarcadores de neuroinflamación, la citoquina IL-6. Estos cambios que se observan en los mediadores de la neuroinflamación en diferentes regiones cerebrales, como el estriado, podrían ser responsables de los déficits cognitivos y conductuales asociados a la obesidad y al consumo de comida grasa. Sin embargo, la exposición a esta dieta de forma intermitente no incrementó la respuesta neuroinflamatoria.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Obesity and overweight. [Internet], World Health Organization: February 2018. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Dutheil, S., Ota, K. T., Wohleb, E. S., Rasmussen, K., & Duman, R. S. High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation. *Neuropsychopharmacology*, 41(7). 2016 1874.
3. Thaler, J. P., Guyenet, S. J., Dorfman, M. D., Wisse, B. E., & Schwartz, M. W. Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis?. *Diabetes*. 2013. 62(8), 2629-2634.
4. Corwin, R. L., & Buda-Levin, A. Behavioral models of binge-type eating. *Physiology & behavior*. 2004, 82(1), 123-130.

# HÁBITOS ALIMENTICIOS Y CALIDAD ESPERMÁTICA

García Z

Universitat de València.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, un 15% de las parejas en edad reproductiva sufren infertilidad. De estos, el 30% son por causas masculinas, entre las que se encuentra una baja calidad seminal. Diversos aspectos ambientales pueden influir en esta, entre ellas los hábitos alimenticios, que proporcionan tanto nutrientes indispensables para los espermatozoides (SPZ) y su capacidad fecundante como sustancias nocivas para ellos. El objetivo de esta revisión es establecer el efecto de los diferentes nutrientes y micronutrientes aportados por los alimentos sobre los diferentes parámetros seminales que determinan la calidad de una muestra espermática.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizó un búsqueda bibliográfica utilizando las bases de datos de PubMed y Google Scholar para identificar y resumir información relevante acerca de la influencia de nutrientes, micronutrientes y alimentos sobre la calidad espermática. Se seleccionaron artículos originales y revisiones bibliográficas, tras la búsqueda de palabras clave: “seminal quality”, “carbohydrates”, “fatty acids”, “proteins”, “micronutrients”, “diet”.

## **RESULTADOS**

El consumo de alimentos ricos en carbohidratos, sobre todo los contenidos en bebidas azucaradas, afecta negativamente a los parámetros que definen una buena calidad espermática. Los ácidos grasos insaturados (PUFA) entre los que se encuentran los omega-3, tienen un efecto beneficioso sobre la calidad seminal, mejorando la concentración, movilidad y recuento total de SPZ, destacando el papel de ácido docosahexenoico (DHA), contenido en ciertos alimentos y en suplementos alimenticios. Contrariamente, la ingesta elevada de ácidos grasos saturados y trans empeoran dicha calidad seminal. En cuanto a las proteínas, no existen resultados claros sobre su efecto, aunque parece que un alto consumo de productos que las contiene no tiene un efecto beneficioso sobre el semen. Los micronutrientes (vitaminas C y E, zinc y folato) mejoran de manera significativa la movilidad espermática. Por todo ello, el consumo de frutas, verduras, pescado lácteos desnatados, carne de aves y frutos secos favorecen una buena calidad espermática, mientras que por el contrario el consumo de carnes rojas y procesadas, lácteos enteros, alimentos refinados y azucarados (bollería industrial, bebidas azucaradas, snacks), alcohol y cafeína parecen afectar negativamente a la calidad del semen.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Una dieta saludable basada en el consumo de productos ricos en ácidos grasos insaturados y micronutrientes puede suponer una mejora en la calidad de las muestras seminales de pacientes fértiles e infértiles, favoreciendo las tasas de éxito en las parejas con deseo reproductivo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Liu CY, Chou YC, Chao JC, Hsu CY, Cha TL, Tsao CW. The association between dietary patterns and semen quality in a general Asian population of 7282 Males. *PLoS One*. 2015;10(7):1–12.
2. Martínez-Soto JC, Domingo JC, Cordobilla B, Nicolás M, Fernández L, Albero P, et al. Dietary supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) improves seminal antioxidant status and decreases sperm DNA fragmentation. *Syst Biol Reprod Med*. 2016;62(6):387–95.
3. Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Slotter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod*. 2005;20(4):1006–12.
4. Salas-Huetos A, James ER, Aston KI, Jenkins TG, Carrell DT. Diet and sperm quality: Nutrients, foods and dietary patterns. *Reprod Biol*. 2019;19(3):219–24.

# INFORME DE UN CASO CLÍNICO: OLIGODENDROGLIOMA CON CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS NEURALES Y MARCADORES DE INDIFERENCIACIÓN.

MJ. Ulloa Navas<sup>1</sup>, J. Peña Peña<sup>1</sup>, A. Saurí Tamarit<sup>1</sup>, V. Herranz Perez<sup>1,2</sup>, JM. García Verdugo<sup>1</sup>, J. Ferrer Lozano<sup>3</sup>.

1 Laboratorio de Neurobiología Comparada-Universidad de Valencia, Valencia. 2 CIBERNED. 3 Anatomía Patológica-Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia.

## INTRODUCCIÓN

Los oligodendrogliomas (ODGs) son tumores primarios del sistema nervioso central, y representan un 30% del total de gliomas. Los ODGs se caracterizan por la expresión de una forma mutada de IDH1/2, una alta expresión de ATRX y la codelección 1p/19q. También son distinguibles morfológicamente por los halos blancos que rodean las células neoplásicas y abundantes precipitaciones cálcicas. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la formación de estos tumores no son totalmente comprendidos. En este estudio pretendemos arrojar luz sobre este tema con un caso extraordinario de oligodendroglioma, que podría ayudar a entender la relación entre estos tumores y otros tipos celulares del SNC.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El material analizado en este trabajo procede de un tumor de una paciente de 66 años, que desarrolló un oligodendroglioma de grado II en el lóbulo frontal izquierdo. Las muestras proceden de regiones extraídas quirúrgicamente durante el proceso de extirpación del tumor, que se fijaron inmediatamente. Posteriormente, una parte de la muestra se incluyó en parafina para su corte y análisis de marcadores, que se hizo tanto con inmunohistoquímica como con inmunofluorescencia. Parte de la muestra también fue analizada por microscopía electrónica.

## RESULTADOS

El tumor presenta tres zonas histológicamente diferenciables: el núcleo del tumor con células típicas de un ODG más marcadores neurales como NeuN; la zona de expansión con marcadores de indiferenciación como EGFR, Oli2 y Nestina; y una última región con células tipo roseta que presentan marcadores neurocíticos además de marcadores de indiferenciación (Olig2, Nestina y EGFR). Las células con morfología de roseta no se han descrito previamente en ODGs, aunque sí en neurocitomas y pineocitomas.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La descripción de un oligodendroglioma con características neurales a nivel morfológico y molecular es un descubrimiento sorprendente y sugiere un origen proneural específico de una población concreta de células en el núcleo, que se extienden hacia las fronteras y las células tipo roseta.

## BIBLIOGRAFÍA

- Perry, A & Wesseling, P. Handbook of Clinical Neurology. Elsevier; 2016. 71-95. Vol. nº 134. Histologic classification of gliomas.
- Shah, MN. Leonard, JR and Perry A. Rosette-forming glioneuronal tumors of the posterior fossa, Journal of Neurosurgery. 2010; 5(1), 98-103.



## **COMUNICACIONES ORALES TURNO 2**

# **INFLUENCIA DE LOS NIVELES SÉRICOS DE PROGESTERONA EL DÍA DE LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN LA TASA DE GESTACIÓN EVOLUTIVA DE PACIENTES SOMETIDAS A CICLOS CON PREPARACIÓN ENDOMETRIAL ARTIFICIAL.**

*Rodríguez C.*

*Universidad de Valencia*

### **INTRODUCCIÓN**

Estudios retrospectivos recientes han sugerido una relación entre los niveles séricos de progesterona (P) en la fase lútea de ciclos artificiales para preparación endometrial y el pronóstico reproductivo (1,2). Para confirmar estos hallazgos, llevamos a cabo el primer estudio de carácter prospectivo analizando este aspecto, pudiendo demostrar que aquellas pacientes con niveles de P sérica por debajo de 9.2 ng/ml el día de la transferencia embrionaria tienen un 20% menos de posibilidades de lograr una gestación evolutiva ( $p$  valor  $< 0.05$ ). Estos resultados se obtuvieron tras analizar 211 receptoras de ovocitos donados en el contexto de un ciclo artificial, las cuales fueron escogidas bajo unos criterios de inclusión restrictivos (3). El presente estudio, igualmente prospectivo, tiene como objetivo analizar si estos resultados son extrapolables a todo tipo de pacientes sometidas al mismo tipo de preparación endometrial, incluyendo un amplio tamaño muestral que permita llevar a cabo una validación interna de los hallazgos previos y establecer el punto de corte de P sérica por debajo del cual las tasas de gestación evolutiva y nacido vivo caen significativamente.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Este estudio prospectivo incluyó 1150 pacientes sometidas a un ciclo con preparación endometrial artificial (estrógenos desde el inicio del ciclo menstrual, con la suplementación de 400mg/12 horas de P vaginal para el soporte de la fase lútea), seleccionadas bajo unos criterios de inclusión menos restrictivos que los del estudio previo (3). El día de la transferencia embrionaria se llevó a cabo una determinación de P sérica. La variable principal del estudio es la tasa de gestación evolutiva, determinada como embarazo diagnosticado por visualización ecográfica de uno o más sacos gestacionales a partir de la semana 5 y que evoluciona más allá de la semana 12 de gestación. También se analizaron la tasa de recién nacido vivo y la tasa de aborto.

### **RESULTADOS**

El valor medio de P sérica el día de la transferencia fue  $12.08 \pm 7.04$  ng/ml. La tasa de gestación evolutiva en cada uno de los 10 grupos en los que se dividió la población de estudio según los niveles de P sérica fue:  $<p10$ : 27.4%;  $p10-20$ : 41.9%;  $p20-30$ : 40.4%;  $p30-40$ : 53.4%;  $p40-50$ : 51.3%;  $p50-60$ : 57.4%;  $p60-70$ : 56.6%;  $p70-80$ : 56.5%;  $p80-90$ : 47.8%,  $>p90$ : 57.4% ( $p=0.000$ ). Las pacientes con niveles séricos de P por debajo de 8.8 ng/ml (percentil 30) tuvieron una tasa de gestación evolutiva (36.6% vs 54.4%) y de recién nacido vivo (35.5% vs 52%) significativamente menor en comparación con el resto de las pacientes ( $p=0.000$ ) y una tasa de pérdidas gestacionales significativamente mayor (34% vs 21.6%,  $p=0.001$ ).

### **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Nuestros resultados confirman los publicados previamente por nuestro grupo y establecen un nuevo punto de corte (8.8 ng/ml) de P sérica, muy próximo al definido previamente en el estudio del 2017 (9.2 ng/ml). La importancia de estos hallazgos radica en el hecho de que aquellas pacientes por debajo del punto de corte crítico presentan unas tasas de gestación evolutiva un 18% más bajas, lo cual es clínicamente relevante. Por otro lado, se puede afirmar que hemos validado nuestros resultados en una población más amplia y

heterogénea, por lo que los resultados son válidos para el amplio espectro de pacientes que acuden a las clínicas de reproducción asistida. La P sérica podría, por tanto, considerarse un buen biomarcador para analizar en qué pacientes es necesario llevar a cabo una individualización de la fase lútea a través del ajuste de las dosis de progesterona, con el objetivo de incrementar las posibilidades de éxito en estas pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Yovich JL, Conceicao JL, Stanger JD, Hinchliffe PM, Keane KN. Mid-luteal serum progesterone concentrations govern implantation rates for cryopreserved embryo transfers conducted under hormone replacement. *Reprod Biomed Online*. 1 de agosto de 2015;31(2):180-91.
2. Alsbjerg B, Thomsen L, Elbaek HO, Laursen R, Povlsen BB, Haahr T, et al. Progesterone levels on pregnancy test day after hormone replacement therapy-cryopreserved embryo transfer cycles and related reproductive outcomes. *Reprod Biomed Online*. 1 de noviembre de 2018;37(5):641-7.
3. Labarta E, Mariani G, Holtmann N, Celada P, Remohí J, Bosch E. Low serum progesterone on the day of embryo transfer is associated with a diminished ongoing pregnancy rate in oocyte donation cycles after artificial endometrial preparation: a prospective study. *Hum Reprod*. 1 de diciembre de 2017;32(12):2437-42.

## GENETIC VARIABILITY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ANTIGENS.

*Paula Ruiz y Mireia Coscolla.*

*Institute for Integrative Systems Biology, I2SysBio (Universitat de València-CSIC).*

## INTRODUCTION

Tuberculosis is one of the main deadly diseases that affect the world population caused by a contagious pathogen. Tuberculosis is caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*, which comprises different groups which differ in immunogenicity, host specificity (including ruminants, voles, seals, and African wild mammals such as suricates, mangoses, hyraxes and chimpanzees), but also importantly, genetically. Genetic variation is a common strategy of most of the known pathogens to evade the attack of the immune system. In the case of *M. tuberculosis*, it is unclear whether antigenic variation could be behind the ability to evade the immune system. The previous studies with significantly smaller datasets failed to detect variability in *M. tuberculosis* T cell epitopes. However, we demonstrated that mutations in T cell epitopes impact immune response. One of the essential points to control the disease, it is the discovery of an effective vaccine against pulmonary tuberculosis, since the only vaccine that exists fails to create this immunity. Hence the need to investigate a possible antigenic variation, opening new paths in deciphering immunogenicity mechanisms and contribute to vaccine development.

## MATERIAL AND METHODS

We analysed 3480 experimentally verified human epitopes of T and B cells from different hosts (humans, mice, and ruminants) in a total of 12557 genomes from clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains from all seven human associated groups and four animals' groups. We performed genetic diversity and population genetic analyses using bash scripting, Python programming, and R language, to determine if epitopes vary across *M. tuberculosis* groups, considering deletions and single nucleotide polymorphisms (SNPs).

## RESULTS

We have found that T and B cell epitopes are just deleted in animal associated lineages, mostly in highly virulent and immunogenic genes which are CFP-10 and ESAT-6. Analysing the diversity of epitopes through SNPs analysis, we found higher number of T cell epitopes with nonsynonymous SNPs than previously, and also T cell epitopes with more than half of its sequence being polymorphic. Analysing B cell epitopes, we observed that they harbour more non synonymous SNPs than T cell epitopes. Analysing diversity inside each

M. tuberculosis group, we found that Lineage 4 contained the most diverse T cell epitopes; on the other hand, the most diverse B cell epitopes are found in Lineage 2.

## CONCLUSIONS

We concluded that most of the deleted epitopes are in immunogenic genes: CFP-10 and ESAT-6, driven by partially overlapping deletions in different animal clades and the vaccine strains *M. bovis* BCG. Human B cell epitopes resulted to be more variable than human T cell epitopes. Interestingly, some T cell epitopes showed high variability. In order to verify if that variability has immunological consequences, analysis including immunologic experiments in individual epitopes will be conducted.

## BIBLIOGRAPHY

1. Coscolla M, Copin R, Sutherland J, Gehre F, de Jong B, Owolabi O, Mbayo G, Giardina F, Ernst JD, Gagneux S. *M. tuberculosis* T Cell Epitope Analysis Reveals Paucity of Antigenic Variation and Identifies Rare Variable TB Antigens. *Cell Host Microbe*. 2015 Nov 11;18(5):538-48.
2. Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, Ernst JD, Gagneux S. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet*. 2010 Jun;42(6):498-503.
3. Brites D, Loiseau C, Menardo F, Borrell S, Boniotti MB, Warren R, Dippenaar A, Parsons SDC, Beisel C, Behr MA, Fyfe JA, Coscolla M, Gagneux S. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Front Microbiol*. 2018 Nov 27;9:2820.

# CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DE AUTOFOSFORILACIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA $\alpha$ DE PKA.

Pizarro DS

Universidad Autónoma de Madrid, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

## INTRODUCCIÓN

La actividad de las quinasas es clave en la regulación de multitud de procesos celulares ya que catalizan la reacción de transferencia de grupos fosfato entre el ATP y su sustrato. PKA es una enzima ampliamente estudiada, cuya función en la célula es regulada por la concentración de AMPc. PKA es una enzima tetramérica, compuesta por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas, siendo éstas las que realizan la actividad quinasa. La actividad de estas subunidades está regulada tanto por la unión a las subunidades reguladoras como por el estado de fosforilación de algunos de sus residuos. La capacidad de autofosforilarse juega un papel crítico en la funcionalidad y actividad de esta enzima y por ello hemos tratado de caracterizarla.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para ello se transformaron dos cepas de *E. coli* (BL21 y Top10) en las que se expresaría PKA. Tras la purificación de la proteína mediante HisTrap y Comatografía de Exclusión Molecular se realizaron ensayos de fosforilación y se analizó el patrón de autofosforilación mediante Espectrometría de Masas. Mediante Western Blot se analizó si este patrón se veía alterado por la acción del oncogen Src. Durante todos los experimentos se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida y se tiñeron con Coomassie como control.

## RESULTADOS

8 residuos de PKA presentaron cambios en sus niveles de fosforilación a lo largo del tiempo, no viéndose afectados por la interacción con Src. Sin embargo PKA sí tiene un efecto en Src retrasando la autofosforilación de Src en Y419 e Y530.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Se describieron tres de los residuos analizados como nuevos sitios de autofosforilación: S139, S263, y los residuos colindantes a T197: T195 o T201.

Postulamos a PKA como inhibidor de Src ya que retrasa la autofosforilación de Src.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sørberg K., Moen LV., Skålhegg BS. & Laerdahl JK. *Evolution of the cAMP- dependent protein kinase (PKA) catalytic subunit isoforms*. PLoS ONE. 2017; 12(7):018-1091.
2. Taylor SS., Kim C., Cheng CY., Brown SH., Wu J. & Kannan N. *Signaling through cAMP and cAMP- dependent protein kinase: diverse strategies for drug design*. Biochim Biophys Acta. 2008; 1784:16–26.

## IMPLICACIÓN DE LA 8ª EDICIÓN DE LA AJCC EN MELANOMA MALIGNO.

Ortiz Salvador, P.

Universitat de València.

## INTRODUCCIÓN

En 2018 la American Joint Committee on Cancer (AJCC) actualizó sus guías de estadificación. Ello supuso cambios importantes en la estadificación del melanoma maligno. En esta nueva edición se introdujeron cambios en la clasificación del melanoma fino (Breslow $\leq$ 1mm) en bajo riesgo (T1a) y alto riesgo (T1b). Entre esos cambios se encuentra la eliminación de la variable mitosis por milímetro cuadrado y la inclusión de una nueva en función del índice de Breslow. Estas modificaciones pueden tener implicaciones en la estadificación y sus consecuentes recomendaciones terapéuticas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo en los pacientes atendidos por la unidad de melanoma del HGUV entre 1990 y 2018. Se estadificaron los pacientes según la 7ª edición de la AJCC, posteriormente se reestadificaron según la 8ª Edición de la AJCC y se describieron los cambios observados entre ambas estadificaciones, así como sus implicaciones pronósticas.

## RESULTADOS

De los 2.282 pacientes atendidos entre 1998 y 2018 59,6% presentaban un breslow  $\leq$ 1mm. Estadificados mediante la 7ª Edición de la AJCC resultaron 88,68% en estadio T1a y 11,32% en estadio T1b. Estadificados mediante la 8ª Edición de la AJCC resultaron 87,06% en estadio T1a y 12,94% en estadio T1b. Los cambios cuantitativos en el estadio T1b son pequeños, pero la nueva estadificación ha supuesto un cambio de 2/3 partes de los integrantes de este estadio, modificando por tanto las características pronósticas.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La actualización del sistema de estadificación ha supuesto un cambio importante en el perfil de los pacientes considerados de alto riesgo. Esto se debe a que siendo la ulceración un proceso infrecuente la gran mayoría de los pacientes considerados de alto riesgo lo son por presentar mitosis (En la 7ª Edición) o por presentar un Breslow elevado (En la 8ª Edición). Esto ha conllevado cambios pronósticos, sin modificar cuantitativamente los grupos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Schuckmann LA Von, Mph M, Celia M, Mmedsci BH, Mbchb RL, Lorigan P, et al. Survival of patients with early invasive melanoma down-staged under the new eighth edition of the American Joint Committee on Cancer staging system. *J Am Dermatology*. 2019;80(1):272–4.
2. Niebling MG, Haydu LE, Karim RZ, Thompson JF, Scolyer RA. Reproducibility of AJCC Staging Parameters in Primary Cutaneous Melanoma : An Analysis of 4 , 924 Cases. 2013;(July):3969–75.
3. Verver D, Louwman WJ, Koljenovi S, Akkooi ACJ Van. ScienceDirect Improved stratification of pT1 melanoma according to the 8th American Joint Committee on Cancer staging edition criteria : A Dutch population-based study. 2018;92:100–7.

## REGULATION OF THE DECISION BETWEEN STEM CELL MAINTENANCE AND DIFFERENTIATION IN THE CEREBRAL CORTEX.

*Fabra-Beser J<sup>1</sup>, Mateos-white I<sup>1</sup>, de Agustín-Durán D<sup>1</sup>, Gil-Sanz C<sup>1</sup>.*

*1 Universitat de València.*

### INTRODUCCIÓN

Cortical embryonic neural stem cells or radial glia cells (RGCs) generate all subtypes of macroglia and projection neurons present in the neocortex. There are two main progenitor specification models that explain how RGCs produce such cell diversity. The Progressive Restriction Model states that there is only one class of RGC progenitor whose potential is progressively restricted over time. However, the Multiple Progenitor Model proposes that different subtypes of RGCs may coexist in the progenitor pool programmed to generate such distinct fates<sup>1,2</sup>. The early specification of upper layer neurons, B1 adult stem cells and ependymal cells provided evidence of the heterogeneity of the progenitor pool, supporting the idea of multiple progenitors coexisting. This panorama suggests that RGCs could be subject to a strict regulation since early stages to prespecify its fate. Single cell RNA sequencing (SCseq) analysis of two subtypes of RGCs with different proliferative behaviour revealed the existence of genes differentially expressed among these subpopulations. Here, we present how one of those candidate genes could be involved in the regulation of the decision between stem cell maintenance and differentiation in the mouse cerebral cortex

### MATERIAL Y MÉTODOS

Using in utero electroporation, a DNA transfer technique<sup>3,4</sup>, at early embryonic stages (E12.5) we can target and perform functional experiments in RGCs. Our strategy consisted in the perturbation of the expression levels of the candidate gene in these RGCs and the evaluation of the phenotype 2, 6 and 18 days after the surgery, to observe possible changes in stem cell maintenance, differentiation and final positioning of the produced neurons in the cortical plate. Birth dating experiments and immunohistochemistry have been used to help in such characterization.

### RESULTADOS

Using in utero electroporation, SCSeq and immunohistochemistry we have found that our candidate gene is highly expressed in RGCs that present reduced neurogenic behavior at early embryonic ages. Forced overexpression in all kind of RGCs prevents their division at early ages, preserving them longer as stem cells and leads to the generation of upper cortical neurons at later ages.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

These data reveal the existence of molecular differences between cortical progenitors with different mitotic behavior and indicates that our candidate gene is critical for the maintenance of RGCs to regulate the generation of upper layer neurons.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Franco, S. J. *et al.* Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science* **337**, 746–749 (2012).
2. Franco, S. J. & Müller, U. Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the Mammalian neocortex. **77**, 19–34 (2013).
3. Saito, T. & Nakatsuji, N. Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Dev. Biol.* **240**, 237–246 (2001).
4. Gil-Sanz, C. *et al.* Cajal-Retzius Cells Instruct Neuronal Migration by Coincidence Signaling between Secreted and Contact-Dependent Guidance Cues. **79**, 461–477 (2013).

## IDENTIFICATION OF RESISTANCE MECHANISMS FOR MITOTIC CANCER DRUGS WITH A GENOME-WIDE CRISPR-CAS9 SCREENING STRATEGY.

Monfort-Vengut A, Ortigosa-Fernández B, de Cárcer G.

Cell Cycle and Cancer Biomarkers Laboratory. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM). Madrid 28029, España.

## INTRODUCCIÓN

Resistance to molecular cancer therapies is a major problem facing current cancer research. The study of drug resistance mechanisms allows the discovery of targetable biomarkers with the aim of tailoring cancer therapies and enabling patient stratification. Our laboratory is particularly interested in the mitotic cancer target Polo like kinase 1 (Plk1). Plk1 is a mitotic master regulator essential for the execution of cell division and its overexpression is commonly found in a wide variety of tumors, correlating with a poor prognosis in cancer. As a kinase, Plk1 is susceptible to inhibition by small compounds, leading to cell death. Our main objective is to identify genes involved in resistance to treatment with Plk1 inhibitors.

## MATERIAL Y MÉTODOS

CRISPR-Cas9 screening strategy in breast cancer cell lines with a genome-wide human library of sgRNAs (Tzelepis *et al.*, 2016). Cell cultures (drug titration, sgRNA depletion test, viral titration and infection, screen) and molecular biology techniques (Western blotting, PCR, DNA sequencing).

## RESULTADOS

We generated a genome-wide CRISPR-Cas9 mutant library in MCF-7 breast cancer cell line and titrated the Plk1 inhibitor (BI 6727 volasertib) on it. We performed the screen at volasertib concentrations that inhibited the cell growth in the long term and after 32 days with the inhibitor, we picked resistant colonies at the lower concentrations of the inhibitor.

We checked that the resistant colonies did not harbor mutations in the drug binding residues of Plk1 and then tested the expression of the Multi Drug Resistance 1 membrane channel; some of the resistant colonies presented overexpression of the MDR1 protein. We also identified the sgRNAs inserted in each resistant colony.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

We observe different sensitivity responses of breast cancer cell lines to the Plk1 inhibitor (volasertib) depending on the cancer subtype. This may be caused by the differential molecular profiles of each cell line. Focusing on the resistant screening strategy, it is theoretically non-viable a recovery after a Plk1 inhibition owing its essential role during cell division (Wachowicz et al., 2016), what might explain the results at the higher concentrations. Some of the resistant colonies we obtained so far have overexpression of the Multi Drug Resistance 1 gene (Wu et al., 2015) and do not harbor any Plk1 mutation critical for drug binding (Adachi et al., 2017).

## **BIBLIOGRAFÍA**

de Cárcer, G., Manning, G., & Malumbres, M. (2011). From Plk1 to Plk5: Functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle*, 10(14), 2255-2262. doi:10.4161/cc.10.14.16494

Ruiz, S., Mayor-Ruiz, C., Lafarga, V., Murga, M., Vega-Sendino, M., Ortega, S., & Fernández-Capetillo, O. (2016). A genome-wide CRISPR screen identifies CDC25A as a determinant of sensitivity to ATR inhibitors. *Molecular Cell*, 62(2), 307-313. doi:10.1016/j.molcel.2016.03.006

Wachowicz, P., Fernández-Miranda, G., Marugán, C., Escobar, B., & de Cárcer, G. (2016). Genetic depletion of polo-like kinase 1 leads to embryonic lethality due to mitotic aberrancies. *BioEssays*, 38, S96-S106. doi:10.1002/bies.201670908

Wu, C., Hsieh, C., Hsiao, S., Luo, S., Su, C., Li, Y., . . . Hsu, S. (2015). Human ATP-binding cassette transporter ABCB1 confers resistance to volasertib (BI 6727), a selective inhibitor of polo-like kinase 1. *Molecular Pharmaceutics*, 12(11), 3885. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b003

## **PÓSTERES, TURNO 3.**

### **EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF VECTOR-BORNE CANINE DISEASES IN SPAIN (LEISHMANIA, DIROFILARIA, EHRLICHIA AND ANAPLASMA).**

*Costa-Rodríguez N., Carretón-Gómez E., Montoya-Alonso JA.*

*Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*

## **INTRODUCCIÓN**

Currently, climate change, modifications of lands and habitats due to human activities, as well as an increase in the movement of reservoirs and new species of competent vectors, have contributed to the spread of canine vector-borne diseases. These are mostly emerging and neglected diseases, some of them with zoonotic potential.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Therefore, the objective of this study was to assess the prevalence and distribution of four major canine vector-borne diseases (*Dirofilaria immitis*, *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys*) in 1025 dogs from different provinces of Spain.

## **RESULTADOS**

Of the studied dogs, 17.2% were positive for one or several diseases, being observed positive dogs from 6 months of age. The obtained seroprevalences were 2.4% for *D. immitis*, 10.8% for *L. infantum*, 2.3% for *E. canis* and 5.2% for *A. platys*.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

A wide distribution was observed in all diseases, highlighting the expansion towards the north of the peninsula of those diseases transmitted by insects. The results point to an insufficiency of preventive measures to avoid the infection, and the need of the implementation of awareness campaigns among veterinarians and owners. Furthermore, a close collaboration between veterinarians, physicians and health authorities would be necessary for those zoonotic vector-borne diseases.

## BIBLIOGRAFÍA

- Montoya-Alonso, J. A., Carretón, E., Morchón, R., Silveira-Viera, L., Falcón, Y., & Simón, F. (2016). The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. *Veterinary Parasitology*, 216, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.005>
- Montoya-Alonso, J. A., Mellado, I., Carretón, E., Cabrera-Pedrero, E. D., Morchón, R., & Simón, F. (2010). Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research*, 107(5), 1265–1269. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1987-7>
- Morchón R, Carretón E, González-Miguel J, M.-H. I. (2012). Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe - New Distribution Trends. *Front Physiol.*, 3, 196.
- Morchón R, Carretón E, Grandi G, González-Miguel J, Montoya-Alonso JA, Simón F, Genchi C. (2012). Antibodies to the anti-Wolbachia surface protein are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae, but not in dogs with hidden infections. *Vector of Zoonotic Dis.*, 12 (1), 17-20.
- Morchón R, Moya I, González-Miguel J, Montoya MN, Falcón S. (2010). Infections by *Dirofilaria immitis* zoonóticas in a province in northern Spain. *Epidemiol Infect.*, 138 (3), 380-383.

## METABOLOMICS IN NEURODEGENERATIVE DISEASE

Herrera Panchi K,<sup>a</sup> Medina M,<sup>b,c</sup> Calero M,<sup>b,c,d</sup> Pastor A,<sup>c</sup> Martínez-Mañez R,<sup>a,e,f,g,h</sup> Martínez- Bisbal MC,<sup>a,e,f,i</sup>

<sup>a</sup>Unidad Mixta de Investigación en Nanomedicina y Sensores, IISLaFe, Universitat Politècnica de València, Valencia <sup>b</sup>Network Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain <sup>c</sup>CIEN Foundation, Queen Sofia Foundation Alzheimer Research Center, Madrid, Spain <sup>d</sup>Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain <sup>e</sup>Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València, Camino de Vera s/n, 46020, Valencia, Spain <sup>f</sup>CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain <sup>g</sup>Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, València, Spain <sup>h</sup>Unidad Mixta UPV-CIPF de Investigación en Mecanismos de Enfermedades y Nanomedicina, Universidad Politècnica de Valencia, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain <sup>i</sup>Departamento de Química Física, UV, Valencia, Spain

## INTRODUCCIÓN

Alzheimer's disease (AD) is one of the most frequent neurodegenerative diseases in the elderly and is one the most important public health challenges in the 21st century. AD refers to the progressive loss of memory, as well as the loss of cognitive functions. Today there is no cure for Alzheimer's disease although there are available treatments that relieve symptoms, and researches in this field continues to achieve the biological signs that can detect the disease in the early stages and create preventive treatments.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Taking into account the role of metabolism in biofluid research, this will be the main tool to achieve metabolite biomarkers, because they can serve as an indicator of the disease. In this work, blood serum was studied by NMR to obtain detailed information on the composition. Forty samples (n = 20 AD and n = 20 controls) underwent NMR in a 600 MHz NMR spectrometer. 1D <sup>1</sup>H NMR spectra was used to assign the resonances in all the spectra. To verify that the 1D <sup>1</sup>H NMR assignment was correct, and to overcome the signals overlapped in 1D spectra, 2D heteronuclear <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C HSQC spectra were analysed for the same samples.

## RESULTADOS

According to 1D and 2D spectra, 55 metabolites were identified in agreement with the previously published data [1,2]. Lipids, carbohydrates, proteins and non-protein amino acids such as GABA among others, were identified using Mestrenova software. For these 55 compounds, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts, resonances multiplicity and <sup>1</sup>H coupling constants were determined in human serum.

## DISCUSIÓN/CONCLUSIONES

The aim is to study the serum composition of patients with a diagnosis of Alzheimer's disease and a set of control subjects. The metabolites assigned could be compared qualitatively and quantitatively in both sets to determine possible differences in the serum that can be used as Alzheimer's biomarkers.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kromke M, Palomino-Schätzlein M, Mayer H, Pfeffer S, Pineda-Lucena A, Luy B, et al. Profiling human blood serum metabolites by nuclear magnetic resonance spectroscopy: a comprehensive tool for the evaluation of hemodialysis efficiency. *Translational Research*. 2016;171:71–82.
- [2] Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The human serum metabolome. *PLoS one*. 2011;6(2):e16957.
- [3] Martínez-Bisbal MC, Martí-Bonmatí L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llácer JL, et al. 1H and 13C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo 1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR in Biomedicine*. 2004;17(4):191-205.
- [4] Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine*. 2000;13(3):129-53.

## EVALUACIÓN DE NUEVOS MARCADORES DE DIABETES AUTOINMUNE

Bonillo D<sup>1</sup>, Cebolla M<sup>2</sup>, Díaz M<sup>3</sup>, Pérez J<sup>4</sup>

1. Grado en Biología, Universidad de Valencia. 2. Técnico de laboratorio análisis bioquímicos en autoinmunidad, Hospital Clínico Universitario de Valencia. 3. Residente en laboratorio. 4. Facultativo especialista Bioquímica en laboratorio

## INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 1 o insulino dependiente (DMID), es una enfermedad autoinmune en la que se produce la destrucción selectiva de las células beta productoras de insulina que se encuentran en los islotes pancreáticos de Langerhans. Su prevalencia representa el 5-10% de los casos totales de diabetes, pero su tasa más alta se da en adolescentes. Antes de la aparición clínica, a menudo se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos circulantes contra antígenos, como GAD65, IA2, ZnT8 y la propia insulina.

Su medición puede ser útil para ayudar al médico con la predicción, el diagnóstico y el tratamiento de pacientes, pues su medición combinada incrementa la tasa de detección de DMID a un 98% en el inicio de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es medir la sensibilidad de este conjunto de pruebas ante la sospecha

de diabetes mellitus tipo 1 en muestras de distintos pacientes.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

En la determinación de los anticuerpos anti-ZnT8 se utiliza la prueba ELISA Anti-ZnT8 con el kit de la casa comercial EUROIMMUN, siendo procesadas en el analizador Analyzer I-2P del laboratorio de autoinmunidad indicado. Para la determinación del resto de anticuerpos mencionados (contra GAD65, IAA e insulina) se utilizó la máquina MagLumi, situada en el mismo laboratorio, siendo un inmunoensayo por quimioluminiscencia (CLIA) de la casa comercial Snibe Diagnostic.

Una vez obtenidos los resultados de todas las pruebas a las muestras utilizadas en el estudio, se calcula la sensibilidad clínica de cada prueba.

## **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en cuanto a la Sensibilidad de cada una de las pruebas realizadas en este estudio son los siguientes: ZnT8 (50%), GAD65 (40%), IAA (60%), Anti-IA2 (40%). La detección combinada de los cuatro anticuerpos incrementa la tasa de detección a valores cercanos al 100%.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

La prevalencia de anti-ZnT8 en el inicio de la enfermedad en pacientes pediátricos ha sido determinada en varios estudios en 56%-72%, lo cual se aproxima bastante a los resultados obtenidos en este estudio. La detección combinada de los tres autoanticuerpos incrementa la tasa de detección de DMID al 98% en el inicio de la enfermedad.

En conclusión, la prueba anti-ZnT8 representa un importante avance en el diagnóstico de DMID en personas jóvenes, pero también el diagnóstico de diabetes latente en adultos (LADA) y su transición a DMID.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Canivell S, Gomis R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmun Rev.* 2014 Apr-May;13(4-5):403-7.

Garnier L, Marchand L, Benoit M, Nicolino M, Bendelac N, Wright C, Moulin P, Lombard C, Thivolet C, Fabien N. Screening of ZnT8 autoantibodies in the diagnosis of autoimmune diabetes in a large French cohort. *Clin Chim Acta.* 2018 Mar;478:162-5.

# **DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA DE COMPLICACIONES ANTE EL USO DE DISPOSITIVOS DE ACCESO VASCULARES POR MEDIO DE INDICADORES DE CALIDAD EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE VALENCIA**

*Martínez A, Carbonara L, García-Molina P, Balaguer-López E, Casanova-Vivas S, Llorca-Porcar A, Rodríguez-Dolz MC, Muñoz ML.*

*Facultat d'Infermeria i Podologia, Universidad de Valencia. Hospital Clínico Universitario de Valencia.*

## **INTRODUCCIÓN**

La herramienta que se propone en el estudio es novedosa y única, que busca la evaluación de calidad medible de procedimientos enfermeros relacionados con la terapia intravenosa en la población infantil, con bajo coste en recursos, sencillo y rápido. Midiendo la calidad asistencial. De gran utilidad para los servicios de enfermería en relación con los cuidados en TIV. Además de incorporar nuevos indicadores a otros cuidados como la:

prevención de úlceras por presión, prevención de caídas en pacientes hospitalizados, prevención de infecciones en vías urinarias, entre otros.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El trabajo es un tipo de estudio descriptivo transversal de los profesionales de enfermería asistenciales relacionados con la terapia intravenosa que se va a llevar a cabo en el Hospital Universitario de Valencia en la unidad de pediátrica. Los sujetos del estudio serán la población pediátrica entre los 0 y los 16 años ingresada en el servicio pediátrico. El método de recolección de datos se va a desarrollar tras la medición de variables tanto dependientes como independientes relacionadas con el cuidado de catéteres venosos o arteriales a través de un cuaderno de recogida de datos (CRD). Posteriormente, se realizará el pilotaje y luego se dará continuidad a la recogida de datos, para garantizar la homogeneidad en la interpretación de cada variable.

## **RESULTADOS**

Es un estudio completamente formulado y creado con detenimiento, que se mantiene aún en ejecución, por lo que los resultados a exponer corresponden a los objetivos que se desean alcanzar. Entre los principales resultados se espera: Determinar la prevalencia de las complicaciones relacionadas con el acceso vascular en la población pediátrica ingresada en el Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Conocer el grado de cumplimiento de los indicadores enfermeros sobre el cuidado de la población pediátrica portadora de accesos vasculares propuestos por el programa INCATIV PEDIÁTRICO.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Como hipótesis del estudio se puede indicar la siguiente: Partiendo del conocimiento y evidencia de diversos indicadores utilizada por el proyecto INCATIV, ¿podrá lograr el estudio una identificación detallada de la prevalencia de complicaciones relacionadas con la terapia intravenosa en la población pediátrica?

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Alvarez D, Capell M, García M, García J, et al. Catéteres centrales de inserción periférica en recién nacidos. Documentación del grupo Español de Consenso en Terapia Intravenosa Neonatal. Madrid, España: 1era Edición; 2010.
- Bizarro MJ, Sabo B, Noonan M, Bonfiglio MP, Northrup V, Diefenbach K, et al. A quality improvement initiative to reduce central line-associated bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31:241–8.
- Lutwick L, Al-Maani A, Mehtar S, Memish Z, et al. Managing and preventing vascular catheter infections: A position paper of the international society for infectious diseases. *International Journal of Infectious Diseases.* 2019. Vol 84: 22–29.
- Vibhavari M, Mantha S, Rayani B. Vascular access in children. *Indian Journal of Anaesthesia.* November 12, 2019, IP: 147.156.224.154. <http://www.ijaweb.org>

# COMPARATIVA DE LOS VARIANT CALLERS PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES SOMÁTICAS EN MUESTRAS PAREADAS Y EN MUESTRA ÚNICA

*Pablo Monfort Lanzas, Vicente Arnau, Wladimiro Diaz, Barbara Hernando, Conrado Martinez-Cadenas*

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la detección de mutaciones somáticas tiene un gran potencial en el tratamiento de cáncer. Gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación se puede estudiar las mutaciones somáticas presentes en un tumor. Sin embargo, realizar el variant caller no es trivial debido a ruido en las lecturas. Se han desarrollado numerosas herramientas bioinformáticas para descubrir mutaciones (variantes).

Normalmente estos programas emplean muestras germinales del paciente, como muestras de sangre periférico para distinguir entre las mutaciones germinales y somáticas presentes en el tumor. Sin embargo, en muchas ocasiones no se dispone de muestra de línea germinal del paciente, ya que, pueden tratarse de muestra de parafina, o simplemente para reducir el coste económico del experimento. Por ello se han desarrollado un gran número de Variante Caller que presentan la opción de muestra única. Entre los más empleados se encuentran Mutec2, Octopus, PISCIS y SomaticSeq. Sin embargo, cada uno de estos programas se emplean diferentes algoritmos para la llamada de variantes.

Con el siguiente trabajo se pretende conocer cuáles de los actuales Variante Caller para la detección de mutaciones somáticas son los más eficientes, y cuales introducen más ruido. Mediante la comparación de las variantes obtenidos con cada uno con una muestra de tumor simulada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para generar los datos simulados se empleará el exoma del individuo NA12878 presente en el consorcio Genome In a Bottle. Se ha elegido este individuo como prueba, ya que, se trata de un genoma muy bien estudiado del cual se posee un genotipo de gran confianza. Las lecturas de este paciente se alinearán con el genoma de referencia hs37d5 mediante BWA-men para obtener un fichero BAM. Este primer fichero se puede emplear como tejido normal. Las mutaciones somáticas se simularán sobre este fichero mediante el programa BAMSurgeon. Estos dos ficheros generados se analizarán con los diferentes Variant Caller, para efectuar el estudio tanto como muestra pareada como muestra tumoral única. Una vez obtenidos los ficheros VCF, los cuales contienen las variantes detectadas, se realizarán las diferentes medidas (Exactitud, Precisión, Sensibilidad, FDR y Coeficiente de Correlación de Matthews).

## RESULTADOS

Se han obtenido valores de precisión similares en los 3 programas para el uso de muestras pareadas, próximas al 90 %. Los valores obtenidos para muestra única son más bajos próximos al 60 %.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Se obtienen mejores resultados para el uso de muestras pareadas. Es necesario el uso de filtros posteriores para eliminar los falsos positivos introducidos por el algoritmo de clasificación.

## BIBLIOGRAFÍA

Jing Meng, Y.-P. P. C. (2018, January 1). A database of simulated tumor genomes towards accurate detection of somatic small variants in cancer. Retrieved from <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/261503v1>

Fang, L. T., Afshar, P. T., Chhibber, A., Mohiyuddin, M., Fan, Y., Mu, J. C., ... Lam, H. Y. K. (2015, September 17). An ensemble approach to accurately detect somatic mutations using SomaticSeq. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4574535/>

### **EL USO DE ANTIOXIDANTES EN LA INFERTILIDAD MASCULINA**

*Ramírez, C.*

*Universitat de València*

#### **INTRODUCCIÓN**

La infertilidad afecta a aproximadamente el 10-15% de las parejas, siendo el factor masculino el responsable de esta infertilidad en un 50% de los casos. El estrés oxidativo juega un papel muy importante en la fertilidad tanto masculina como femenina. En el hombre, una de las principales causas de infertilidad se debe a la aparición de ERO (Especies Reactivas de Oxígeno) que originan espermatozoides inmaduros y leucocitos. En condiciones fisiológicas, estas ERO están implicadas en procesos como la capacitación y reacción acrosómica y, además, actúan como segundos mensajeros. Sin embargo, cuando se produce un exceso de ellas el espermatozoide es muy vulnerable debido a la peroxidación lipídica que se produce en la membrana, así como a su limitado sistema de reparación de ADN. Por ello, para combatir este exceso de ERO, se han empleado diferentes antioxidantes como tratamiento de la infertilidad masculina. El objetivo de este trabajo consiste en llevar a cabo una búsqueda exhaustiva sobre el conocimiento científico de los antioxidantes y su empleo en hombres infértiles para establecer su posible aplicación clínica.

#### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la obtención de la información en la que se ha basado este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica en las bases de datos PubMed, Medline, Google Scholar y Cochrane seleccionando artículos publicados entre los años 2002-2019 y solo en inglés. La búsqueda incluyó palabras clave como “male infertility”, “antioxidant”, “oxidative stress”, “coenzyme q10”, “carotenoids”, “carnitine”, “vitamin C, E” y “micronutrients”.

#### **RESULTADOS**

La Coenzima Q10 aumenta la actividad de enzimas antioxidantes pero su efecto sobre los parámetros espermáticos es controvertido. La vitamina E en combinación con carnitina o selenio aumenta la motilidad espermática y en combinación con la vitamina C, disminuye la fragmentación del ADN, índice que también se ha relacionado de manera inversa con el  $\beta$ -caroteno. El licopeno se relaciona con un incremento de la concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides y la astaxantina favorece la capacitación. Las carnitinas se asocian principalmente a un aumento de la motilidad aunque hay cierta controversia. El zinc se vincula a la mejora de la concentración y la motilidad. El selenio y el folato tienen mejor efecto en combinación. El folato junto con zinc podría mejorar la concentración espermática. Otras combinaciones más complejas han reportado incrementos en todos los parámetros espermáticos.

#### **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Todos antioxidantes que se han tratado en esta revisión se relacionan en mayor o en menor medida de manera positiva con los parámetros espermáticos, algunos administrándose solos y otros en diversas combinaciones. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, aunque hay cierta tendencia a vincular cada uno de ellos a determinados parámetros, esto no se puede establecer de manera categórica porque hay discordancia entre los diferentes ensayos clínicos. Su aplicabilidad en la práctica clínica sería una buena opción debido a su bajo coste, obtención y administración y a que los efectos secundarios no son demasiado graves. Para ello, número de ensayos debe ser más representativo, el ajuste las dosis y la duración del 549 tratamiento para que sean óptimos, así como realizar más estudios, donde lo que se evalúe sea la tasa de fecundación, pero, sobre todo, la tasa de recién nacido vivo.

## BIBLIOGRAFÍA

Alahmar AT. The impact of two doses of coenzyme Q10 on semen parameters and antioxidant status in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Clin Exp Reprod Med 2019b;46:112–118.

Ghanem H, Shaeer O, El-Segini A. Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: A randomized controlled trial. Fertil Steril [Internet] 2010;93:2232–2235. Elsevier Ltd.

Cyrus A, Kabir A, Goodarzi D, Moghimi M. The effect of adjuvant vitamin C after varicocele surgery on sperm quality and quantity in infertile men: A double blind placebo controlled clinical trial. Int Braz J Urol 2015;41:230–238.

Moslemi MK, Tavanbakhsh S. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: Effects on semen parameters and pregnancy rate. Int J Gen Med 2011;4:99–104.

## ***INFLUENCE OF FELINE CARDIOPULMONARY DIROFILARIASIS IN THE DEVELOPMENT OF HUMAN ATOPIC DISEASES.***

*Matos JI, Falcón Y, Falcón S, Carretón E, Montoya JA.*

*Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*

## INTRODUCCIÓN

Epidemiological and clinical evidence suggests that *Dirofilaria immitis* seems to be a strong risk factor for allergic humans findings<sup>1</sup>. The main aim of our work was to assess the relationship between the presence of *Dirofilaria immitis* in cats and the high prevalence of allergic comorbidities in the human population of the Canary Islands, an hyperendemic region.

## MATERIAL Y MÉTODOS

We analyzed 222 privately owned cats (113 males and 109 females). The criteria for inclusion were >5 months of age, no *Dirofilaria immitis* chemoprophylaxis, no previous history of infection, and the owner's agreement to participate in the survey. Serum samples were obtained from each studied cat and a commercial immunochromatographic test kit (Heska Feline Heartworm test ®, Heska Corporation, Colorado, USA) was used to analyze the circulating *D. immitis* antibodies.

We carried out a cross-sectional study to determine the prevalence of atopic march diseases in the studied cats' owners. Data were collected by using personal interviews and questionnaires including information about age, sex, location and episodes of diagnosed asthma, atopy or rhinitis during at least the last five years. The study population comprised 222 owners (100 men and 122 women) aged 14 to 67 years old, corresponding with the cats studied and currently living in Gran Canaria island.

The data were analyzed using the SPSS Base 25.0 software for Windows.

## RESULTADOS

The prevalence observed in cats with *D. immitis* antibodies was 24,32% (54/222). On the other hand, the prevalence of human with diagnosed atopic disease was 31,08% (69/222). The total population comprises 222 cats and their respective 222 owners, showing that 128 non-allergic owners have a cat without parasite contact, representing a prevalence of 57,66 %. Moreover, 40 cats diagnosed without dirofilariosis antibodies had an allergic owner, corresponding with 18,02% of total prevalence. In addition, it was observed that 25 non-allergic owners had a positive dirofilariosis cat, representing a 11,26% prevalence. Finally, the 13,06% of the studied population corresponded to 29 allergic owners with a positive dirofilariosis cat in their homes.

These findings show that, among the positive cats, 53.70% (29/54) had an allergic owner. Furthermore, 83.66% (128/143) of owners without diagnosed allergies have a negative dirofilariosis cat, whereas 42.03% (29/69) of atopic owners have a cat with a positive result to the antibodies test.

## DISCUSIÓN

Similar results of feline dirofilariosis prevalence in Canary Islands' cats haven been reported in previous studies focused on the idea of one health<sup>2</sup>. In addition, previous studies demonstrate that the Canary Islands present the highest morbidity rate of asthma and atopic symptoms in the Spanish territory<sup>3</sup>.

Previous research suggest that an association between allergic disorders and the presence of seropositivity to *D. immitis* in people could exist, whereas it is suspected that the exposure to parasites may be an important contributor to the risk of developing allergic diseases<sup>1,4</sup>. In that sense, a parallel recent study developed in Gran Canaria shows similar results: showing that more than 50% of the dogs studied with cardiopulmonary dirofilariosis have an atopic owner<sup>1</sup>. Moreover, a previous study in the neighbor island of Tenerife showed significantly higher levels of specific IgE anti-*D. immitis* antibodies in a share of atopic patients, suggesting a contribution of the anti-*D. immitis* IgE to the high levels of total IgE present in this group<sup>4</sup>.

The results obtained in this work suggest that the exposure to *D. immitis* in hyperendemic areas could be a factor that contributes to the development of atopic comorbidities and their high prevalence in the Canaries. However, new researches should be conducted, focused on the influence that the constant exposure to *D. immitis* can exert in the development of hypersensitivities in the Canary Islands population.

## BIBLIOGRAFÍA

Matos Rivero JI, Montoya Alonso JA, Carretón Gómez E, Falcón Cordón Y, Falcón Cordón S. ¿Puede la Dirofilariosis Cardiopulmonar Canina incrementar el riesgo de enfermedades atópicas en la población humana? XV Congreso Andaluz de Veterinarios Especialistas en Animales de Compañía, Sevilla, 25 y 26 de octubre de 2019.

Montoya-Alonso JA, Carretón E, Morchón R, Silveira-Viera L, Falcón Y, Simón F. The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. *Vet Parasitol.* 2016; 216:66–71.

Juliá-Serdá G, Cabrera-Navarro P, Acosta-Fernández O, et al: High prevalence of asthma and atopy in the Canary Islands, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011; 15:536–541.

Pou-Barreto C, Quispe-Ricaldo MA, Morchón R, Vázquez C, Genchi M, Postigo I, et al. Galectin and aldolase-like molecules are responsible for the specific IgE response in humans exposed to *Dirofilaria immitis*. *Parasite Immunol* 2008; 30:596-602.

# **ACHANTAMOEBA AND AMOEBIA RESISTANT MICROORGANISM (ARM)**

*Bueno M., Bandel T.*

*University of the west of Scotland (UWS)*

## **INTRODUCCIÓN**

Acanthamoeba is a relevant genus of opportunistic pathogen that cause a variety of human diseases (1) and also acts as a reservoir of pathogenic microorganism (1) that are resistant of being destructed in the phagolysosome (2) and that is why they are called amoebae resistant microorganism (ARM) (2). As Achantamoeba gather a wide range of microorganism promotes the exchange of genetic information between them and so, the acquisition of new pathogenic strategies (2) as antibiotic resistance genes which is, currently, one of the most important challenges according to the World Health Organisation (3). Our study is focused in Pseudomonas as a genus of intra-amoebae bacteria because it is one of the most predominant microorganisms inside Acanthamoeba and because it shows a great predisposition to acquire antibiotic resistances due to its flexible genome (4). Our project intends to characterize Pseudomonas and how its intra-amoebae lifestyle plays a role in the acquisition of new traits. On the other hand, our work intends to get axenic cultures of Acanthamoeba in order to be able to study the pathogenicity of the amoebae without its guest.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

To get axenic plates was applied two strategies: One attempt was based on serial dilution in order to get individual cells of Achantamoeba and the other try was based on the culture of samples of Achantamoeba in non-nutrient plate of agar, adding in the opposite extreme, as a source of food, killed Escherichia coli. The idea was to make Acanthamoeba move in the direction of the source of food so it could be isolated. On his side, to characterize the presence of Pseudomonas spp. in samples was applied a Gram stain, as well as oxidase and catalase activity test and, also, was conducted a PCR to confirm the presence of this bacteria in the samples.

## **RESULTADOS**

On one hand, it was impossible for us to get axenic plates in neither case: the serial dilution strategy was checked under inverted microscopy and bacteria was always present. On his side, the non-nutrient agar strategy was checked transferring a small amount of the supposed axenic sample obtained to an LB (Luria-Bertani) plate, but bacterial growth was always detected in these plates. Related to the characterization of the presence of Pseudomonas spp. this was not entirely conclusive because the results for the PCR characterisations were negatives due to the small amount of DNA extracted from each sample.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

In our project we worked with environmental samples of Acanthamoeba from different origins (Scotland and Argentina). The presence in the different samples of both, Acanthamoeba and Pseudomonas highlight the relevance of both microorganisms in the context of global health because they are widely distributed. In this way, our study can be taken as a first step to further experiments in which Pseudomonas can be characterized, and so differences between free-living Pseudomonas and its relative intra-amoebae lifestyle can be established to determine how living inside Achantamoeba promotes the acquisition of new traits as antibiotic resistances. Also, our study can be taken as a first step to characterize pathogenicity of Achantamoeba without guest. This



is because getting axenic cultures provides a useful tool to test its virulence and to what extent do the guests are implied in the infection that these amoebae produces.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Khan N. Acanthamoeba: Biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiology Reviews. 2006 July; 30: 564–595
2. Moliner C, Fournier P, Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. FEMS Microbiology Reviews. 2010 May; 34 (3):281-294.
3. Blair J, Webber M, Baylay A, Ogbolu D, Piddock L. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology. 2015 January 11; 13: 42–51
4. Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: an ocular perspective. Clinical and Experimental Optometry. 2018 March 1; 101: 162–171

## NANOMATERIALES: SUBNANOPARTÍCULAS DE PLATA, INTERÉS FARMACOLÓGICO.

*Porto V. (1) y Areal E.*

*Universidad de Santiago de Compostela y Universidad de Salamanca*

## INTRODUCCIÓN

Los clústeres cuánticos atómicos (AQC) se definen como un grupo de átomos de plata u otros, metales con una composición definida y una o muy pocas estructuras geométricas estables. Tienen un tamaño muy reducido (<1nm), lo que les permite presentar unos efectos cuánticos que hacen que dejen de comportarse como metales y presenten un comportamiento similar al de las moléculas.

Diversos estudios han puesto de manifiesto las posibles aplicaciones de los AQC asociadas a sus novedosas propiedades. En el campo de la nanomedicina, más específicamente en oncología, el interés en los AQC viene dado por su tamaño, estabilidad y carga neutra a pH fisiológico, que los haría susceptibles de penetrar libremente a través del tejido tumoral, y por su a priori baja toxicidad. Además de su posible utilización como bactericidia frente a bacterias resistentes a antibióticos.

*El trabajo está basado en la tesis doctoral de Vanesa Porto (USC). Se han seleccionado los experimentos del mismo tipo de los que pude llevar a cabo durante mi estancia en prácticas en el Centro de Investigación en medicina molecular y enfermedades crónicas (Cimus) y Nanogap. Las tareas realizadas fueron: síntesis de clústeres de plata y análisis de sus efectos bactericidas e intercalación en el ADN. Debido a que los resultados obtenidos durante dicha estancia no se pueden publicar, se han cogido los resultados obtenidos por Vanesa Porto durante la elaboración de su tesis.*

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Método electroquímico de síntesis de subnanopartículas, clústers atómicos de tres átomos de plata

Los Ag<sub>3</sub>-AQC no se unen a los tioles, contrariamente a lo que sucede con los iones de plata. Por lo que, utilizando una resina tiolada podemos realizar una separación eficiente de los iones de plata de los clústeres de tres átomos de plata. Cálculos teóricos han permitido explicar el fenómeno.

La cantidad de oxígeno disuelto en muestras acuosas de Ag<sub>3</sub>-AQC es suficiente para predecir la interacción de los Ag<sub>3</sub>-AQC con los tioles. La unión del metil tiol a los Ag<sub>3</sub>-AQC no es favorable, se caracteriza por

una energía de unión positiva. Debido a que los clústers más grandes que los de tres átomos de plata interactúan con la resina tiolada, la purificación protocolo nos garantiza la ausencia de contaminaciones con clústers formados por más de tres átomos de plata. Las únicas especies a parte de Ag3-AQCs en las muestras hay Ag2-AQCs pero estos son exclusivamente espectadores puesto que no tienen reactividad.

### **Actividad Ag5-AQCs en células eucarióticas**

Con la finalidad de poder explorar la actividad de Ag5-AQCs en las células eucarióticas, el efecto citotóxico de diferentes concentraciones de clúster fueron estudiados en células A549 proliferando y no proliferantes.

Después, las células estuvieron sin suero durante 72h y analizadas con citometría de flujo para asegurarnos de que el ciclo se había parado en fase G0/G1. Una vez comprobado esto, se trataron las células sin suero con diferentes concentraciones de clúster.

La coadministración de DTT y Ag5-AQCs revierte el efecto citotóxico de los Ag5. Las células A549 proliferantes fueron tratadas con Ag5 (1.2 mg/L), DTT (0.25 o 0.5 mM) o con una combinación de Ag5 (1.2 mg/L) y DTT (0.25mM o 0.5 mM) durante una hora, la viabilidad celular fue medida 24h más tarde mediante MTT.

### **Efecto de los clústeres en bacterias**

Bacterias aisladas de muestras clínicas fueron tratadas durante 1 hora con Ag-AQC (83ng/mL) y cultivadas durante 20h. al final de la incubación, se ha leído la absorbancia a 600nm, el porcentaje de viabilidad es considerado como el porcentaje de absorbancia de las bacterias tratadas con clústeres versus el control (vehicle).

También se ha tratado *E.Coli* con diferentes concentraciones de Ag5 y 20h más tarde se cuantificó el crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría. Además de comprobar también la reversión del efecto bactericida al añadir DTT+ clúster.

## **RESULTADOS**

Los clústeres de plata tienen una influencia sobre la interacción entre las proteínas de DNA-binding como las topoisomerasa IV, *E.Coli* ADN girasa, y la enzima de restricción Hind III. Ag-AQCS en concentraciones nanomolares inhiben la actividad de la enzima. El efecto inhibitorio de los clústeres de plata es linealmente dependiente con la concentración y es posible debido a la intercalación de los clústeres en el ADN. Todos los efectos anteriores, que no se observan en presencia de iones de plata, pueden explicar la actividad bactericida que ejercen.

Ag5-AQCs induce estrés oxidativo en adenocarcinomas de pulmón mediante la oxidación de los residuos de Cisteína (Cys) en las proteínas celulares fundamentales llevando a la activación de la muerte celular programada mediante la alteración del balance redox. Numerosas proteínas con un alto contenido de cisteína y grupos tioles accesibles como pueden ser los metallothioneins o thiorredoxina son buenos candidatos para la interacción con Ag5-AQCs.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

1. Ag-AQCs son nuevos materiales que poseen una actividad bactericida que podría proporcionar una alternativa al uso de antibióticos contra bacterias que manifiestan resistencia.

2. Obtener una cantidad suficiente de clústeres puros no ha sido posible por el momento por lo que los ensayos biológicos con Ag2 no se han realizado de forma concluyente todavía.
3. Las interacciones entre los clústeres de plata y sus dianas celulares son altamente selectivas y dependen del tamaño.
4. Los AQC's difunden fácilmente a través de tejidos biológicos debido a su tamaño reducido, por lo que representa un buen candidato a fármaco antitumoral en combinación con otras drogas; modulando su accesibilidad al ADN y eliminando así uno de los principales factores limitantes de los agentes quimioterapéuticos convencionales: la concentración limitada en el lugar de acción.
5. Ag5-AQCS son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar la metástasis.
6. La oxidación de tioles mediada por Ag5-AQC's abre otras múltiples posibles aplicaciones farmacéuticas. Por ejemplo, utilizarlos en tratamientos de procesos tromboembólicos actuando como inhibidor de la proteína disulfuro isomerasa.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Porto González V. Importancia de las interacciones de los clusters de plata con células tumorales humanas. 2017 [cited 2019 Aug 30];1. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=146642>
2. Neissa J, Pérez-Arnaiz C, Porto V, Busto N, Borrajo E, Leal JM, et al. Interaction of silver atomic quantum clusters with living organisms: bactericidal effect of Ag3 clusters mediated by disruption of topoisomerase-DNA complexes. *Chem Sci*. 2015 Jul 14;6(12):6717–24.
3. Buceta Fernandez D. Caracterización y propiedades catalíticas de clústeres cuánticos subnanométricos. 2011;203.
4. Fuentes JC, Rivas J, López-Quintela MA. Synthesis of Subnanometric Metal Nanoparticles. *Encycl Nanotechnol*. 2016;4037–51.

# **HALLAZGOS PATOLÓGICOS EN DISECCIÓN ANATÓMICA DE CADÁVER: INTERÉS DOCENTE Y FORMATIVO.**

*Monroy Hernández MP*

*Universidad CEU Cardenal Herrera*

## **INTRODUCCIÓN**

La disección tradicional con cadáver se ha considerado el “Gold standard” de las prácticas de Anatomía. Actualmente programas de disección anatómica están reemplazando esta enseñanza tradicional. El objetivo principal de nuestro trabajo es mostrar algunas ventajas de la disección en cadáver frente a las nuevas tecnologías de enseñanza con disección virtual a través de modelos digitales o 3D.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Disección correspondiente a la asignatura de Anatomía de Segundo Curso del Grado de Medicina realizada en cadáver de mujer sin datos clínicos conocidos en el momento de la disección.

## RESULTADOS

Tras la apertura de cuello y cavidad torácica del cadáver se evidenciaron adenopatías en áreas: supraclavicular derecha, paratraqueal superior (regiones 1 y 2 bilaterales), prevascular y retrotraqueal (región 3), paratraqueal inferior (región 4 bilateral), subaórtica y para-aórtica (regiones 5 y 6), subcarinal (región 7) e hilar derecha (región 8). Las características morfológicas de dichas adenopatías eran color oscuro, aumento de tamaño y consistencia (dureza al tacto) y en algunos casos formación de conglomerados. Hallamos también trombosis en territorio de Vena Cava inferior y superior y aurícula derecha.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Los avances tecnológicos están permitiendo nuevos modelos de enseñanza de la anatomía, como es el caso de las disecciones virtuales o modelos 3D. Sin embargo, la disección anatómica en cadáver ofrece a los estudiantes la posibilidad de una primera toma de contacto con el estudio de determinadas patologías. En nuestro caso, la disección sobre un cuerpo real ha permitido encontrar un conjunto de adenopatías relacionadas con un proceso tumoral no descubierto en el conjunto de nuestra disección anatómica (tumor de origen desconocido). Estos hallazgos y su relación clínica no hubiesen sido posibles en el caso de utilizar los modelos ideales que ofrecen las disecciones virtuales.

Como conclusiones, podemos decir que la disección sobre cadáver aporta elementos de interés para el alumno como puede ser una primera toma de contacto con determinadas patologías, o diversidades anatómicas morfológicas. Por otra parte, sería interesante poder tener a disposición de estudiantes y docentes determinados datos clínicos de los cuerpos a estudio, puesto que complementaría la formación anatómica. En consonancia con esto, algunos trabajos determinan que uno de los criterios manejados por los estudiantes para la elección de centro formativo es poder disponer de disección anatómica en cadáver.

## BIBLIOGRAFÍA

- Darras KE, de Bruin ABH, Nicolaou S, Dahlström N, Persson A, van Merriënboer J, Forster BB. Is there a superior simulator for human anatomy education? How virtual dissection can overcome the anatomic and pedagogic limitations of cadaveric dissection. *Med Teach*. 2018 Jul;40(7):752-753.
- Deshmukh V, Singh S, Sirohi N, Baruhhe D. Variation in the Obturator Vasculature During Routine Anatomy Dissection of a Cadaver. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2016 Aug; 16(3):356-8.
- Houser JJ, Kondrashov P. Gross Anatomy Education Today: The Integration of Traditional and Innovative Methodologies. *Mo Med*. 2018 Jan-Feb;115(1):61-65.
- Matakas JD, English K, Allyn K, Algava D, Howe RA, Mishall PL, Downie SA. Axillobifemoral Bypass Graft: A Student Dissection Experience. *Einstein J Biol Med*. 2016;31(1-2):31-33.

# **PAPEL DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN LA REGULACIÓN DE miRNA SENSIBLES A 17 $\beta$ -ESTRADIOL EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS**

*Paes A.B., Martínez-Alarcón N., Pérez-Cremades D., Vidal-Gómez X., Hermenegildo C., Novella S.*

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València e Instituto de Investigación Biomédica INCLIVA, Valencia.*

## **INTRODUCCIÓN**

La señalización por estrógenos juega un papel importante en la biología vascular del endotelio y modula vías metabólicas y vasoactivas tales como la vía del óxido nítrico (NO), prostaglandinas o angiotensina 1-7. Los miRNA son pequeñas moléculas de RNA no codificante, que regulan la expresión postranscripcional de numerosos genes. La demostración reciente del cambio de perfil transcriptómico de las células endoteliales en respuesta a 17 $\beta$ -estradiol (E2) (1) aumenta las expectativas sobre las acciones vasculares de los estrógenos mediadas por receptores de estrógenos (ER) ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER. Con todo ello, el objetivo de este estudio es determinar la participación de los ER en la regulación de la expresión de miRNA por 17 $\beta$ -estradiol en células endoteliales humanas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Los cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron de cordones umbilicales procedentes del Hospital Clínico de Valencia. Para estudiar los efectos de los ER, las células se expusieron a antagonistas de los ER 60 min. antes del tratamiento con concentraciones fisiológicas de E2 (1 nmol/L): ICI 182 780 (1  $\mu$ mol/L), antagonista inespecífico de los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$ ; MPP (1  $\mu$ mol/L), antagonista específico de ER $\alpha$ ; G15 (1  $\mu$ mol/L), antagonista específico de GPER. En otros experimentos, las células se expusieron durante 24h a agonistas específicos de los ER. Los niveles de miRNA se determinaron por qRT-PCR, utilizando sondas para miR-30b-5p, miR-4710, miR-1244, miR-487a-5p, miR-501-3p, miR-378h, y RNU48 como control endógeno.

## **RESULTADOS**

Los cambios inducidos por E2 en HUVEC sugieren un papel predominante de los ER $\alpha$  en la regulación de miR-30b-5p, miR-487a-5p, miR-378h y miR-1244. El aumento de miR-501-3p inducido por E2 parece estar mediado por ER $\beta$  y el aumento de expresión de miR-4710 por GPER. Los resultados obtenidos con los agonistas de los ER en la modulación de miR-30b-5p, miR-378h, miR-487a-5p y miR-4710 coinciden con los de los antagonistas, pero no ocurrió lo mismo para miR-501-3p, que no varió ante los agonistas, y para miR-1244, que disminuyó con todos ellos.

## **DISCUSIÓN**

Las respuestas fisiológicas a los estrógenos requieren un equilibrio entre la actividad de los diferentes ER, si bien, sus efectos beneficiosos a nivel cardiovascular están atribuidos principalmente al ER $\alpha$ . Nuestros resultados indican que la regulación de los miRNA seleccionados se produce a través de los ER, en gran parte por ER $\alpha$  aunque ER $\beta$  y GPER también están implicados. El estudio de la regulación de los miRNA por E2 aporta nuevos retos a la fisiología vascular.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Vidal-Gómez X, Pérez-Cremades D, Mompeón A, Dantas AP, Novella S, Hermenegildo C. MicroRNA as Crucial Regulators of Gene Expression in Estradiol-Treated Human Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018 Mar 1;45(5):1878–92.

# THE MIDBRAIN RED NUCLEUS: ANATOMICAL CHARACTERIZATION OF A NEW EXCITATORY SUBPOPULATION

*De Vicente-Donderis A, Fidelin K, Arber S.*

*Biozentrum of the University of Basel. Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research.*

## INTRODUCCIÓN

The **brainstem** provides an essential bridge between higher brain centers and the spinal cord and is involved in the regulation of many forms of movement. Despite its importance, we still lack deep understanding of how specific subpopulations and their circuitry contribute to modulate motor function. Here we focus on one of its main motor nuclei: the midbrain **Red Nucleus**. Classical studies have primarily focused on its magnocellular region because these neurons project directly to the spinal cord and are implicated in skilled forelimb movements. Whether other populations target specific motor areas outside the spinal cord remained unknown. Recent research in the group has detected new excitatory projections to the Medullary Reticular Formation Ventral Part (MdV), at the level of the Medulla, which is also involved in skilled forelimb motor tasks. This suggests that the Red Nucleus may control forelimb movements in a way much more precise than previously hypothesized. However, a map of the different excitatory subpopulations of the Red Nucleus according to their projection profiles is currently missing. How is the excitatory Red Nucleus functionally organized? This work will answer the question whether this new subpopulation shares an anatomical location with the spinal cord projecting one or corresponds to a specific cluster within the Red Nucleus.

## MATERIAL Y MÉTODOS

To map the location of projection-specific populations within the red nucleus, we used a retrograde viral tracing approach with glycoprotein-deleted rabies expressing RFP. The deletion of the glycoprotein unables the virus to jump from one neuron to another, thus producing fluorescence in the one originally infected. All mice used in this study were analyzed by immunohistochemistry. For low-resolution overview imaging, slides were scanned using an AxioScan light microscope and for higher resolution we used a custom-made spinning disk microscope. For soma detection and measurement of size and position we used the software CellProfiler. To determine differences in the pattern of dendritic arborization the NeuroLucida software was used for single neuron reconstruction and the statistical analysis and density map representation was performed using Matlab.

## RESULTADOS

Imaging of midbrain sections at the level of the caudal Red Nucleus revealed that MdV projecting cells are primarily located outside the magnocellular domain of the Red Nucleus while spinal cord projecting cells are primarily located within the magnocellular domain, with a small area of overlap between both populations. Single neuron reconstructions showed that MdV projecting neurons are smaller and have longer dendrites while spinal cord projecting neurons are larger and have shorter dendrites.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Taken together, our data show that the RN is spatially and functionally configured into different neural subpopulations, being spinal cord projecting neurons located in the magnocellular region and the MdV projecting ones in the parvicellular. Future studies should address the organization of the inhibitory RN and define the inputs of each subpopulation and their specific contribution to the regulation of motor behaviors.

## BIBLIOGRAFÍA

Esposito MS, Capelli P, Arber S. Brainstem nucleus MdV mediates skilled forelimb motor tasks, *Nature*. 2014; 508(7496): 351.

# EFECTO DEL INHIBIDOR DE LA CALMODULINA CINASA II, KN93, SOBRE LAS MODIFICACIONES DE LA REFRACTARIEDAD MIOCÁRDICA VENTRICULAR, DEBIDAS AL ESTIRAMIENTO LOCAL

*Lafuente B, Genovés P, Arias O, Calvo C\*, Cardells MJ\*.*

*Universitat Politècnica de València, \*Universitat de València*

## INTRODUCCIÓN

El estiramiento del ventrículo ocurre durante procesos fisiopatológicos como la insuficiencia cardiaca congestiva y puede desencadenar fosforilación anómala del receptor de rianodina (RyR2), producido por una activación de la calmodulina quinasa II<sup>1</sup>. Esto implica una fuga diastólica de Ca<sup>2+</sup> mediada por RyR2, y puede desencadenar arritmias letales<sup>2,3</sup>. Hemos investigado los efectos de un inhibidor de la CaMKII, el KN93, sobre las modificaciones de la refractariedad miocárdica ventricular durante la fibrilación ventricular, debidas al estiramiento local, en un modelo de corazón de conejo aislado y perfundido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

16 conejos macho Nueva Zelanda (grupo control n=10 y grupo KN93 n=6) fueron heparinizados y sacrificados con tiopental sódico, los corazones extraídos, y ubicados en un sistema de soporte metabólico tipo Langendorff para su perfusión a temperatura controlada (37°C). Tras un periodo de estabilización se dispusieron electrodos de estimulación y de registro sobre el ventrículo (placa con 120 electrodos monopolares). Se estimuló con un estimulador Grass S88 y los registros se obtuvieron empleando un sistema de mapeo de la actividad eléctrica cardiaca (MapTech). Con un estirador ad hoc se realizó un estiramiento local en el ventrículo izquierdo. Se provocó fibrilación ventricular (FV), sin interrumpir la perfusión coronaria, mediante estimulación ventricular a frecuencia progresivamente creciente. Este modelo nos permite el análisis de la arritmia y extraer información sobre propiedades electrofisiológicas como es el periodo refractario funcional. Para la estimación del periodo refractario funcional, se determinó el percentil 5 de los ciclos fibrilatorios habidos en un periodo de dos segundos, tras el marcado de los trazados fibrilatorios en todos y cada uno de los registros obtenidos con los 120 electrodos. Las medidas fueron tomadas, tanto en el grupo control como en el tratado con KN93, previamente al estiramiento, tres minutos tras iniciar el estiramiento y tres minutos tras su cese. Se realizó un test ANOVA de dos factores repetidas en un factor. Se aceptaron las diferencias como significativas cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

En la tabla se exponen los valores medios y la desviación estándar del percentil 5 de los intervalos fibrilatorios correspondientes al grupo control y al tratado con KN93, previamente al estiramiento, a los tres minutos de estiramiento y tras su cese. \*  $p < 0,05$  vs estiramiento; ¶  $< 0,05$  vs control. Número de experimentos entre paréntesis. Valores en milisegundos.

	Pre estiramiento	3' de estiramiento	3' post estiramiento
Control (10)	52± 10	38±4*	54± 8
KN93 (6)	42 ± 12	40±11	42± 8¶

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

A la vista de los resultados, la administración de KN93, 10nM, previene el acortamiento de la refractariedad miocárdica ventricular intrínseca producida por el estiramiento regional agudo. La inhibición del acortamiento de la refractariedad por el estiramiento la interpretamos como un efecto potencialmente beneficioso en lo que respecta a la posible instauración de arritmias reentrantes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, Wang Q, De Almeida AC, Skapura DG, Anderson ME, Bers DM, Wehrens XH. Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation*. 2010; 122(25): 2669-79.
2. Tzimas, C., Terrovitis, J., Lehnart, S., Kranias, E. and Sanoudou, D. CaMKII inhibition ameliorates arrhythmias elicited by junctin ablation under stress conditions. *Heart Rhythm*. 2015; 12 (7):1599-1610.
3. George CH, Jundi H, Thomas NL, Fry DL, Lai FA. Ryanodine receptors and ventricular arrhythmias: emerging trends in mutations, mechanisms and therapies. *Journal of molecular and cellular cardiology (JMCC)*. 2007; 42(1):34-50.

## DINÁMICA POBLACIONAL Y EVOLUCIÓN TEMPORAL DEL PATÓGENO STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILIN RESISTENTES EN UN HOSPITAL VALENCIANO

Revert S. (1), García-González N. (1), Ruiz-Hueso P. (1), Sánchez A. (1), Vilanova R. (1), Campo I. (1), Tormo N. (2), Salvador C. (2), Gimeno C. (2), González-Candelas F. (1,3).

(1) FISABIO-CSISP / Univ. Valencia. Unidad Mixta Infección y Salud Pública, Valencia. (2) Hospital General Universitario de Valencia, Valencia. (3) CIBER en Epidemiología y Salud Pública, Valencia.

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) es uno de los patógenos bacterianos más preocupantes en el ámbito clínico. Es el mayor causante de infecciones producidas dentro de los hospitales (nosocomiales). Además de su alta prevalencia, está relacionado con una tasa muy elevada de mortalidad. Esto se debe a que portan un gen que les confiere resistencia a metilicina, eliminando la posibilidad de tratar a los pacientes con el antibiótico de elección para estas infecciones. Esto complica mucho la elección de un tratamiento eficaz. Es por ello que conocer la dinámica poblacional de este patógeno en los hospitales y la naturaleza de la resistencia que portan, cobra gran importancia ya que nos va a permitir elegir tratamientos eficaces además de prevenir y controlar su diseminación dentro del ámbito sanitario. Es en este punto donde, desde la fundación FISABIO-UV, se utilizan potentes herramientas de estudio epidemiológico y tipado para tratar de abordar de la mejor manera posible este problema.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder estudiar la dinámica poblacional de MRSA en el Hospital General Universitario de Valencia (HGUUV), se recolectaron 196 aislados a lo largo de 6 años, entre 2013 y 2018. Con el fin de identificar las cepas presentes en el hospital, se realizó, mediante PCR, la caracterización y tipado de cada aislado utilizando



dos esquemas de tipado diferentes. El primero, llamado Multi Locus Sequence Typing o MLST, se basa en la secuenciación de fragmentos internos de 7 genes housekeeping, regiones altamente conservadas, que permiten conocer aquellos aislados que están relacionados entre sí, normalmente denominados clones o cepas de un mismo ST. El segundo, tipado del gen Spa, se basa en la secuenciación de un gen muy variable y que, por tanto, nos va a aportar un grado muy alto de diferenciación dentro de cada ST. Finalmente para conocer la naturaleza de la resistencia a meticilina, se analizó el cassette cromosómico SCCmec, portador del gen de resistencia mec. De esta manera, la resolución para identificar y definir variantes epidemiológicamente relevantes de las cepas es muy alta.

## **RESULTADOS**

Los clones más abundantes a lo largo de los 6 años en el Hospital General Universitario de Valencia (HGU) han sido el ST125, ST8, ST2628, ST5 y ST22. No obstante, la dinámica poblacional ha ido cambiando a lo largo del tiempo. Mientras que las proporciones de los ST125, ST8 o ST5 se han mantenido estables a lo largo del tiempo, la proporción de otros STs, como el ST22 o ST146, ha fluctuado. Incluso se ha visto la aparición y desaparición de varios STs (ST1014, ST1181), lo que podría indicar la existencia de un posible brote. Además, a partir de 2016 se observa un incremento en la diversidad de STs diferentes, posiblemente procedentes de la comunidad.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

La fluctuación en la distribución de STs en el Hospital General Universitario de Valencia a lo largo de estos 6 años indica que la población de MRSA es cambiante pese a que ciertos STs se mantienen. Por ello, es necesario implantar una vigilancia continua de este patógeno con el fin de controlar la dispersión de los STs habituales y la colonización por nuevos STs. Una buena medida a implementar sería establecer un sistema de vigilancia epidemiológica en el trabajo rutinario dentro del hospital para así poder ofrecer un tratamiento personalizado en función de cada variante y el gen de resistencia que porten.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Cassini A, Plachouras D, Monnet DL. Attributable deaths caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in France. *The Lancet Infectious Diseases* 2019;19:129–30.  
doi:10.1016/s1473-3099(19)30004-0.
- Lakhundi, S., & Zhang, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, 2018;31:4-e00020-18.  
doi:10.1128/CMR.00020-18
- Enright, M C et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 2000;38,3:1008-15.

# ROLE OF SUCNR1 IN FISTULA DEVELOPMENT

*Lluís Lis-Lopez<sup>1</sup>, Cristina Bauset<sup>1</sup>, Dolores Ortiz-Masia<sup>2</sup>, Laura Gisbert-Ferrandiz<sup>1</sup>, Sandra Coll<sup>1</sup>, Celine Mamie<sup>3</sup>, Michael Scharl<sup>3</sup>, Sara Calatayud<sup>1</sup>, Maria Dolores Barrachina<sup>1</sup>, Jesús Cosín-Roger<sup>4</sup>*

*1.- Department of Pharmacology, University of Valencia, Spain 2.- Department of Medicine, University of Valencia, Spain 3.- Department of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital of Zurich, Switzerland 4.- FISABIO, Hospital Dr. Peset, Valencia, Spain*

## INTRODUCCIÓN

Intestinal fistula is a common complication in CD patients whose etiology is still not well-characterized. It is associated with an exacerbated inflammation and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a process which allows a switch from epithelial towards a fibrotic behavior. We have recently reported that SUCNR1 mediates intestinal inflammation and fibrosis<sup>1</sup> but its role in fistula has not been yet analyzed. Therefore, we aim to analyze the role of SUCNR1 in EMT and in fistula formation.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Intestinal resections were obtained from CD and non-IBD patients. Fistula specimens were identified by the surgeons and collected from B3-CD patients. The expression of SUCNR1 and EMT markers was analyzed by qPCR and the protein expression of SUCNR1 by immunohistochemistry. HT-29 cells were treated with succinate (0,0.1,0.5,1,5 mM) or TGF- $\beta$  (5 ng/ml) during 48 hours and transfected with SUCNR1 siRNA. Expression of EMT markers was analyzed by qPCR and Western Blot. Intestinal fibrosis was induced in vivo using the heterotopic transplant model in WT and SUCNR1<sup>-/-</sup> mice and expression of EMT markers was analyzed by qPCR and by confocal microscopy. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. Correlations were analyzed with the Spearman's coefficient.

## RESULTADOS

In intestinal resections from B3-CD patients, SUCNR1 mRNA expression was significantly increased when compared with B2-CD or non-IBD controls and it correlates positively with Snail1 and Snail2 and negatively with E-Cadherin. In the fistula tract, SUCNR1 is expressed in intestinal epithelial cells and lamina propria cells of the submucosa with a higher intensity in cells close to the fistula tract than in more distant areas. Succinate activates EMT in HT-29 cells due to a significant increase in Vimentin, Snail1 and Snail2 expression and a reduction in E-Cadherin expression in a dose response manner. This effect was completely abolished when SUCNR1 was transiently knocked-down. WT-grafts 7 days after surgery exhibited: a) an increase in gene and protein expression of SUCNR1, b) an activated EMT due to an increase in the expression of Vimentin, Snail1 and Snail2 and a significant reduction in E-Cadherin compared with WT-grafts at day 0. Of interest, KO-grafts at day 7 failed to activate EMT and no changes were observed in the expression of Vimentin, Snail1, Snail2 nor E-Cadherin.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

SUCNR1 is increased specifically in the fistula tract of B3-CD patients. It mediates EMT in intestinal epithelial cells and in murine model of fibrosis. Hence, SUCNR1 might be a potential pharmacological target for fistula treatment.

## BIBLIOGRAFÍA

1.- Mucosal Immunol. 2019 Jan;12(1):178-187.

# PREVALENCIA DE PATOLOGÍA NEOPLÁSICA ASOCIADA A LA COLITIS ULCEROSA

Pérez AA<sup>1</sup>, Gómez C<sup>2</sup>, Martí-Aguado D<sup>2</sup>, Capilla M<sup>2</sup>, Ballester MP<sup>2</sup>, Mínguez M<sup>1,2</sup>.

1. Facultat de Medicina. Universitat de València. 2. Hospital Clínico Universitario de València.

## INTRODUCCIÓN

La Colitis Ulcerosa (CU) presenta un riesgo aumentado de cáncer colorrectal (CCR) y extracolónico (CE). El objetivo principal de este estudio es determinar la prevalencia de cáncer en los pacientes con CU controlados por el Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Clínico de València.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio observacional retrospectivo en el que se han incluido todos los sujetos mayores de edad diagnosticados de CU recogidos de manera prospectiva en la base de datos ENEIDA de la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal desde julio 1965 hasta septiembre 2019. Se definieron las neoplasias según la clasificación CIE-10, no considerando la displasia como cáncer. Únicamente se incluyeron los casos de cáncer diagnosticados tras el diagnóstico de CU. Se llevó a cabo un análisis descriptivo de la frecuencia y el tipo de cáncer, así como un análisis de supervivencia Kaplan Meier considerando tiempo hasta evento (fecha del cáncer) o censura (fecha final del estudio o muerte).

## RESULTADOS

Se incluyeron 805 pacientes (46% mujeres, 52% pancolitis) con una edad al diagnóstico de la CU y un tiempo de seguimiento medio de 39 y 13 años, respectivamente. La prevalencia de cáncer fue un 6% (n=48). De éstos, el 5.3% (n=43) presentaron un CE y el 1,1% (n=16) desarrolló CCR, con una mediana de tiempo de evolución de la enfermedad hasta el cáncer de 13 y 9 años, respectivamente (p<0,001). Cabe destacar que el 44% de los pacientes con CCR (n=4) presentaron además un cáncer extracolónico, y que 7 pacientes desarrollaron dos CE. Por otra parte, el análisis de Kaplan Meier muestra que la probabilidad acumulada de aparición de cáncer tras 20 años de seguimiento es del 10% en cáncer total, 8% en CE y 2% en el CCR.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La prevalencia de cáncer, tanto intestinal como extraintestinal, en nuestra cohorte de pacientes con CU (6%) es ligeramente superior a lo reflejado en la literatura médica, principalmente a expensas de cáncer de piel no melanoma (prevalencia 2,1%). La probabilidad acumulada de aparición de cáncer tras 20 años de evolución de la enfermedad es del 10%, presentándose más tempranamente el CCR con respecto al CE.

## BIBLIOGRAFÍA

- Annese V, Beaugerie L, Egan L, Biancone L, Bolling C, Brandts C, et al. European Evidence-based Consensus: Inflammatory Bowel Disease and Malignancies. *J Crohns Colitis*. 2015;9(11):945-65.
- Chaparro M, Ramas M, Benítez JM, López-García A, Juan A, Guardiola J, et al. Extracolonic Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Data from the GETECCU Eneida Registry. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(7):1135-43.
- Scharl S, Barthel C, Rossel J-B, Biedermann L, Misselwitz B, Schoepfer AM, et al. Malignancies in Inflammatory Bowel Disease: Frequency, Incidence and Risk Factors—Results from the Swiss IBD Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(1):116-126.

# INHIBITION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* DAR1907 THROUGH THE USE OF siRNA

Cárcamo Calvo R

Universitat de València

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus epidermidis* is a common microflora of human body, found ubiquitously on human skin and mucous membranes. However, has emerged as an important pathogen causing nosocomial infections through the contamination of indwelling medical devices. Due to antibiotic resistance, these infections usually require extraction of contaminated devices as a last resort (1). The gene silencing effect may be a promising approach to the emergence of MRMOs but hasn't been deeply studied in bacteria.

The principal aims of this study are:

- Determine the inhibition effect of synthetic siRNA in vitro against aminoglycosides resistance genes in *S. epidermidis* DAR1907.
- Determine the optimal concentration of siRNA, the most appropriate method of incubation, time of exposure of bacteria with siRNA and durability of siRNA-induced effect in the cell.

## MATERIAL Y MÉTODOS

*S. epidermidis* DAR1907 genome was analyzed using The Comprehensive Resistance Data (2) in search for antibiotic resistance genes. Among different drug resistance genes, AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia against aminoglycoside antibiotics was chosen to be studied in this paper, and gentamicin sulfate was selected among aminoglycosides. MIC protocol was undertaken to assess the degree of the inhibition of growth. Those results were compared with another MIC were the siRNA was added under different conditions to see its potential knocking out the resistance gene. Correspondingly, a persistence test was carried out to measure the loss of the siRNA effect over time. Differences between groups were examined for statistical significance using an unpaired t-test using R 3.6.0 (3). A P-value of <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTADOS

Minimum inhibitory concentration determinations of this study showed that siRNAs significantly inhibited the antibiotic resistance, reducing MIC from 64 mg of gentamicin per mL to 32 and even lower concentrations. The effect of siRNA was also significant in disk diffusion tests, nevertheless, the siRNA has a very short half-life inside the cell, so its effect is not very lengthy.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

This study has shown that siRNA can reduce the MIC of gentamicin from 64 to 32 mg/L, and even getting inhibition of growth percentages of 75% at 16 mg/L and 61% at 8 mg/L. Addition of siRNA after overnight growth can achieved the most effective inhibition even at lower concentrations of siRNA. Finally, the second major finding was a saturation of siRNA concentration at 30nM, showing no further inhibition above that concentration, and siRNA degradation rate was estimated, lasting less than 8 days inside the cell. Further researches studied the use of siRNA against drug-resistance microbes and reported the possibility to overcome antibiotic resistance by an innovative therapeutic strategy of combining RNAi against drug-resistance enables and antimicrobial nanomaterials such as Silver nanoparticles-quercetin (4). Thereby, further work should include stabilization and specific delivery in vivo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hogan S, Stevens N, Humphreys H, O'Gara J, O'Neill E. Current and Future Approaches to the Prevention and Treatment of Staphylococcal Medical Device-Related Infections. *Current Pharmaceutical Design*. 2014;21(1):100-113.
2. Alcock B. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2020 [cited 17 January 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31665441>
3. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. (2013).
4. Sun D, Zhang W, Li N, Zhao Z, Mou Z, Yang E et al. Silver nanoparticles-querctetin conjugation to siRNA against drug-resistant *Bacillus subtilis* for effective gene silencing: in vitro and in vivo. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;63:522-534.

## PÓSTERES QUE NO ENTRAN A CONCURSO.

### **IDENTIFICACIÓN DE MIRNA SENSIBLES A 17 $\beta$ -ESTRADIOL EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS**

*Martínez-Alarcón N., Paes A.B., Pérez-Cremades D., Vidal-Gómez X., Novella S., Hermenegildo C.*

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València e Instituto de Investigación Biomédica INCLIVA, Valencia.*

#### **INTRODUCCIÓN**

Estudios epidemiológicos indican la existencia de diferencias de sexo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Una posible causa es el efecto que las hormonas sexuales tienen a nivel vascular. De hecho, el endotelio vascular es una diana importante de los estrógenos y tiene un papel fundamental en la fisiología vascular. Los microRNA (miRNA), pequeños RNA no codificantes, modulan la expresión postranscripcional de numerosos genes implicados en una amplia gama de procesos biológicos (1). El objetivo de este estudio es determinar las principales rutas cardiovasculares modificadas por miRNA sensibles al estradiol en células endoteliales humanas.

#### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Los cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron por digestión con colagenasa (0.1 mg/mL) de venas de cordones umbilicales procedentes del Hospital Clínico de Valencia. Los cultivos se mantuvieron en Medio 199 suplementado con suero bovino fetal (20%), factor de crecimiento de células endoteliales y heparina sódica a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Para evitar cualquier tipo de actividad esteroidea inespecífica, el medio de cultivo fue cambiado a Medio 199 libre de rojo fenol y suplementado con suero bovino fetal previamente tratado con dextrano-carbón 24 horas antes de la exposición a E2. Las HUVEC se trataron con concentraciones fisiológicas de 17 $\beta$ -estradiol (E2, 1 nmol/L) durante 24 horas. La extracción de RNA total se realizó mediante el tratamiento con QIAzol y el miRNeasy Mini kit de Qiagen. Para determinar la expresión global de los miRNA en HUVEC se utilizó GeneChip miRNA 4.0 Array (Affymetrix). Las interacciones de miRNA-gen se predijeron computacionalmente mediante el software 'Ingenuity Pathways Analysis' (IPA) y los cambios en los niveles de miRNA se validaron mediante qRT-PCR.

## RESULTADOS

La expresión de las células endoteliales expuestas a E2 modificó significativamente la expresión de 114 miRNA. De éstos, 70 miRNA estaban sobre expresados y 44 infra expresados. Las principales rutas reguladas por los miRNA dependientes de E2 eran la de muerte y supervivencia celular, metabolismo de los lípidos, desarrollo del sistema reproductor, y varias rutas relacionadas con el sistema cardiovascular. El análisis bioinformático también reveló la importancia de estos miRNA en varias vías canónicas fundamentales para la función endotelial, incluida la señalización ERK / MAPK, señalización de integrina y señalización de citoesqueleto de actina, entre otras. Los cambios en la expresión de los miRNA que más aumentaban (miR-30b-5p, miR-487a-5p, miR-4710, miR-501-3p) y que más disminuían (miR-378h y miR-1244) fueron validados mediante qRT-PCR.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Este estudio identifica cambios mediados por concentraciones fisiológicas de estradiol en el perfil de expresión de los miRNA en células endoteliales humanas, y supone un importante punto de partida para el estudio de la regulación de diferentes procesos fisiológicos mediados por estrógenos e implicados en la función vascular.

## BIBLIOGRAFÍA

Vidal-Gómez X, Pérez-Cremades D, Mompeón A, Dantas AP, Novella S, Hermenegildo C. MicroRNA as Crucial Regulators of Gene Expression in Estradiol-Treated Human Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(5):1878–92.

# USO DE LA ELECTROPORACIÓN EN ÚTERO COMO ESTRATEGIA PARA EL ESTUDIO DE LA ZONA SUBVENTRICULAR POSTNATAL

*Esmeralda García-Legarda<sup>1</sup>, Isabel Mateos-White<sup>1</sup>, Jaime Fabra-Beser<sup>1</sup> y Cristina Gil-Sanz<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Universitat de València*

## INTRODUCCIÓN

En el cerebro de los mamíferos adultos, la neurogénesis se restringe a dos áreas: la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo<sup>1</sup>. Concretamente en la SVZ se encuentran células madre neurales (NSCs) capaces de generar postnatalmente nuevas neuronas que migran largas distancias a través de la vía migratoria rostral hasta llegar al bulbo olfatorio<sup>2</sup>.

Estas NSCs postnatales se especifican tempranamente<sup>3</sup> durante las edades embrionarias, permaneciendo inactivas durante largos períodos de tiempo hasta su reactivación postnatal. Debido a esta especificación temprana podemos marcarlas desde edades embrionarias y, mediante diferentes estrategias, podemos visualizarlas y analizar su morfología de manera fina, realizar estudios de trazado de linaje o experimentos funcionales perturbando la expresión de genes de interés, etc.

Una de las técnicas utilizadas para poder marcar y/o perturbar dichas NSCs es la conocida como electroporación en útero, la cual permite la transferencia de DNA a nivel somático durante los estadios embrionarios correspondientes, para su posterior expresión específica en las NSCs.

En el presente trabajo mostramos algunos enfoques del uso de esta técnica para 1) realizar el rastreo de linaje de NSCs de la SVZ y estudiar posibles cambios en su activación a lo largo del desarrollo postnatal y 2) estudiar el papel de genes relacionados con adhesión celular en la división y especificación de las NSCs de la SVZ.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para ambos estudios electroporamos plásmidos expresando Cre-recombinasa bajo el promotor de interés en embriones de 15-16 días. En el caso de los experimentos de trazado de linaje utilizamos el ratón reportero de Cre Ai9 en el cual un cassette de Stop impide la expresión de la proteína fluorescente tdTomato. En el caso del estudio del papel de los genes relacionados con adhesión celular en la división y especificación de las NSCs de la SVZ, utilizamos ratones floxeados para dos proteínas de adhesión celular: Cdh2 y Afadina4, con el fin de poder inactivar en mosaico la expresión de dichas proteínas en estas células. En ambos casos, analizamos los cerebros a diferentes edades postnatales tras su procesamiento histológico y mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas y microscopía confocal.

## **RESULTADOS**

Experimentos preliminares muestran cómo la técnica de la electroporación en útero permite marcar y seguir el linaje de las NSCs de la SVZ, comparar su comportamiento proliferativo en diferentes momentos postnatales, así como caracterizar con detalle a nivel morfológico las diferentes subpoblaciones marcadas. Así mismo, nuestros experimentos de inactivación en mosaico en los ratones floxeados para Cdh2 sugieren la posible existencia de alteraciones en el comportamiento proliferativo de las NSCs de la SVZ en comparación con sus respectivos controles.

## **DISCUSIÓN / CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos durante esta investigación ayudarán a aportar luz a un proceso que en la actualidad todavía permanece elusivo y se refiere a la posible existencia de diferencias en la dinámica de activación de las NSCs postnatales de la SVZ desde el nacimiento hasta que el animal se convierte en adulto. Del mismo modo, nos permitirá conocer si las proteínas de adhesión celular aquí mencionadas participan en dicho proceso mediante cambios en su actividad proliferativa.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Gage, F. H. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22, 612–613 (2002).
2. Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145–1148 (1994).
3. Fuentealba, L. C. et al. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161, 1644–1655 (2015).
4. Gil-Sanz, C., Landeira, B., Ramos, C., Costa, M. R. & Müller, U. Proliferative defects and formation of a double cortex in mice lacking *mltt4* and *cdh2* in the dorsal telencephalon. *J Neurosci* 34, 10475–10487 (2014).

# PAPEL DE *tet3* EN GLIOBLASTOMA

*Galbis-Gramage N, Lozano-Ureña A, Janssen L, Fernández-Ballester M, Ferrón SR*

*Departamento de Biología Celular, ERI Biotecmed, Universitat de València*

## INTRODUCCIÓN

En diferentes tipos de cáncer se han descrito una gran cantidad de alteraciones genéticas y epigenéticas. La impronta genómica, proceso epigenético dependiente de metilación que causa la expresión diferencial de los genes dependiendo del origen parental de los alelos, se ve alterada en muchos tumores (1), entre ellos el glioblastoma (GBM). Las enzimas TET (Ten-eleven translocation) son un grupo de dioxigenasas que se encargan de convertir 5-metilcitosinas (5mC) en 5-hidroximetilcitosinas (5hmC), teniendo por tanto un gran papel en la regulación de la impronta genómica (2). En el presente trabajo se ha estudiado la expresión de genes improntados en líneas celulares murinas de glioblastoma con el objetivo de encontrar genes candidatos que podrían tener un papel en el proceso de transformación tumoral. Dado que la enzima TET3 disminuye su expresión en glioblastoma, se ha sobreexpresado en estas células y se han estudiado los cambios en los niveles de expresión de genes improntados y de marcadores tumorales tras la sobreexpresión de la enzima. Además, se ha determinado la capacidad proliferativa de las células de glioblastoma modificadas y su capacidad de formación de tumores.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo hemos utilizado las siguientes células murinas: NSCs; GBM-EgfrWT, creadas a partir de la sobreexpresión del gen *Egfr* en NSCs deficientes en p16/p19; GBM-EgfrVIII, creadas a partir de la sobreexpresión de una forma mutada del gen *Egfr* en células madre neurales (NSCs) adultas deficientes en p16/p19; GBM-OE TET3, células GBM-EgfrWT transfectadas con un plásmido conteniendo el gen TET3 para su sobreexpresión; GBM-EV, células GBM-EgfrWT transfectadas con un vector vacío. A partir de las NSCs, células GBM-EgfrWT y GBM-EgfrVIII se obtuvo cDNA, utilizado para estudiar la expresión de diversos genes mediante PCR cuantitativa (qPCR). Posteriormente, se procedió a la transfección de las células GBM-EgfrWT, obteniendo las células GBM-OE TET3 y GBM-EV, con las que se realizaron análisis de expresión génica mediante qPCR e inmunocitoquímica. A continuación, se realizaron ensayos de formación de tumoresferas y se estudió el ciclo celular en las células GBM-OE-TET3 y GBM-EV. Por último, y con el fin de estudiar el efecto de TET3 en la capacidad tumorigénica de las células, éstas se inyectaron en ratones inmunodeprimidos *nude*.

## RESULTADOS

En este trabajo se muestran diferencias en cuanto a la expresión de diversos genes improntados al comparar las líneas celulares GMB-EgfrWT y GBM-EgfrVIII con las NSCs de origen, demostrando el papel de la desregulación de la impronta genómica en la adquisición de la capacidad tumorigénica de las células. También se muestran diferencias en la expresión de algunos genes improntados al sobreexpresar TET3. Además, se observa una marcada disminución en la expresión de marcadores tumorales producida por la sobreexpresión de TET3. Por otra parte, la sobreexpresión de TET3 produce cambios en cuanto a la capacidad proliferativa de las células de glioblastoma, así como una drástica disminución de su capacidad tumorigénica tras su trasplante.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La desregulación de la impronta genómica, ya sea por pérdida de impronta o por cambios de expresión de genes improntados, se considera uno de los principales mecanismos que pueden conducir a la formación de tumores (1). En este sentido, nuestro estudio muestra diferencias entre células de glioblastoma y NSCs en



cuanto a la expresión de varios genes improntados, así como una disminución de las características tumorales de estas células al sobreexpresar TET3. Por otra parte, *Egfr* es uno de los genes principalmente sobreexpresado en glioblastoma (3), y en nuestro estudio, la sobreexpresión de TET3 muestra una disminución de este marcador. Estos resultados ofrecen la posibilidad de considerar a ciertos genes improntados, así como a TET3, como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento del glioblastoma.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer, *J Pathol*. 2007; 211:261-268.
2. Montalbán-Loro R, Lozano-Ureña A, Ito M, Reik W, Ferguson-Smith AC, Ferrón SR. TET3 prevents terminal differentiation of adult NSCs by a non-catalytic action at *Snrpn*, *Nat Commun*. 2019; 10(1):1-14.
3. Saadeh FS, Mahfouz R, Assi HI. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas, *Int J Biol Markers*. 2018; 33:22-32.

# CARACTERIZACIÓN DE LA IMPRONTA GENÓMICA DURANTE LA INDUCCIÓN DE TUMORES CEREBRALES EN RATÓN

*Fernandez-Ballester M, Lozano-Ureña A, Galbis-Gramage N y Ferrón SR.*

*Departamento de Biología Celular, ERI BiotecMed, Universitat de València.*

## INTRODUCCIÓN

El uso de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y su diferenciación posterior en nuevas células tejido-específicas, está siendo una gran herramienta en el campo de la medicina regenerativa para intentar tratar aquellas enfermedades que implican deterioración y pérdida celular de los distintos tejidos de origen (1). Recientemente se ha comprobado además que las iPSCs poseen la capacidad de generar tumores (teratomas) in vivo (2), por lo tanto, estudiar los mecanismos epigenéticos que subyacen la reprogramación celular es crucial para entender el proceso de transformación tumoral.

En mamíferos la mayoría de genes se expresan tanto por el alelo materno como el paterno. Sin embargo, hay un pequeño grupo de genes denominados “genes improntados” que sólo expresan un alelo estando reprimida la expresión del otro alelo (3). Aberraciones en la expresión de algunos de estos genes se han identificado en reprogramación lo cual sugiere que este proceso epigenético de impronta genómica podría estar directamente implicado en la adquisición del estado de pluripotencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestro trabajo aborda el estudio de la capacidad de las iPSCs de generar tumores en el cerebro de ratones i4F-A reprogramables que poseen un casete policistrónico inducible con doxiciclina y que codifica para los cuatro factores murinos *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*. En estos animales hemos inducido la reprogramación específica en la población de progenitores neurales en la SVZ, dado que la expresión del activador transcripcional (rtTA) se encuentra bajo el promotor del gen que codifica para la proteína fibrilar ácida de la glía (*Gfap*). Por lo tanto, en este modelo murino, solo las células *Gfap*<sup>+</sup> expresarán los cuatro factores de

transcripción y se reprogramarán en presencia de doxiciclina siendo un modelo muy útil para la formación de tumores y como fuente de células malignas in vivo.

## **RESULTADOS**

La caracterización de los tumores cerebrales generados nos ha permitido distinguir que los tumores formados en estos ratones reprogramables son tanto del tipo teratoma como de tipo glioma. El estudio de la expresión de genes improntados nos ha permitido además esclarecer los cambios que han sido necesarios durante el proceso de reprogramación para la formación de dichos tumores.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Hirschi KK, Li S, Roy K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014; 11 (16): 277-94.
2. Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, Cañamero M, Rayon T, Ors I et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature.* 2013; 502 (7471):340-5.
3. Lozano-Ureña A, Montalbán-Loro R, Ferguson-Smith AC, Ferrón SR. Genomic Imprinting and the Regulation of Postnatal Neurogenesis. *Brain Plast.* 2017; 3(1):89-98.