



**XI CONGRESO DE  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

# **LIBRO DE RESÚMENES**

## **CIB2023**

**8, 9 y 10 de febrero de 2023**

**Concurso de Posters y Comunicaciones  
Orales**

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

## COMUNICACIONES ORALES

- Efecto de la música en el glioblastoma. *Anna Sofía Castells Nieto.*
- Papel de FLNa en la organización espacio – temporal de CXCR4 e integrina  $\beta 1$  durante la migración linfocitaria dirigida por CXCL12 y bajo la fuerza del flujo sanguíneo. *Elena Moya Ruiz.*
- PAPEL DE LOS CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR VOLTAJE EN UN MODELO DE HIPERTENSIÓN EN RATA. DIFERENCIAS POR SEXO. *Inmaculada Concepción Escribano Ruipérez.*
- Efectos vasculares del síndrome metabólico en aorta de rata. Diferencias por sexo. *Blanca Romero Llopis.*
- Public stigma profile toward mental disorders across different university degrees in the University of Valencia (Spain). *Marta López Gilberte.*
- La inestabilidad cromosómica como mecanismo de resistencia farmacológica en el adenocarcinoma de pulmón. *Jaime Franco Mansilla.*
- IMPLICACIONES A NIVEL CLÍNICO DE LA BIOIMPEDANCIA EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA. *ALICIA LUCAS CAMPS.*
- Alternativas terapéuticas en cáncer de cabeza y cuello resistente a taxanos. *Laura Molinero Sicilia.*
- CLASIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE CÉLULAS TUMORALES Y ESTROMALES EN ADENOCARCINOMA PULMONAR MEDIANTE IMAGEN DIGITAL. DESARROLLO INICIAL DE ALGORITMOS. *Melania Cebrián Ferreras.*
- Papel del daño cardiaco en la expresión de microRNAs epicárdicos. *Isabel Salvadora García Valencia.*
- Análisis en una población universitaria sobre la percepción de los sabores y su influencia en la alimentación y la salud. *Edurne de la Cámara Sahuquillo.*
- Regulación hormonal de la expresión de miRNA125b-5p en células endoteliales humana. *Cristiana Rosales.*
- Semi-solid dosage form formulation to protect and relieve of from breast cancer radiodermatitis. *Lora Stefanova Dokuzliyska.*

## POSTERS

- COGNITIVE, IMMUNOLOGICAL AND RECEPTOR CHANGES IN A MURINE MODEL OF NMDAR ENCEPHALITIS BY ACTIVE IMMUNIZATION. *Laura Marmolejo Alcaide.*
- Efecto de la hipoxia y senescencia en la regulación de la expresión de miR-30b-5p en fibroblastos murinos. *Andrea Guiu Moneo.*
- Regulación de la expresión de miR-148a-3p en fibroblastos de ratón en condiciones de hipoxia y senescencia. *Mireya Represa Pérez.*
- The paradox polymerase: a review of the potential nuclear role of ZIKV NS5 protein. *Samuel Donaire Carpio.*
- Combinación de terapias CAR-T y Anti PD-1/PD-L1 para el tratamiento de NSCLC. *Natalia Calles Albero.*
- CAR-T therapy in T-ALL cells. *Gina Alhakim.*
- Generación de adhesinas sintéticas biespecíficas en *Escherichia coli* dirigidas contra antígenos tumorales de superficie celular. *Inés Anguiano Vara.*
- IDENTIFYING THE NEURAL CELLULAR TARGETS OF ANDROGEN SIGNALING UNDERLYING MALE REPRODUCTIVE FUNCTION AND BEHAVIOR. *Paula Palacios Sánchez.*
- IDENTIFICACIÓN DE DÉFICITS EN EL RECONOCIMIENTO INDIVIDUAL EN UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. *Melania Cebrián Ferreras.*
- Discovery of de novo cyclic peptides for linear ubiquitin chains using RaPID technology. *Irene Olivas Cano.*
- Intoxicación por biotoxinas marinas bajo un enfoque 'One Health'. *Jáimez Alcántara, Salvador.*
- Potencial antiinflamatorio del género *Harpagophytum*. *Alejandro Bernabeu y Fernando Mialdea.*

# Efecto de la música en el glioblastoma

*Anna Sofía Castells Nieto(1 y 2) y Sergio Casas Tintó(1)*

*(1) Instituto de Salud Carlos III. (2) Universidad Autónoma de Madrid.*

## INTRODUCTION

The glioblastoma (GB) is the most common and aggressive tumor type of glioma according to the World Health Organization (WHO). This tumor originated from neoplastic glial cells and emit membrane protusions called tumor microtubes (TMs) that form a net and guarantees the survival of the tumor (Portela M et al., 2019). Due to the TMs net, surgical resection is not possible and current therapies (RodríguezCamacho, et al., 2022) failed to remove the tumor. For this reason it is necessary to find innovative and creative solutions, such as studying the effect of music on GB.

A study conducted on two groups of musicians who had developed GB over their lifetime, found that the median survival of classically trained musicians was 8 months while that of pop-rock trained musicians was 18 months. They concluded that the music practiced by the artists affected the prognosis of the tumor (Gasenzer, E., et al., 2019).

It is known that a sound wave is a definite form of discontinuous stress (Ackerman, E., 1951), which has a great effect on the growth of bacterias (Bhagat, M.S. et al., 2021). Furthermore, mechanical stress is capable of opening some of the ionic channels present in the lipid membrane<sup>7</sup> and, therefore, affecting the processes of endocytosis and exocytosis altering some of the signaling pathways implicated on GB.

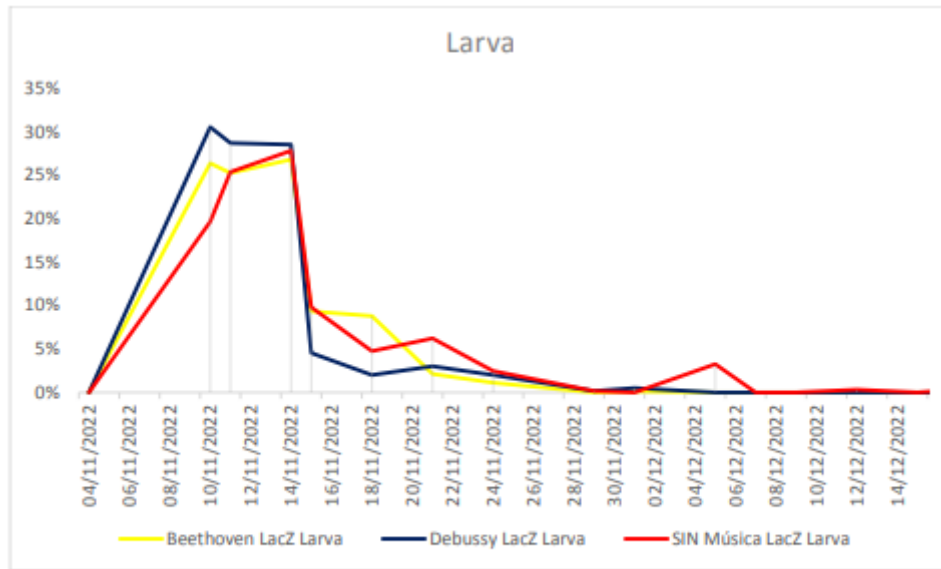
The aim of this project is study how sound waves affects neoplastic glial cell membrane from GB and how can we use sound to modulate the expansion of the TMs net using *Drosophila melanogaster* as a model.

## MATERIALS AND METHODS

- ☐ *Drosophila melanogaster*: UAS-Gal4 system
- ☐ Stereo system: We use an incubator to maintain the temperature conditions in which we will place insulating chambers. Inside each camera we will place two speakers to reproduce the sound in stereo, these speakers will be connected to a computer that will play the musical pieces in a loop.
- ☐ Music programmes: Reaper and Audacity 3.2.1.
- ☐ Music: First Movement Sonata op. 27, no2, C#M, L. v Beethoven played by Valentina Lisitia and First Arabesque from C. Debussy played by Walter Gieseking.
- ☐ Dissection tools: Dissection forceps, license plate, Phosphate Tampon Buffer (PBS), etc
- ☐ Confocal microscopy: Leica microsystems SP5.
- ☐ Image analysis: IMARIS 9.0.3, ImageJ. → Statistics analysis: Microsoft Excel 2013 and GraphPadPrism. T. Student and ANOVA.

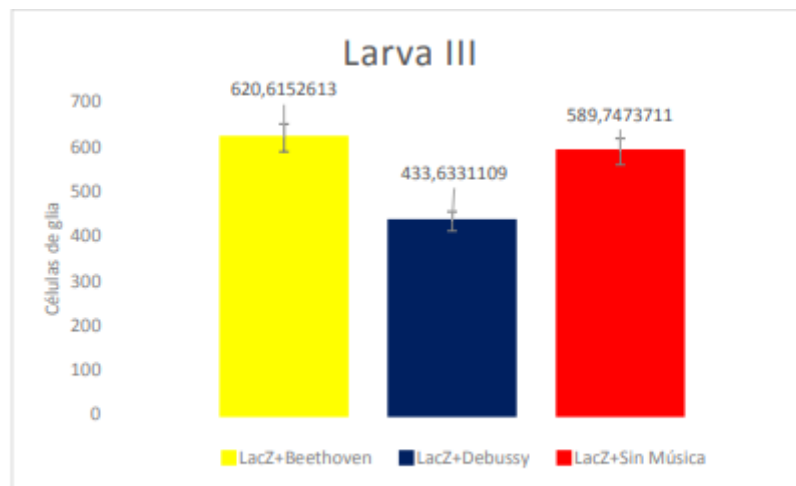
## RESULTS

1. After a viability study, when listening to music (Graphic 1, blue and yellow), the maximum peak of emergence of control stage III larvae is ahead of those that have not listened to music (red) for 5 weeks.



Graphic 1. Percentage of stage III larvae that have emerged over time in each condition experiences.

2. After immunohistolabeling and cuantification, fewer glial cells are observed in the case of control individuals who have listened to Debussy (Graphic 2).



Graphic 2 summarize the quantification of glial cells performed with IMARIS 9.2.1 in photographs taken at 20X by a Leica Microsystems SP5 confocal microscopy.

## DISCUSSION / CONCLUSION

1. Music affects *Drosophila melanogaster* development, like bacterias.
2. Individuals that listen to Arabesque 1 from Debussy develop faster than the ones exposed to the Moonlight sonata and have fewer glial cells.

## BIBLIOGRAPHY

- Ackerman, E. (1951) "Resonances of biological cells at audible frequencies2. Bull. Math. Biophys. 13 (2), 93–106.
- Bhagat, M.S., Mungray, A.K. and Mungray, A.A. (2021) "Effect of sound waves and inclination of membrane on the performance of the osmotic microbial fuel cell," Water-Energy Nexus, 4, pp. 113–122.
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. (2002) "Molecular Biology of the Cell2. Garland Science, New York.

Elena Romana Gasenzer, Ayhan Kanat, Vacide Ozdemir, Sema Yilmaz Rakici & Edmund Neugebauer (2019). "Interesting different survival status of musicians with malignant cerebral tumors". *British Journal of Neurosurgery*, 34(3), pp.264-270.

Portela M, Venkataramani V, Fahey-Lozano N, Seco E, Losada-Perez M, Winkler F, Casas-Tintó S. (2019) "Glioblastoma cells vampirize WNT from neurons and trigger a JNK/MMP signaling loop that enhances glioblastoma progression and neurodegeneration". *PLOS Biology*, 17(12): e3000545.

Rodríguez-Camacho A, Flores-Vázquez JG, Moscardini-Martelli J, Torres-Ríos JA, Olmos-Guzmán A, Ortiz-Arce CS, Cid-Sánchez DR, Pérez SR, Macías-González MDS, Hernández-Sánchez LC, Heredia-Gutiérrez JC, Contreras-Palafox GA, Suárez-Campos JJE, Celis-López MÁ, Gutiérrez-Aceves GA, Moreno-Jiménez S. (2022) "Glioblastoma Treatment: State-of-the-Art and Future Perspectives", *Int. J. Mol. Sci.*, 23(13), 7207.

# Implicaciones a nivel clínico de la bioimpedancia en pacientes con insuficiencia cardíaca

*Lucas Camps A.*

*UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, SERVICIO DE CARIDOLOGÍA DEL HOSPITAL CLÍNICO  
UNIVERSITARIO DE VALENCIA (HCUV) E INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA INCLIVA.*

## INTRODUCCIÓN

La congestión juega un papel crucial en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca (IC), con importantes implicaciones por su elevada prevalencia, morbi-mortalidad y costes sanitarios. Requiere una evaluación multiparamétrica para su detección, pese a la cual todavía se encuentra infradiagnosticada. Se necesitan nuevas herramientas para caracterizarla mejor y más precozmente.

En este contexto, postulamos que parámetros de nuevas técnicas de bioimpedanciometría servirán para mejorar la detección y cuantificación de la sobrecarga hídrica de pacientes con IC. Concretamente, en este estudio postulamos que existe asociación entre éstos y las variables clínicas, bioquímicas y de imagen usadas comúnmente en el abordaje de la congestión.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio observacional prospectivo transversal unicéntrico valoró en 377 pacientes ambulatorios diagnosticados de insuficiencia cardíaca que acudían a revisión a consultas externas de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia parámetros clínicos, analíticos y ecocardiográficos de congestión y evaluó si existía asociación con parámetros de sobrecarga hídrica obtenidos con la bioimpedanciometría. Todas las variables se determinaron el mismo día. El dispositivo de bioimpedancia empleado fue MALTRON BioScan touch i8 – IVF (análisis de bioimpedancia multifrecuencia). Los parámetros de la bioimpedancia evaluados fueron principalmente la relación de fluidos y la relación agua extracelular/intracelular. Para determinar las asociaciones independientes entre los parámetros de bioimpedancia y parámetros de congestión se utilizaron modelos de regresión lineal múltiple.

## RESULTADOS

Los parámetros de bioimpedancia “relación de fluidos” y “relación agua extracelular/intracelular” se asociaron de forma significativa a parámetros clínicos, bioquímicos y de imagen relacionados con la congestión. Concretamente, los predictores independientes de la relación de fluidos fueron la edad, el sexo, DM, EPOC, etiología valvular de la IC, ingresos previos por descompensación, CCS, la frecuencia cardíaca, hemoglobina, lnCA125 y el lnNT – pro - BNP. Para la relación agua extra/intracelular fueron la edad, el sexo, ingresos previos por descompensación, CCS, hemoglobina, lnCA125 e lnNT – pro – BNP.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

De acuerdo con la literatura existente, la bioimpedancia es una técnica sencilla no invasiva que muestra relación con parámetros de sobrecarga hídrica utilizados en práctica clínica, siendo interesante no solo para la detección de congestión, sino también para caracterizar su distribución y fenotipo. Esto podría ser de gran interés para la orientación del tratamiento más adecuado para estos pacientes, contribuyendo a realizar un a medicina de precisión a pie de

cama o, incluso, a “pie de sillón”, sin suponer grandes costes económicos. Por ello consideramos que es una herramienta a incorporar en la evaluación multiparamétrica de la congestión en la práctica diaria de las unidades de insuficiencia cardíaca, disminuyendo las descompensaciones de estos pacientes, con la gran morbi – mortalidad y costes económicos que todo ello conlleva. No obstante, futuros estudios longitudinales prospectivos, multicéntricos, en pacientes tanto hospitalarios como ambulatorios deberán confirmar estos resultados y evaluar la capacidad predictiva adicional a parámetros usados habitualmente, así como su utilidad pronóstica, para monitorizar el tratamiento, etc. para consolidar el cuerpo de la evidencia de esta técnica sencilla, pero con resultados tan prometedores.

## BIBLIOGRAFÍA

Núñez, J., De la Espriella, R., Rossignol, P., Mullens, W., Metra, M., Chioncel, O., ... Bayes – Genis, A. (2022). Congestion in heart failure: a circulating biomarker-based perspective. A review from the Biomarkers Working Group of the Heart Failure Association, European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure*, 24 (10), 1751-1766. <https://doi.org/10.1002/ejhf.2664>

De la Espriella, R., Santas, E., Zegri, I., Górriz, J.L., Cobo, M. y Núñez, J. (2021). Cuantificación y tratamiento de la congestión en insuficiencia cardíaca: una visión clínica y fisiopatológica. *Revista de la sociedad española de nefrología*, 42 (2), 145 – 162. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2021.04.006>

Mayne, K., Shemilt, R., Keane, D., Lees, J., Marck, P. and Herrington, W. (2022). Bioimpedance Indices of Fluid Overload and Cardiorenal Outcomes in Heart Failure and Chronic Kidney Disease: a Systematic Review. *Journal of Cardiac Failure*, 28 (11), 1628 – 1641. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2022.08.005>



# EFECTOS VASCULARES DEL SÍNDROME METABÓLICO EN AORTA DE RATA. DIFERENCIAS POR SEXO.

*Romero-Llopis B, Suárez A, Martín-Grau M, Escribano-Ruipérez I, Guerra-Ojeda S, Marrachelli VG, Serna E, y Mauricio MD.*

*Departament de Fisiologia. Universitat de València.*

## INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) se diagnostica por la presencia de, al menos, tres de los siguientes factores: obesidad abdominal, hipertensión arterial, disglucemia, hipertrigliceridemia y bajos niveles de lipoproteína de alta densidad. Todos estos factores tienen en común la disfunción endotelial. Nuestro objetivo fue caracterizar los efectos sobre la función vascular de una dieta rica en grasa y azúcar para inducir un SM en rata, centrándonos en la disfunción endotelial, la respuesta contráctil adrenérgica y el papel de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) tipo T. También nos planteamos si el SM podría inducir alteraciones vasculares de manera distinta según el sexo del animal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se aislaron segmentos de aorta de 3 mm de longitud procedentes de ratas Sprague-Dawley de 39 semanas de edad, que se dividieron en 4 grupos de estudio, según dieta y sexo: hembras (H-Control, n=8) y machos (M-Control, n=9) alimentados con dieta estándar, y hembras (H-SM, n=8) y machos (M-SM, n=9) alimentados con una dieta alta en grasa y azúcar. En baño de órganos se realizaron mediciones de tensión isométrica en respuesta a la acetilcolina (ACh) ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) y al nitroprusiato sódico (NP) ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M) para determinar la relajación dependiente e independiente de endotelio, respectivamente. Se estudió la respuesta contráctil inespecífica de receptor (KCl 60mM) y específica (fenilefrina, (Phe),  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M), esta última también en presencia de NiCl<sub>2</sub> ( $5 \times 10^{-5}$  M), un bloqueante de los VGCC tipo T. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el programa GraphPad Prism 9 aplicando un ANOVA de 2 vías.

## RESULTADOS

El SM no afectó la relajación a la ACh en hembras, pero sí indujo en machos un desplazamiento significativo hacia la derecha (ACh,  $10^{-7}$  de  $64 \pm 4\%$  para el grupo M-Control y de  $49 \pm 5\%$  en M-SM,  $P=0,0192$ ). Las curvas de NP no se modificaron con el SM en ninguno de los dos sexos. En cuanto a la contracción, el SM no afectó la respuesta vascular en hembras, que respondieron de manera similar al KCl 60 mM y a la Phe. En machos, aunque con el SM se apreció una ligera tendencia a disminuir el efecto del KCl con respecto al grupo M-Control, esta no fue significativa. El SM no modificó la respuesta contráctil inducida por Phe en machos. Por último, la incubación con NiCl<sub>2</sub> ( $5 \times 10^{-5}$  M) desplazó la curva de Phe a la derecha en hembras de ambos grupos, indicando la participación de los VGCC tipo T en la respuesta adrenérgica. Sin embargo, en los machos la incubación con NiCl<sub>2</sub> ( $5 \times 10^{-5}$  M) no tuvo ningún efecto sobre la Phe.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El SM no induce disfunción en aorta de rata hembra, pero sí en macho, sin afectar a la relajación independiente de endotelio en ninguno de los dos sexos. EL SM no afecta la respuesta contráctil inespecífica ni específica en ninguno de los dos sexos. La participación de los VGCC tipo T en la respuesta adrenérgica de hembras es manifiesta, mientras que en machos es inexistente. El SM no modifica este mecanismo.

#### BIBLIOGRAFÍA

Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J.-C., James, W. P. T., Loria, C. M. y Smith, S. C. (2009). International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society, & International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120(16), 1640-1645.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>

Buettner, R., Schölmerich, J., y Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 15(4), 798-808.

<https://doi.org/10.1038/oby.2007.608>

Martin-Grau, M., Marrachelli, V. G., y Monleon, D. (2022). Rodent models and metabolomics in nonalcoholic fatty liver disease: What can we learn? *World Journal of Hepatology*, 14(2), 304-318.

<https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i2.304>

Pucci, G., Alcidi, R., Tap, L., Battista, F., Mattace-Raso, F., y Schillaci, G. (2017). Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: A review of the literature. *Pharmacological Research*, 120, 34-42.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.008>

# REGULACIÓN HORMONAL DE LA EXPRESIÓN DE MIRNA-125B-5P EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS.

*Rosales C.<sup>1</sup>, Descals B.<sup>2</sup>, Guiu-Moneo A.<sup>2</sup>, Represa-Pérez M.<sup>2</sup>, Paes A.B.<sup>2</sup>, Pérez-Cremades D.<sup>1,2</sup>, Hermenegildo C.<sup>1,2</sup>, Novella S.<sup>1,2</sup>*

*Dpto. Fisiología, Universitat de València – Instituto de Investigación Biomédica INCLIVA.*

## INTRODUCCIÓN

Las hormonas sexuales intervienen en la homeostasis vascular lo que, en parte, podría explicar las diferencias de sexo observadas en la incidencia de las enfermedades cardiovasculares, así como en su fisiopatología. Uno de los componentes fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis vascular que es además diana de las hormonas sexuales, es el endotelio vascular, cuya función está también regulada por los microRNAs o miRNAs (RNA pequeños no codificantes de 19-25 nucleótidos de longitud). Sin embargo, se desconoce la acción reguladora de los estrógenos y de los andrógenos mediada por miRNAs en el endotelio. En concreto, nuestro interés se centra en el miR-125b-5p, que se expresa en células endoteliales y participa en numerosos procesos celulares. En este estudio, nos planteamos determinar la influencia del  $17\beta$ -estradiol y de la testosterona en los niveles de expresión del miR-125b-5p y sus genes diana en células endoteliales humanas, apoyado por estudios bioinformáticos de predicción de dianas y enriquecimiento funcional.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las células endoteliales de vena umbilical humana o HUVEC (C2519A; Lonza) se trataron durante 24 h con concentraciones crecientes de  $17\beta$ -estradiol y testosterona (0,1-10 nmol/l, Merck). La expresión del miR-125b-5p y de los mRNAs de sus genes diana (ITGA9, CDH5 y EDN1) se cuantificaron mediante RT-qPCR. Los resultados se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido del contraste de Dunnett. Se comprobó la presencia de sitios de unión a los receptores de estrógenos ER $\alpha$ , ER $\beta$  y al receptor de andrógenos AR en los promotores de los genes huéspedes del miR-125b-5p con la base de datos TransmiR v2.0. Posteriormente, se predijeron los genes diana del miR-125b-5p con los programas de libre acceso TargetScan 8.0, microT-CDS, miRDB y TarBase V.8. Finalmente, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional a partir de las dianas predichas del miR-125b-5p con el software Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

## RESULTADOS

Experimentalmente, los niveles de expresión del miR-125b-5p disminuyen en HUVEC expuestas a  $17\beta$ -estradiol (disminución en un 70%, n=9, p<0,001) y testosterona (disminución en un 50%, n=6, p<0,01). Se determinaron bioinformáticamente 513 genes como potenciales dianas del miR-125b-5p que se estudiaron posteriormente mediante un análisis de enriquecimiento funcional.

Entre las rutas biológicas más representadas, se identificaron dos vías de señalización implicadas en la fisiología cardiovascular, la señalización en la hipertrofia cardíaca y en hipoxia. De los genes diana pertenecientes a estas rutas, se seleccionaron las dianas ITGA9, CDH5 y EDN1 para estudiar una posible regulación de su expresión por acción de las hormonas sexuales mediada por el miR-125b-5p. Así, en HUVEC tratadas con  $17\beta$ -estradiol, los niveles de ITGA9 y CDH5 aumentan (incremento en un 80% y 58%, respectivamente, n=6, p<0,05) en contraposición a la

expresión del miR-125b-5p. Se identificaron in silico sitios de unión para los receptores ER $\alpha$  y AR en las secuencias de los genes huéspedes del miR-125b (MIR100HG y MIR99AHG).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La expresión del miR-125b-5p está regulada por concentraciones fisiológicas de 17 $\beta$ -estradiol y de testosterona y podría estar mediada por los receptores ER $\alpha$  y AR. Además, puede estar implicado en la represión de genes predichos bioinformáticamente relacionados con funciones endoteliales, tales como la CDH5 y la ITGA9.

## FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, e Innovación de España, el Instituto de Salud Carlos III - FEDER-ERDF (PI19/01714; PI22/1083), la Generalitat Valenciana (CIAICO 2021/211; CIGE/2021/158) y las Acciones COST (CA17129: CardioRNA; CA21153 AtheroNET). A. B. P. es investigadora predoctoral del Instituto de Salud Carlos III (FI18/00323). D.P-C. es investigador postdoctoral "Juan de la Cierva – Incorporación" del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (IJC2019-040237-I).

# Análisis en una población universitaria sobre la percepción de los sabores y su influencia en la alimentación y la salud.

*De la Cámara Sahuquillo E, Ortega-Azorín C, Asensio EM, Fernández-Carrión R, Barragán R, Corella D, Sorlí JV.*

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universitat de València. CIBEROBN, ISCIII.*

## INTRODUCCIÓN

La conducta alimentaria depende de una compleja interacción de factores fisiológicos, cognitivos, socioculturales, genéticos y morales. Por otro lado, las respuestas sensoriales al gusto de los alimentos condicionan las preferencias alimentarias y pueden contribuir al estado de salud. El objetivo del presente trabajo es analizar las variaciones existentes en la percepción de los sabores (dulce, salado, amargo, ácido y umami) con perspectiva de género en una población universitaria, y valorar su asociación con parámetros antropométricos y con patrones alimentarios.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio observacional transversal en una muestra de 930 estudiantes de 4 cursos académicos diferentes. Se determinaron medidas antropométricas. Se utilizaron cuestionarios validados con variables sociodemográficas y alimentarias, incluyendo la frecuencia de consumo de alimentos, preferencias alimentarias (escala Likert de 4 categorías), Adherencia a la Dieta Mediterránea (ADM) (de 14 ítems), y una prueba de percepción de los distintos sabores con 5 concentraciones diferentes de sacarosa, NaCl, ácido cítrico, L-ácido glutámico monopotásico (umami) y 6-n-propiltiouracilo (amargo). Se realizaron comparaciones de medias paramétricas y no paramétricas según la distribución. Se calcularon coeficientes de correlación de Pearson o de Spearman. Para los ajustes multivariantes se emplearon modelos de regresión controlando por variables de confusión.

## RESULTADOS

Participaron 646 mujeres y 284 hombres (edad media 20,4 años). La ADM media fue de 8,56(DT 1,93), sin diferencias significativas entre sexos. El sabor preferido fue el dulce, sobre todo, en el grupo femenino( $p<0,001$ ). La percepción de los sabores aumenta con la concentración del sabor y disminuye con la edad ( $p<0,05$ ). Las mujeres tienen una mayor sensibilidad para detectar los sabores (dulce, ácido, umami). A mayor IMC se detectó menor percepción del dulce en mujeres( $p=0,018$ ). A mayor percepción del amargo, las mujeres presentaron menor ADM( $p=0,027$ ). Al analizar la preferencia a grupos de alimentos respecto a la percepción de sabores, las mujeres presentaron mayor preferencia por cereales y legumbres a mayor percepción del dulce ( $p<0,05$ ). Se observó menor preferencia por salazones entre los que perciben con mayor intensidad el sabor salado ( $p=0,003$ ); a mayor intensidad del sabor ácido mayor preferencia por cereales y chocolate ( $p<0,05$ ); a mayor intensidad del umami mayor preferencia por el consumo de pasta en los hombres ( $p=0,014$ ); a mayor intensidad del amargo mayor

preferencia por consumir cereales y azúcar, y menor preferencia por brócoli, coliflor o repollo ( $p < 0,05$ ). Al analizar la preferencia con respecto a la percepción de los sabores, destaca una mayor preferencia por el sabor dulce a mayor percepción del amargo ( $p = 0,006$ ).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Se ha caracterizado el patrón de percepción y preferencias de sabores en población universitaria. La percepción de los sabores está relacionada con la edad, el sexo, la ADM, el IMC o el consumo de ciertos grupos de alimentos, por lo tanto, se confirma que el perfil de percepción a los sabores influye en el patrón alimentario y en fenotipos asociados al estado de salud en población joven.

## BIBLIOGRAFÍA

Barragán R, Coltell O, Portolés O, Asensio EM, Sorlí JV, Ortega-Azorín C, González JI, Sáiz C, Fernández-Carrión R, Ordovas JM, Corella D. (2018). Bitter, sweet, salty, sour and umami taste perception decreases with age: sex-specific analysis, modulation by genetic variants and taste-preference associations in 18 to 80 year-old subjects. *Nutrients*, 10, 1539. doi: 10.3390/nu10101539

Fernández-Carrión R, Sorlí JV, Coltell O, Pascual EC, Ortega-Azorín C, Barragán R, Giménez-Alba IM, Alvarez-Sala A, Fitó M, Ordovas JM, Corella D. (2021). Sweet taste preference: Relationships with other tastes, liking for sugary foods and exploratory genome-wide association analysis in subjects with metabolic syndrome. *Biomedicines*, 10(1), 79. doi: 10.3390/biomedicines10010079

Loper HB, La Sala M, Dotson C, Steinle N. (2015). Taste perception, associated hormonal modulation, and nutrient intake. *Nutr Rev*, 73(2), 83-91. doi: 10.1093/nutrit/nuu009

Spence C, Youssef J (2021). Aging and the (Chemical) Senses: Implications for Food Behaviour Amongst Elderly Consumers. *Foods*, 10(1), 168. doi: 10.3390/foods10010168

# PAPEL DE FLNa EN LA ORGANIZACIÓN ESPACIO – TEMPORAL DE CXCR4 E INTEGRINA $\beta$ 1 DURANTE LA MIGRACIÓN LINFOCITARIA DIRIGIDA POR CXCL12 Y BAJO LA FUERZA DEL FLUJO SANGUÍNEO

*Moya-Ruiz E, Martínez-Muñoz L.*

*Universidad de Sevilla (US).*

## INTRODUCCIÓN

El sistema inmune comprende un conjunto de células y moléculas capaces de atacar a cualquier agente extraño al organismo. Para llevar a cabo su función, se requiere de la extravasación de células inmunitarias al foco inflamatorio. A pesar de los conocimientos sobre la expresión y regulación de las moléculas implicadas en este proceso, se desconoce con exactitud la organización espacio - temporal de muchos receptores de quimioquinas y proteínas de adhesión participantes. En el presente trabajo de investigación se pretenden desarrollar herramientas para estudiar el papel de filamina A (FLNa) como proteína mecano - moduladora del nanoclustering de CXCR4 y la organización espacio - temporal de integrina  $\beta$ 1 simultáneamente.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

En esta línea, se caracterizaron las células doble knock-in de CXCR4 e integrina  $\beta$ 1, así como las células knock-in integrina  $\beta$ 1 y knock-out FLNa y células triple knock-in para CXCR4, integrina  $\beta$ 1 y OsTIR1 mediante citometría de flujo, Western Blot y ensayos de migración en 2D con y sin flujo. Por otra parte, se evaluó el efecto de la ausencia de FLNa en el contexto de extravasación linfocitaria. Y, finalmente, se generó una línea celular doble knock-in CXCR4 e integrina  $\beta$ 1, además de knock-out para FLNa, con el objetivo de evaluar el efecto de esta última en la organización espacio - temporal de CXCR4 e integrina  $\beta$ 1 durante el proceso de quimioquinesis.

## RESULTADOS.

Los resultados señalan que la línea celular Jurkat Paris knock-in CXCR4 integrina $\beta$ 1 mantiene las características funcionales que las células Jurkat Paris originales. Además, las células Jurkat Paris knock-out FLNa knock-in integrina $\beta$ 1 tienen reducidos los niveles de expresión de integrina  $\beta$ 1 sin afectar a la funcionalidad de la proteína. Por otro lado, se observó que la línea celular Jurkat Paris knock-out FLNa knock-in integrina  $\beta$ 1 presenta defectos en la adhesión linfocitaria pero no en las características de migración. Finalmente, las células Jurkat Paris knock-in CXCR4 integrina $\beta$ 1 OsTIR1 no experimentan una disminución significativa de integrina  $\beta$ 1 en presencia de doxiciclina y auxina.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Por lo tanto, las líneas Jurkat Paris knock-in integrina $\beta$ 1 y Jurkat Paris knock-out FLNa knock-in CXCR4 integrina $\beta$ 1 podrían ser empleadas para estudiar el papel de FLNa en la organización espacio - temporal de CXCR4 e integrina  $\beta$ 1. En segundo lugar, es importante destacar el papel

de FLNa como proteína reguladora de la adhesión celular bajo la fuerza del flujo; y, en ausencia de la proteína, los efectos en la migración podrían relacionarse con alteraciones en la organización espacio – temporal de las integrinas. Por último, la línea celular Jurkat Paris knock-in CXCR4 integrina $\beta$ 1 OsTIR1, al presentar el marcador fluorescente en el dominio extracelular, podría ser utilizada para la evaluación del papel de la integrina  $\beta$ 1 durante el proceso de quimiotaxis. Estos hallazgos podrían beneficiar tanto a la comprensión de los mecanismos moleculares que rigen la extravasación en células T como las patologías que cursan con alteraciones en dicho proceso.

## BIBLIOGRAFÍA

- Martínez-Muñoz, L., Rodríguez-Frade, J. M., Barroso, R., Sorzano, C. S. S., Torreño-Pina, J. A., Santiago, C. A., Manzo, C., Lucas, P., García-Cuesta, E. M., Gutierrez, E., Barrio, L., Vargas, J., Cascio, G., Carrasco, Y. R., Sánchez-Madrid, F., García-Parajo, M. F. & Mellado, M. (2018). Separating Actin-Dependent Chemokine Receptor Nanoclustering from Dimerization Indicates a Role for Clustering in CXCR4 Signaling and Function. *Molecular Cell*, 71(5), 873. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.012>
- Fagerholm, S. C., Guenther, C., Lloret Asens, M., Savinko, T., & Uotila, L. M. (2019). Beta2-Integrins and Interacting Proteins in Leukocyte Trafficking, Immune Suppression, and Immunodeficiency Disease. *Frontiers in immunology*, 10, 254. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00254>
- Kadry, Y. A., Huet-Calderwood, C., Simon, B., & Calderwood, D. A. (2018). Kindlin-2 interacts with a highly conserved surface of ILK to regulate focal adhesion localization and cell spreading. *Journal of cell science*, 131(20), jcs221184. <https://doi.org/10.1242/jcs.221184>



# PAPEL DE LOS CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR VOLTAJE EN UN MODELO DE HIPERTENSIÓN EN RATA. DIFERENCIAS POR SEXO

*Escribano-Ruipérez I, Suárez A, Romero-Llopis B, Guerra-Ojeda S, Serna E y Mauricio, M. D.*

*Departament de Fisiologia, Universitat de València.*

## INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) cursa con disfunción endotelial, caracterizada principalmente por una menor liberación de óxido nítrico (NO) (Krüger-Genge et al, 2019). Los canales de calcio activados por voltaje (VGCC) de tipo L y T, localizados en los vasos, están implicados en la contracción del músculo liso vascular. El bloqueo de los canales de tipo L se utiliza como tratamiento antihipertensivo (Ottolini et al, 2019). Estudios clínicos ponen de manifiesto que el bloqueo conjunto de los VGCC de tipo L y T, ofrece mayores beneficios farmacológicos en el tratamiento de la HTA que el bloqueo únicamente de los canales de tipo L (Ozawa et al, 2006). En base a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar si la función de los VGCC de tipo L y T aumentaba en la HTA y si la participación de estos canales variaba según el sexo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron segmentos de aorta (3mm) procedentes de cuatro grupos experimentales, ratas hembra espontáneamente hipertensas (SHRH, n=8), ratas macho espontáneamente hipertensas (SHRM, n=8) y sus respectivos controles, ratas normotensas hembra Wistar-Kyoto (WKYH, n=8) y normotensas macho Wistar-Kyoto (WKYM, n=8). Todas ellas a 16 semanas de edad. Los segmentos vasculares se montaron en un sistema de baño de órganos para registrar la tensión isométrica. En estas condiciones, se le realizaron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en ausencia de inhibidores, en presencia de L-NAME ( $10^{-4}$  M), un inhibidor de la NO sintasa y en presencia de verapamil ( $20 \mu\text{M}$ ), que, a esta concentración, bloquea los VGCC de tipo L y T.

## RESULTADOS

El grupo SHRH contrajo más a la fenilefrina que el grupo WKYH ( $E_{\text{max}}$ :  $120 \pm 12\%$  vs  $86 \pm 8\%$ , para SHRH y WKYH respectivamente,  $P = 0,0066$ ). La incubación con L-NAME  $10^{-4}$  M y el análisis del área bajo la curva, indicó una menor producción de NO en el grupo SHRH ( $97 \pm 42$  UA vs  $255 \pm 50$  UA, para SHRH y WKYH respectivamente,  $P = 0,0175$ ). Por el contrario, en los machos, la contracción a la fenilefrina del grupo SHRM fue menor comparada con el grupo WKYM ( $E_{\text{max}}$ :  $90 \pm 8\%$  vs  $132 \pm 16\%$ , para SHRM y WKYM respectivamente,  $P = 0,0029$ ) y el bloqueo con L-NAME produjo el mismo efecto en ambos grupos. En presencia de verapamil, la curva de fenilefrina prácticamente se abolió en los cuatro grupos de estudio. El análisis del área bajo la curva indicó que en el grupo SHRH, la participación de los VGCC es mayor comparado con

WKYH, ( $163 \pm 24$  UA, vs  $100 \pm 19$ , para SHRH y WKYH respectivamente,  $P = 0,044209$ ). En machos ocurrió lo contrario ( $140 \pm 19$  UA vs  $223 \pm 25$  UA, para SHRM y WKYM respectivamente,  $P = 0,008236$ ).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La HTA aumenta la contracción a la fenilefrina en aorta de ratas hembra, por disminuir la liberación de NO y aumentar la participación de los VGCC. Esto no se observa en los machos.

## BIBLIOGRAFÍA

Krüger-Genge, Blocki, Franke, & Jung. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4411. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>

Ottolini, M., Hong, K., & Sonkusare, S. K. (2019). Calcium signals that determine vascular resistance. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 11(5). <https://doi.org/10.1002/wsbm.1448>

Ozawa, Y., Hayashi, K., & Kobori, H. (2006). New Generation Calcium Channel Blockers in Hypertensive Treatment. *Current Hypertension Reviews*, 2(2), 103-111. <https://doi.org/10.2174/157340206776877370>

# PAPEL DEL DAÑO CARDIACO EN LA EXPRESIÓN DE MICRO-RNAS EPICARDIOS

*Isabel Salvadora García Valencia*

*Universidad de Jaén*

## INTRODUCTION.

Tras un infarto de miocardio se produce una señalización celular que provoca la activación de fibroblastos produciendo colágeno, cicatrizando la zona y provocando así insuficiencia cardiaca. Se tiene constancia de ciertos animales, como el pez cebra, son capaces de sustituir la zona dañada por tejido funcional. En las últimas décadas, se ha avanzado en el campo de la biología molecular y desarrollo cardiaco al estudiar una gran parte del genoma que se transcribe pero no codifica a proteína, ARNs no codificantes (ncARN). Los objetivos de este estudio son ver el papel de un tipo de ncARN de 22-24 nucleótidos, los microARNs, los cuales han demostrado tener en diversos estudios un papel regulador en el desarrollo cardiaco y en la reactivación del epicardio, siguiendo un tratamiento de criolesión en diferentes estadios embrionarios en pollo.

Conocer los factores post-transcripcionales que regulan la activación del epicardio abre una ventana al futuro de la terapia de regeneración, ya que las funciones de señalización del epicardio incluyen promover la proliferación y diferenciación de los cardiomiocitos y estimular la vascularización coronaria.

## MATERIALS AND METHODS.

Utilizamos embriones de *Gallus gallus domesticus* en diferentes etapas de su desarrollo embrionario: HH17, HH24 y HH32. Diseccionamos el embrión para extraer el corazón y nos quedamos con la zona ventricular. Dividiremos nuestros explantes de corazón en corazones control (sin ningún tratamiento) y corazones lesionados (criolesión con nitrógeno líquido, ya que produce una muerte celular que se asemeja más a lo que sucede en un infarto en mamíferos). Tras recoger los cultivos procedemos a una extracción de ARN, para ello utilizamos el Kit Promega. El fin de la extracción de ARN es realizar una reversotranscripción para obtener ADN complementario y realizar por último una qPCR con los primers de microARN que hemos seleccionado en este estudio. Hemos interpretados los datos en gráficas con un análisis estadístico t de Student.

## RESULTS.

En HH17, vemos el único microARN con expresión es el miR125-5p, con una diferencia de casi 30 veces la señal expresada en el control. No se ha obtenido expresión del miR195-5p para HH24.

Los miR27a-3p, miR125b-5p y miR223-3p muestran menos expresión con respecto al control. El miR146-5p no muestra diferencias significativas en su expresión tras la criolesión en HH24. En HH32 lo más destacable es la expresión del miR195-5p tras la criolesión del corazón, que aumenta enormemente tras la criolesión mientras que los miR27a-3p, miR125b-5p, miR146-5p y miR223-3p en el estadio HH32 presentan una expresión menor respecto al control.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS.

En el estudio realizado por Dueñas et al. (2020) se demostró que la sobreexpresión de miR-27 inhibe la diferenciación a cardiomiocitos del proepicardio y epicardio embrionario, mientras que la sobreexpresión de miR-125, miR.146, miR-223 y miR-195 la promueven, respectivamente. La diferenciación más consistente y robusta se observó para miR-195 y miR223, tanto el proepicardio como en el epicardio embrionario.

Conclusiones:

- a) Los microRNAs estudiados están diferencialmente expresados en un modelo de criolesión en distintos estadios del desarrollo cardiaco (HH24 y HH32).
- b) miR-27, miR-125, miR.146 y miR-223 muestran menor expresión en criolesión que en controles en aquellos estadios donde hay epicardio mientras que miR-195 muestra el patrón contrario. Estos datos sugieren que la modulación de microRNAs tras la criolesión puede estar relacionada con la activación del epicardio en procesos de regeneración.

## BIBLIOGRAPHY

Brade, T., Pane, L. S., Moretti, A., Chien, K. R., & Laugwitz, K. L. (2013). Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(10), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013847>

Dueñas, A., Expósito, A., Muñoz, M. del M., de Manuel, M. J., Cámara-Morales, A., Serrano-Osorio, F., ... Franco, D. (2020). MiR-195 enhances cardiomyogenic differentiation of the proepicardium/septum transversum by Smurf1 and Foxp1 modulation. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66325-x>

García-Padilla, C., Hernández-Torres, F., Lozano-Velasco, E., Dueñas, A., Muñoz-Gallardo, M. del M., García-Valencia, I. S., ... Franco, D. (2022). The Role of Bmp- and Fgf Signaling Modulating Mouse Proepicardium Cell Fate. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.757781>

Lozano-Velasco, E., García-Padilla, C., Muñoz-Gallardo, M. D. M., Martínez-Amaro, F. J., Caño-Carrillo, S., Castillo-Casas, J. M., ... Franco, D. (2022). Post-Transcriptional Regulation of Molecular Determinants during Cardiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052839>

# LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA COMO MECANISMO DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA EN EL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

*Franco Mansilla J., Yagüe Sanz P. y Cuadrado Bermejo A.*

*Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y Universidad de Alcalá (UAH)*

## INTRODUCCIÓN

La inestabilidad cromosómica (CIN) es una característica común en los tumores, ocurriendo aproximadamente en el 80 % de estos, siendo el cáncer de pulmón uno de los que mayor CIN presenta (Bakhoun & Cantley, 2018). En el contexto de cáncer, puede ser de novo o inducida por fármacos. El objetivo de esta última es generar células tumorales no viables y que acaben entrando en apoptosis (Holland & Cleveland, 2009). No obstante, varios estudios han sugerido que un aumento de la inestabilidad cromosómica indicaría un peor pronóstico y resistencia a quimioterapia. Estudiar la CIN en estos tumores podría predecir y elegir el quimioterápico más beneficioso para los distintos pacientes.

Así, la hipótesis de este trabajo es estudiar si la inestabilidad cromosómica inducida por los tratamientos de quimioterapia en pacientes con adenocarcinoma de pulmón genera resistencia al tratamiento y en consecuencia, favorece la progresión del tumor.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

La línea celular HCC44 se usó para la realización de los diferentes experimentos. Para la determinación de la IC50, se sembraron 1500 células/pocillos en placa de p96. Las células fueron tratadas con 10 concentraciones diferentes de fármaco en las 24 horas después de la siembra. Tres pocillos (replicados) fueron tratados con cada dosis. 72h después de la adición de los fármacos, la viabilidad celular se midió a través de tinción con cristal violeta.

Para realizar los cariotipos, las células se trataron con 0.1uM de paclitaxel durante 48 horas. Se añadió 10ul/ml de colcemida durante dos horas para detener la mitosis en metafase y, tras el choque hipotónico con kcl 0,56%, se fijaron con Carnoy. Los cromosomas se tiñeron con DAPI y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia.

## RESULTADOS.

La caracterización de la línea celular HCC44 mostró una tasa alta de crecimiento, con un tiempo de duplicación de 24h, y alta inestabilidad cromosómica. Los resultados de IC50 indicaron que esta línea celular era resistente a cisplatino (IC50= 102.4uM) y sensible a paclitaxel (IC50=0.05nM), mostrando, por tanto, diferente sensibilidad a fármacos quimioterápicos.

Tras el tratamiento con paclitaxel, observamos una parada del ciclo celular y la entrada a un posible estado de senescencia celular, generando resistencia a este fármaco como indica la IC50 tras el tratamiento.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El aumento de CIN inducida por los fármacos quimioterápicos (Holland & Cleveland, 2009), podría haber provocado una posible entrada a un estado de senescencia que generaría

Resistencia a fármacos (Schmitt et al., 2022) y, por tanto, se asociaría a un peor pronóstico al favorecer la progresión tumoral (Lukow et al., 2021).

Con el análisis de patrones de inestabilidad cromosómica en los tumores se podría predecir la sensibilidad de los pacientes a quimioterapia y la posible generación de resistencias tras estos tratamientos.

## BIBLIOGRAFÍA

Bakhoun, S. F., & Cantley, L. C. (2018). The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell*, 174(6), 1347–1360. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.027>

Holland, A. J., & Cleveland, D. W. (2009). Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 478–487. <https://doi.org/10.1038/nrm2718>

Lukow, D. A., Sausville, E. L., Suri, P., Chunduri, N. K., Wieland, A., Leu, J., Smith, J. C., Girish, V., Kumar, A. A., Kendall, J., Wang, Z., Storchova, Z., & Sheltzer, J. M. (2021). Chromosomal instability accelerates the evolution of resistance to anti-cancer therapies. *Developmental Cell*, 56(17), 2427–2439.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.07.009>

Schmitt, C. A., Wang, B., & Demaria, M. (2022). Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00668-4>

# PUBLIC STIGMA PROFILE TOWARD MENTAL DISORDERS ACROSS DIFFERENT UNIVERSITY DEGREES IN THE UNIVERSITY OF VALENCIA (SPAIN).

*Marta López Gilberte, Juan C. Ruiz, Inmaculada Fuentes-Durá, Carmen Dasí, Cristina Pardo-García, María C. Fuentes-Durán, Francisco Pérez-González, Ladislao Salmeron, Pau Soldevila-Matías, Joan Vila-Francés and Vicent Balanza-Martínez*

*Facultat de Medicina i Odontologia, Facultat de Psicologia, CIBERSAM, INCLIVA, Department of Applied Economics, Intelligent Data Analysis Laboratory (IDAL), Universitat de València*

## INTRODUCCIÓN

El estigma es uno de los problemas principales cuando hablamos de salud mental. Las actitudes estigmatizantes, cuya prevalencia es alta, causan discriminación, retrasan la búsqueda de ayuda e inicio de la terapia en los pacientes con enfermedad mental e impiden la correcta interacción social (p.e. búsqueda de empleo). Mediante nuestro estudio queríamos comparar la prevalencia del estigma hacia las personas con enfermedad mental en estudiantes de primer curso de los grados de medicina, psicología, magisterio, economía y ciencia de datos.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Los estudiantes participantes (n=325) fueron invitados a rellenar un formulario online. El nivel de estigma se cuantificó mediante los siguientes cuestionarios estandarizados:

- KMI: Evalúa el conocimiento sobre la enfermedad mental
- RIBS: Escala dividida en 2 grupos que nos permite identificar a los estudiantes que conocen a alguien con enfermedad mental (EM) o que han trabajado o vivido con alguien con enfermedad mental (EM) y la predisposición de estas a trabajar con alguien con EM en el futuro.
- Scale of community attitudes toward mental illness: escala de 40 ítems que evalúa las actitudes de la población general frente a personas con enfermedad mental y las clasifica en grupos (autoritarismo, benevolencia, restricción social e ideología de la salud mental en la comunidad)
- Attribution Questionnaire (AQ-27): cuestionario en el cual se describe a un hombre con esquizofrenia que vive solo, trabaja y ha sido hospitalizado en diferentes ocasiones debido a su enfermedad. Evalúa el nivel de estigma formulado preguntas sobre el paciente que se agrupan en 9 grupos.
- Tras la recogida de datos se llevó a cabo un análisis estadístico mediante el programa SPSS.

## RESULTADOS.

Los resultados del KMI difieren según el grado cursado por los estudiantes. Los resultados del AQ-27 muestran que un porcentaje bajo de los estudiantes cree que las personas con EM son responsables de su enfermedad y deben ser segregadas. Asimismo, un bajo porcentaje de estudiantes percibió a las personas con EM como peligrosas.

El AQ-27 reveló diferencias según el género de las personas participantes y el contacto previo con alguien con EM. Al comparar la puntuación de los estudiantes en los diferentes grados, se encontraron diferencias significativas en 4 subescalas del CAMI y 6 subescalas del AQ-27, aunque no se encontró un patrón homogéneo de diferencias entre los grupos. En general, el estudiantado de medicina, psicología y magisterio presentó actitudes más benevolentes y más

aceptación por la integración de los pacientes que el estudiantado de economía y ciencia de datos.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El estigma hacia las personas con EM constituye un problema de salud pública debido al impacto negativo que tiene sobre los pacientes. Los programas anti-estigma podrían ayudar a reducir estos problemas y fomentar la integración. Para diseñarlos, es importante conocer qué factores influyen en la estigmatización. El presente estudio demuestra que el estigma existe entre estudiantes universitarios y difiere según el grado cursado. Asimismo, pone de manifiesto que el género y el contacto previo con personas con EM influyen en el grado de estigma.

## BIBLIOGRAFÍA

Evans-Lacko, S., Rose, D., Little, K., Flach, C., Rhydderch, D., Henderson, C., & Thornicroft, G. (2011). Development and psychometric properties of the reported and intended behaviour scale (RIBS): A stigma-related behaviour measure. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*, 20(3), 263-271.

<https://doi.org/10.1017/s2045796011000308>

Ochoa, S., Martínez-Zambrano, F., Vila-Badia, R., Arenas, O., Casas-Anguera, E., García-Morales, E., Villellas, R., Martín, J. R., Pérez-Franco, M. B., Valduciel, T., García-Franco, M., Miguel, J., Balsera, J., Pascual, G., Julia, E., Casellas, D., & Haro, J. M. (2016). Validación al castellano de la escala de estigma social: Community Attitudes towards Mental Illness en población adolescente. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental - Journal of Psychiatry and Mental Health*, 9(3), 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.rpsm.2015.02.002>

Ruiz, J. C., Fuentes-Durá, I., López-Gilberte, M., Dasí, C., Pardo-García, C., Fuentes-Durán, M. C., Pérez-González, F., Salmeron, L., Soldevila-Matías, P., Vila-Francés, J., & Balanza-Martínez, V. (2022).

Public stigma profile toward mental disorders across different university degrees in the University of Valencia (Spain). *Frontiers in Psychiatry*, 13.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2022.951894>

Taylor, S. M., & Dear, M. J. (1981). Scaling Community Attitudes Toward the Mentally Ill. *Schizophrenia Bulletin*, 7(2), 225-240. <https://doi.org/10.1093/schbul/7.2.225>

Watson, A. C., Otey, E., Westbrook, A. L., Gardner, A. L., Lamb, T. A., Corrigan, P. W., & Fenton, W. S. (2004). Changing middle schoolers' attitudes about mental illness through education. *Schizophrenia Bulletin*, 30(3), 563-572. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a007100>



# CLASIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE CÉLULAS TUMORALES Y ESTROMALES EN ADECOCARCINOMA PULMONAR MEDIANTE IMAGEN DIGITAL. DESARROLLO INICIAL DE ALGORITMOS.

*Cebrián-Ferreras M<sup>1</sup>, Granados-Aparici S<sup>2</sup>, Vieco-Marti P<sup>2</sup>, Noguera R<sup>2</sup>.*

*Universidad de Valencia, INCLIVA, CIBERONC*

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que presenta una gran heterogeneidad histomorfológica (de Sousa, 2018). Esta complejidad es una de las principales dificultades para la identificación y diferenciación de distintos tipos celulares, tumorales y estromales. Aunque individuos con experiencia en el campo de la Patología son capaces de reconocer e identificar los distintos tipos celulares con la ayuda de inmunohistoquímica, esto puede resultar un trabajo desafiante utilizando únicamente la tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

El objetivo de este estudio es elaborar un algoritmo de clasificación automática que permita diferenciar con H&E las células de una manera objetiva en adenocarcinoma pulmonar (ADC pulmonar).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se revisaron preparados histológicos de 8 casos de ADC pulmonar teñidos con H&E y citoqueratina (CK). Una vez digitalizados (3DHISTECH 20x) se analizaron en QuPath (Bankhead, 2017), un software de análisis de bioimágenes. Se examinaron una media de 26 regiones por caso de diferentes áreas ( $200\mu\text{m}^2$  - $26000\mu\text{m}^2$  aprox), 13 en regiones de tumor y 13 en regiones de estroma, con un total de 8300 células analizadas. Un caso fue empleado para identificar aquellos parámetros histomorfométricos que resultaran ser distintivos para células tumorales y estromales, mientras que los 7 restantes se emplearon para definir límites y rangos cuantitativos de cada uno de los parámetros. Se elaboró un PCA biplot con los 9 parámetros elegidos para asignar diferentes ponderaciones a cada uno de ellos en función de su influencia en la caracterización celular. Se utilizaron Python y Groovy, este último utilizado por el software QuPath, como lenguajes de programación para desarrollar los algoritmos.

## RESULTADOS

Se desarrollaron varios algoritmos que permitieron la identificación automatizada de las células tumorales y estromales basados en los parámetros histomorfométricos estudiados.

El primer algoritmo desarrollado en Python cuenta con una interfaz en la que el usuario ingresa 8 parámetros de la célula y el algoritmo asigna puntos a las variables "Tumor" y "Estroma". Después de ingresar todos los parámetros, el algoritmo determina la probabilidad de que la

célula sea tumoral o estromal. Sin embargo, su aplicación a una muestra tumoral requería una gran cantidad de tiempo debido a la necesidad de extraer y procesar los valores de cada una de las células. Para solucionar esta limitación, se desarrolló un segundo algoritmo equivalente al anterior en Groovy, que permitió clasificar automáticamente las células a partir de una región o muestra previamente detectada en QuPath.

La validación de la clasificación automática se realizó mediante la comparación del porcentaje tumoral determinado por la citoqueratina y el estimado por el algoritmo en 3 casos específicos. Se encontraron diferencias menores al 10%, lo que demuestra la precisión y eficacia del algoritmo en la identificación de células tumorales y estromales.

#### DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El análisis de estos parámetros histomorfométricos ha ayudado a una mejor caracterización y clasificación de las células presentes en los ADC pulmonares, sin embargo, es importante señalar que este estudio es solo una prueba del potencial de esta herramienta, ya que es necesario incluir más casos al estudio con el fin de mejorar y obtener mayor precisión en el algoritmo.

#### BIBLIOGRAFÍA

Bankhead, P. et al. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>

De Sousa, V. M. L., & Carvalho, L. (2018). Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 85(1-2), 96–107. doi: 10.1159/000487440. PMID: 29635240

# ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO RESISTENTE A TAXANOS.

L. Molinero-Sicilia<sup>1</sup>, N. Gestoso-Uza<sup>1,2,3</sup>, C. Sicilia-Navarro<sup>1</sup>, R. Peláez<sup>2,4,5</sup>, A.B.Herrero<sup>1,2,3</sup>, R.González-Sarmiento<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Medicina Molecular, Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca (USAL), Salamanca, España. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España. <sup>3</sup> Instituto de Biología Celular y Molecular del Cáncer (IBMCC), USAL-CSIC, Salamanca, España. <sup>4</sup> Laboratorio de Química Orgánica y Farmacéutica, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. <sup>5</sup> Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

## INTRODUCCIÓN

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) agrupa a los tumores desarrollados en el epitelio del tracto aerodigestivo superior. El tratamiento estandarizado actual en estadios localmente avanzados es la quimio-radioterapia con taxanos, platinos y 5-fluorouracilo. Sin embargo, uno de los problemas actuales del CECC es el desarrollo de resistencia al tratamiento en ciertos subgrupos de pacientes que deriva en un fallo terapéutico precoz. Actualmente no existen biomarcadores de respuesta que permitan optimizar la elección del tratamiento. Para determinar los mecanismos moleculares responsables de dicha resistencia e identificar biomarcadores con potencial uso clínico, se generaron líneas celulares resistentes a un taxano (paclitaxel). El objetivo de este trabajo fue identificar alternativas terapéuticas efectivas en el CECC resistente a taxanos mediante ensayos en líneas celulares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se emplearon dos líneas celulares de CECC con distintas localizaciones y estatus de infección VPH. Se establecieron líneas celulares resistentes a paclitaxel mediante el método de incremento progresivo de dosis de agente citotóxico a partir de estas líneas. Tras comprobar la adquisición de resistencia estable, se determinó la respuesta de las células a docetaxel, otro taxano utilizado actualmente en la clínica, mediante ensayo de viabilidad celular MTT y ensayo de muerte celular por citometría de flujo. Posteriormente se estudió la respuesta a diferentes agentes terapéuticos, incluyendo cisplatino, 5-fluorouracilo y un agente antimetabólico pendiente de patente mediante MTT. Finalmente se determinó la respuesta a radioterapia mediante ensayo de muerte celular por citometría de flujo. Los datos obtenidos por MTT fueron analizados estadísticamente con el programa IBM/SPSS para identificar diferencias significativas entre las líneas celulares parentales y resistentes a paclitaxel aplicando el test estadístico t-student ( $p < 0,05$ ). En los ensayos de muerte celular los datos fueron analizados con el programa BD Accuri™ C6 Plus Software.

## RESULTADOS

Los experimentos realizados confirmaron una resistencia cruzada al docetaxel en las líneas resistentes a paclitaxel. El tratamiento con 5-fluorouracilo disminuyó la viabilidad de las células tumorales en todos los casos con efecto dosis y tiempo dependiente. Tanto en el tratamiento con cisplatino como en el caso de la radioterapia, se observa una disminución de viabilidad celular

dosis y tiempo dependiente, siendo la muerte celular mayor en las líneas resistentes a paclitaxel que en las parentales correspondientes. Por último, observamos que el fármaco antimitótico empleado disminuye la viabilidad celular de forma muy acusada incluso a dosis bajas con un efecto similar en todas las líneas celulares a 24, 48 y 72 horas de tratamiento.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que las líneas celulares que han desarrollado resistencia a taxanos responden al tratamiento con cisplatino, 5-fluorouracilo y radioterapia. Además, sugieren que la adquisición de esta resistencia podría sensibilizar al cisplatino y a la radioterapia. El agente antimitótico empleado afecta a la polimerización de los microtúbulos, al igual que los taxanos, mediante otro mecanismo de acción. Por este motivo, podría ser una alternativa terapéutica efectiva en CECC resistente a taxanos, de especial interés en quimioterapias combinadas de taxanos, platinos y 5-fluorouracilo, habituales en la clínica actualmente.

## BIBLIOGRAFÍA

C. René Leemans, Peter J. F. Snijder and Ruud H. Brakenhof. (2018). The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 18(5):269-282.

Coley HM.(2004). Development of drug-resistant models. *Methods Mol Med*. 88:267-73.

Kanno Y, Chen CY, Lee HL, Chiou JF, Chen YJ. (2021). Molecular Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Head and Neck Cancers. *Front Oncol*. 11:640392.

Gajanan V. Sherbet. (2020) Combretastatin analogues in cancer biology: A prospective view. *J. Cell. Biochem*. 121(3): 2127-2138

# SEMI-SOLID DOSAGE FORM FORMULATION TO PROTECT AND RELIEVE OF BREAST CANCER RADIODERMATITIS

*Lora Stefanova Dokuzliyska*

*DrugBiOp Research Group. Department of Pharmaceutical Technology and Parasitology, University of Valencia, Spain.*

## INTRODUCCIÓN

Radiodermatitis is the skin's response to ionizing radiation exposure. It affects to the 95% of patients treated with radiotherapy for breast cancers. Effects can range from erythematous rash to desquamation and, even, necrosis. This response can cause significant pain and limitation of usual lifestyle activities. The pathophysiology of this condition seems to be caused by ROS-mediated cell damage. At present, the treatment is symptomatic and depends on the injury produced.

The aim of this project is the design of a stable semi-solid topical form, able to deliver three actives in the dermis. The selection of actives was based on their properties as ROS scavengers: pterostilbene (PT), silibinin (SI) and nicotinamide riboside (NTR).

## MATERIALS AND METHODS

A solubility study with five of oily excipients most used in the Technology laboratory and two hydrophilic ones was performed. Five emulsions were prepared based on these results and were evaluated considering organoleptic characteristics and stability after the addition of the actives. Only one prototype was selected and further studied. It corresponds to a soapy glycerin cream. A conductivity test was carried out to determine the external phase. Subsequently, a stability test was performed in two phases: an accelerated test of 15 consecutive days in extreme temperature conditions (50°C, room temperature and 2°C) and a 90-day stability test. The parameters studied were organoleptic characteristics (appearance, colour and odour), determination of pH and phase separation after centrifugation at 3500 rpm during 15 min. Concentrations of the active were also measured after treatment of 0.5g of the emulsion with 4 ml methanol during 24h. The analysis of PT, SI and NTR was performed by UPLC coupled with mass spectrometry ACQUITY™ TQD. Studies of penetration were performed by means of the tape-stripping technique, using human skin samples. An incubation time of 1h was studied.

## RESULTS AND DISCUSSION

None of the solvents studied was able to dissolve the three actives at the same time. The best results were obtained for NTR in propylene glycol and PT and SI in ethoxy diglycol. The selected prototype is a w/o emulsion, with a very low conductivity (56 µS). Appearance, colour and odour were stable in the three conditions assayed, during the 90-day period studied. The pH values ranged from 6 to 7, regardless of the day considered ( $p < 0.05$ ). Values corresponding to the refrigerated sample were always lower (around 0.5 units) than those obtained with samples at ambience temperature or at 40°C. There were not statistical differences (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ) among concentrations of any of the actives, considering time of sampling as the factor. All the actives studied were able to penetrate the stratum corneum; the profile of skin concentration vs depth is a mono exponential decay.

## CONCLUSIONS

The w/o emulsion prepared is stable for 90 days, both physically and chemically. The preliminary studies presented here suggest the ability of the emulsion prepared as candidate to treat radiodermatitis. Further studies are needed to test toxicity and activity.

Kondziółka J, et al Overview of the Active Ingredients in Cosmetic Products for the Care of Skin That Has Been Exposed to Ionizing Radiation - Analysis of Their Effectiveness in Breast Cancer Radiotherapy. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021;14:1065-1076. (2021).

Isaac, V.L.B. et al Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos (2008).

Melero A., In Vitro Human Skin Segmentation and Drug Concentration–Skin Depth Profiles. In: Turksen K. (eds) *Permeability Barrier. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 763. Humana Press. (2011).

# Regulación de la expresión de miR-148a-3p en fibroblastos de ratón en condiciones de hipoxia y senescencia.

Represa-Pérez M.<sup>2</sup>, Guiu-Moneo A.<sup>2</sup>, Rosales Ariza C.<sup>1,2</sup>, Descals B.<sup>2</sup>, Paes A.B.<sup>1,2</sup>, Pérez-Cremades D.<sup>1,2</sup>, Hermenegildo C.<sup>1,2</sup>, Novella S<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Dep. Fisiología, Universitat de València - <sup>2</sup>Instituto de Investigación Biomédica INCLIVA, València, España.

## INTRODUCCIÓN

La fibrosis cardiovascular contribuye a la progresión de las enfermedades cardiovasculares (ECV), y ha sido asociada con un aumento de rigidez vascular, hipertensión y remodelación adversa. Procesos como senescencia celular e hipoxia regulan la función de los fibroblastos y aumentan los procesos fibróticos. Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes que regulan la expresión génica. En las últimas décadas, se ha descrito el papel de miRNAs específicos en diversos procesos patológicos relacionados con las ECV, incluyendo la regulación de la función de los fibroblastos y su consecuencia en la fibrosis vascular<sup>1</sup>. Sin embargo, del miR-148a-3p ha sido poco estudiado. Nuestro objetivo es determinar la influencia de procesos de hipoxia y senescencia sobre la expresión del miR-148a-3p en fibroblastos en cultivo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Fibroblastos murinos 3T3 fueron cultivados a razón de 50.000 células/pocillo en medio DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal a 37°C, 21% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. A las 24h, un grupo de células fue tratado con el inhibidor selectivo de quinasas dependientes de ciclina e inductor de senescencia Palbociclib (5µM) durante 72h, tras las cuales se expusieron a hipoxia en una cabina Whitley H35 HEPA hypoxystation (5% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub>, 37°C) durante 1, 4 y 24 h, mientras un grupo control para ambas condiciones (sin tratamiento y tratamiento con Palbociclib) fue mantenido en normoxia (21% O<sub>2</sub>). El RNA fue extraído con TRIzol™ y cuantificado con Nanodrop3000. La expresión del mmu-miR-148a-3p fue medida mediante una RT-qPCR (método 2-ΔΔCt) utilizando sondas Taqman específicas para el miR-148a y el snRNA U6 (control endógeno). Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 8.0.2. Para la predicción de dianas del miR-148a-3p, se realizó una búsqueda de dianas en ratón y humano en las bases de datos DIANA-microT web server v5.0, TargetScan Release 8.0 y miRDB. Con la lista de dianas obtenida, se realizó un análisis de rutas en miRWalk. La nube de palabras se realizó mediante la aplicación web wordcloud.com.

## RESULTADOS

La expresión relativa de miR-148a-3p en fibroblastos murinos 3T3 disminuyó significativamente en condiciones de hipoxia tras la exposición a 1 y 4h (p<0,01). Las células tratadas con el inductor de senescencia Palbociclib muestran una tendencia a la disminución (p=0,06) en la expresión del miR-148a-3p. Sin embargo, las células senescentes expuestas a hipoxia no mostraban la disminución en la expresión de miR-148a-3p que se observaba en una situación de normoxia. Por otra parte, el análisis bioinformático relacionó el miR-148a-3p con dianas implicadas en algunas rutas de señalización de importancia cardiovascular tales como la senescencia celular, la interacción con matriz extracelular y varias patologías cardíacas. Entre las dianas predichas, destacan por su participación en un gran número de rutas Itgb8, Pik343, Pten y Sos2.

## CONCLUSIONES

En fibroblastos murinos, miR-148a-3p disminuye su expresión relativa en respuesta tanto a hipoxia como al inductor de senescencia Palbociclib. Sin embargo, en condiciones de senescencia no se observa una respuesta a la hipoxia, por lo que ambas condiciones podrían estar interrelacionadas con la expresión del miRNA. Además, según la predicción bioinformática, el miR-148a-3p podría estar implicado en rutas destacadas de la fisiopatología cardiovascular.

## BIBLIOGRAFÍA

Pérez-Cremades D, Chen J, Assa C, Feinberg MW. MicroRNA-mediated control of myocardial infarction in diabetes. *Trends Cardiovasc Med.* 2022 Jan 17:S1050-1738(22)00006-8. doi: 10.1016/j.tcm.2022.01.004. Epub ahead of print. PMID: 35051592; PMCID: PMC9288556.



# CAR-T therapy in T-ALL cells.

*Gina Alhakim*

*University of Valencia.*

## INTRODUCCIÓN

One of the most common aggressive hematological malignancies is T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia. This disease is characterized by having high rates of relapse and poor prognosis. Its treatment is only recommended to be an allogeneic stem transplant since CAR-T therapies have shown promising results in this disease. The main challenge of the treatment of T cells is fratricide and serious T-cell aplasia due to the fact that T-cells typically share mutual antigens with malignancies, current technologies to withdraw the effects will be contemplated.

## MATERIAL Y MÉTODOS

This study is a bibliographic review that focuses its disclosure in recent journals with high impact. All information mentioned is extracted from reviews articles in PubMed by inserting in the search bar the following: (CAR-T[Title]) AND (T- ALL[Title]), more articles are found in the similar articles section, and cited articles.

## RESULTADOS

It is shown that standard treatments for T-ALL seem to have high cure rate. However, the issue relies in the huge value of relapses. That's where CAR-T therapy steps in with high cure rate and complete remission rate. Although CAR-T appears to work perfectly, its side effects are still yet to be addressed fully. It appears to be more challenging to target T-cell malignancies as a consequence of the possible adverse effects. The main issue, fratricide, is gradually being addressed by gene editing technologies such as CRISPR-Cas9, TALEN, and CBEs. It is shown that standard treatments for T-ALL seem to have high cure rate. However, the issue relies in the huge value of relapses. That's where CAR-T therapy steps in with high cure rate and complete remission rate. Although CAR-T appears to work perfectly, its side effects are still yet to be addressed fully. It appears to be more challenging to target T-cell malignancies as a consequence of the possible adverse effects. The main issue, fratricide, is gradually being addressed by gene editing technologies such as CRISPR-Cas9, TALEN, and CBEs.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

CAR-T therapy advances in the near future will lead to the cure of hematopoietic malignancies and the investigation for further therapeutic strategies for treating cancer.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ren, A. (n.d.-b). CAR T-Cell Immunotherapy Treating T-ALL: Challenges and Opportunities. MDPI. <https://www.mdpi.com/2076-393X/11/1/165>

2. Luo, L., Zhou, X., Zhou, L., Liang, Z., Yang, J., Tu, S., & Li, Y. (2022). Current state of CAR-T therapy for T-cell malignancies. *Therapeutic advances in hematology*, 13, 20406207221143025. <https://doi.org/10.1177/20406207221143025>
3. Newman H, Teachey DT. A Bright Horizon: Immunotherapy for Pediatric T-Cell Malignancies. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 2;23(15):8600. doi: 10.3390/ijms23158600. PMID: 35955734; PMCID: PMC9369002.
4. Kozani, S. P. (2021, October 7). CAR-T cell therapy in T-cell malignancies: Is success a low-hanging fruit? - *Stem Cell Research & Therapy*. BioMed Central. <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-021-02595-0>
5. Caracciolo, D. (2023b, January 9). The emerging scenario of immunotherapy for T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: advances, challenges and future perspectives – *Experimental Hematology & Oncology*. BioMed Central. <https://ehoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40164-022-00368-w>

# EFECTO DE LA HIPOXIA Y SENESCENCIA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIR-30B-5P EN FIBROBLASTOS MURINOS.

*Guiu-Moneo A., Represa-Pérez M., Rosales Ariza C., Descals B., Paes A.B., Pérez-Cremades D., Hermenegildo C., Novella S.*

*Dep. Fisiología, Universitat de València - Instituto de Investigación Biomédica INCLIVA, València, España.*

## INTRODUCCIÓN

El síndrome coronario agudo es la principal causa de muerte en el mundo y es la manifestación clínica de la isquemia miocárdica<sup>1</sup>. Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNA monocatenarios que funcionan como reguladores postranscripcionales. Se ha descrito el papel de distintos miRNAs relacionados con procesos fisiopatológicos tras el infarto de miocardio (IM): muerte celular, angiogénesis, procesos inflamatorios y fibróticos...<sup>2</sup> Datos de secuenciación previos (Figura 1)<sup>3</sup> demuestran un aumento en la expresión en la familia del miRNA-30 tras IM experimental en sueros de ratones resistentes a la senescencia acelerada (SAMR1) y propensos a la senescencia (SAMP8). Como punto de partida para determinar la influencia del miR-30b en procesos de remodelado cardíaco tras un infarto de miocardio, el objetivo de este estudio es determinar el nivel de expresión de miR-30b-5p en cultivos de fibroblastos murinos sometidos a hipoxia y senescencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Fibroblastos 3T3 murinos se cultivaron en placas de 12 pocillos (50.000 c/p) en medio DMEM + 10% SBF (5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub>, 37°C). Para inducir senescencia, las células fueron incubadas con el inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas Palbociclib (5µM) 72h. En los estudios de hipoxia, se trabajó en una cabina Whitley H35 HEPA hypoxystation (5% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub>, 37°C) durante 24h. El RNA de las células se extrajo con el método basado en fenol/cloroformo a 1h, 4h y 24h de cultivo en hipoxia y en normoxia y fue cuantificado con el Nanodrop3000. La expresión de los genes Hif1α, p16 y del mmu-miR-30b-5p se analizó mediante RT-qPCRs. La expresión relativa se determinó mediante el método 2<sup>-ΔΔCt</sup>. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA. El análisis bioinformático se realizó mediante el software miRPath.v3, utilizando la base de datos de predicción de dianas de miRNAs experimentalmente demostradas TarBase.v8.

## RESULTADOS

El miR-30b-5p aumenta su expresión relativa bajo condiciones de hipoxia siendo significativo a las 24h (p<0.01). Para comprobar la eficacia de la hipoxia se midió la expresión relativa de los niveles de mRNA de Hif1α (factor de transcripción inducible por hipoxia) con respecto a tiempo 0h. Hif1α está sobreexpresado en condiciones de hipoxia con un pico máximo a 1h de exposición a la hipoxia que va disminuyendo a condiciones basales. Por otra parte, el miR-30b-5p no aumenta significativamente su expresión relativa tras la adición de Palbociclib. La inducción de senescencia con Palbociclib se comprobó mediante la disminución de la expresión relativa de los niveles de mRNA de p16 (inhibidor de CDK4/6). Por último, el tratamiento conjunto con

Palbociclib e hipoxia aumentó la expresión de miR-30b-5p ( $p < 0.01$ ). El análisis bioinformático de miR-30b-5p reveló que sus dianas están implicadas en el ciclo celular, diversas rutas proinflamatorias y en la señalización mediada por Hif1 $\alpha$ .

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

El miR30b-5p está regulado por hipoxia en fibroblastos 3T3 de ratón no tratados con Palbociclib. Sin embargo, en las células senescentes la hipoxia no modifica los niveles de miR-30b-5p. Estos resultados indican una posible interacción entre las rutas de hipoxia y senescencia y la expresión del miR-30b-5p. La implicación del miRNA en la regulación del ciclo celular y en la respuesta mediada por Hif1 podrían indicar su participación en procesos fibróticos acontecidos tras el infarto de miocardio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mompeón A, Pérez-Cremades D, Paes AB, Sanchis J, Ortega-Paz L, Andrea R, Brugaletta S, Sabate M, Novella S, Dantas AP, Hermenegildo C. Circulating miRNA Fingerprint and Endothelial Function in Myocardial Infarction: Comparison at Acute Event and One-Year Follow-Up. *Cells*. 2022 Jun

2;11(11):1823. doi: 10.3390/cells11111823. PMID: 35681518; PMCID: PMC9180782. 2. Pérez-Cremades D, Chen J, Assa C, Feinberg MW. MicroRNA-mediated control of myocardial infarction in diabetes. *Trends Cardiovasc Med*. 2022 Jan 17:S1050-1738(22)00006-8. doi: 10.1016/j.tcm.2022.01.004. Epub ahead of print. PMID: 35051592; PMCID: PMC9288556.

3. A. B. Paes. Modificación de miRNA circulantes por infarto agudo de miocardio experimental en el modelo murino de senescencia SAMR1/SAMP8 y su relación con las diferencias de sexo. Tesis doctoral. Universitat de València (2023).

# THE PARADOX POLYMERASE: REVIEWING THE POTENTIAL NUCLEAR ROLE OF ZIKV NS5.

*Samuel Donaire Carpio*

*Universidad Autónoma de Madrid / Institut Pasteur*

## INTRODUCCIÓN

NS5, the polymerase of the Zika virus (ZIKV) localizes nearly exclusively in the host's cell nucleus conforming weird sphere-like structures, despite RNA replication taking place in the cytoplasm. Fascinatingly, viral replication is inhibited in case NS5 does not accumulate in the nucleus. ZIKV NS5 has been proven to modulate the host's innate immune response hampering IFN-1-mediated signaling pathways and inducing a pro-inflammatory response in a cell-specific manner, for which the role of the nuclear localization is not clear.

Here we present a review of the study of ZIKV NS5 subcellular localization in the last years, its potential biological role, and how future studies in this aspect may lead us to the first pan-flaviviral drugs.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Since the content of this poster is a review of various publications, no specific methodology subsection is provided. However, each figure contains a brief descriptive summary of the techniques that led to their generation.

## RESULTADOS.

The NS5 protein of ZIKV localizes mainly in the host's cell nucleus, being this fact is demonstrated by immunofluorescence studies and structural approximations since NS5 contains two different Nuclear Localization Signals (NLS). A recent study showed that one of these two, the  $\alpha\beta$ NLS was critical to permit the translocation to the nucleus, interacting with importin  $\alpha$ . NS5 has been proven to modulate the host's innate immune response, hampering IFN-1-mediated signaling and enhancing the pro-inflammatory response, being these effects cell-specific and defining the main tissues where ZIKV-induced pathogenesis takes place. However, its nuclear localization seems to not affect these regulations. The NS5 protein of ZIKV localizes mainly in the host's cell nucleus, being this fact is demonstrated by immunofluorescence studies and structural approximations since NS5 contains two different Nuclear Localization Signals (NLS). A recent study showed that one of these two, the  $\alpha\beta$ NLS was critical to permit the translocation to the nucleus, interacting with importin  $\alpha$ . NS5 has been proven to modulate the host's innate immune response, hampering IFN-1-mediated signaling and enhancing the pro-inflammatory response, being these effects cell-specific and defining the main tissues where ZIKV-induced pathogenesis takes place. However, its nuclear localization seems to not affect these regulations.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Although the cellular sublocalization of NS5 proteins is different depending on the flavivirus, the importance of the translocation to the nucleus is such that novel antivirals against various flaviviruses have already been developed. These antivirals target the  $\alpha\beta$ NLS of NS5 are the founding stone of developing proper treatment against diseases caused by flaviviruses.

## BIBLIOGRAFÍA

Tan, M. J., Chan, K. W. et al (2019). The potential role of the ZIKV NS5 nuclear spherical-shell structures in cell type-specific host immune modulation during ZIKV infection. *Cells*, 8(12), 1519.

Zhao, Z., Tao, M. et al (2021). Nuclear localization of zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. *Journal of General Virology*, 102(3).

Yang, S., Atkinson, S., Fraser et al (2019). Novel flavivirus antiviral that targets the host nuclear transport importin  $\alpha/\beta$ 1 heterodimer. *Cells*, 8(3), 281.

# COMBINACIÓN DE TERAPIAS CAR-T Y ANTI PD-1/PD-L1 PARA TRATAMIENTO DE NSCLC

*Natalia Calles Albero*

*Universitat de València*

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales de causas de muerte, y el tipo de cáncer que mayor mortalidad presenta. De entre todos los tipos de cáncer de pulmón los más frecuentes son los cánceres de pulmón de células no pequeñas, conocido en inglés por sus siglas NSCLC. Aunque una vez detectada la enfermedad, los pacientes son tratados con terapias tradicionales, no suelen tener una gran efectividad. De acuerdo con las estadísticas, tan solo un 6% de los pacientes siguen respondiendo a la quimioterapia dos años tras la detección del cáncer. Sin embargo, nuevas estrategias tales como: la inmunoterapia aporta esperanzas para el tratamiento de los pacientes con NSCLC. Entre ellas destaca, el tratamiento anti PD-1/PD-L1. Este consiste en bloquear la interacción entre el ligando PD-L1 (expresado en la célula cancerígena) y el PD-1 (expresado en las células T del paciente), ya que la interacción entre ambos ligandos bloquea parte de la respuesta inmunitaria del paciente. Por tanto, al bloquear dicha interacción, el sistema inmunitario del paciente combate de una forma más eficaz el cáncer. Según las estadísticas, el 19% de los pacientes siguen respondiendo a la terapia tras dos años de tratamiento. No obstante, sigue sin ser un porcentaje elevado. Por este motivo algunos investigadores formulan la hipótesis de que la combinación de la terapia Anti PD1/PD-L1 con otra terapia podría aumentar la efectividad de la misma.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Revisión bibliográfica realizada con artículos buscados en Pubmed, Elsevier, y Clinicaltrials.gov. Usando las palabras clave: NSCLC, Anti-PD-1/PD-L1, CAR-T terapias combinadas.

## RESULTADOS.

En la combinación de terapia inmunitaria anti PD-1/PD-L1 y terapia CAR-T: se infusionan tanto anti PD-1/PD-L1, como células CAR-t modificadas para ser reconocidas por un antígeno específico. Además, las células CAR T segregan anticuerpos anti PD-1/PD-L1. Aumentando la efectividad de la terapia.

Según los resultados obtenidos en un estudio preclínico, las estadísticas de supervivencia en meses eran de: 14,1 para pacientes tratados con quimioterapia, 18,1 para aquellos tratados con inmunoterapia, 17,7 para pacientes tratados con células CAR-T y 23,9 para los que habían sido tratados con la combinación de quimioterapia y células CAR-T.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

En primer lugar, tanto la inmunoterapia como la terapia CAR-T (por separado) han mostrado mayor eficacia, que el tratamiento de primera línea: la quimioterapia. En segundo lugar, se ha demostrado una sinergia preclínica entre ambas terapias y que la combinación de ambas terapias aumenta su efectividad. Al aumentar el número de anticuerpos anti PD-1/PD-L1, gracias a las células CAR-T y una mejor regulación del sistema inmunitario ya que ataca en menor medida, al

tratamiento. Finalmente, se llega a la conclusión de que la combinación de ambas terapias aumenta la efectividad del tratamiento.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Chocarro L, et al. CAR-T Cells for the Treatment of Lung Cancer. *Life*. abril de 2022;12(4):561.
2. Qu J, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-T-cell therapy in non-small-cell lung cancer (NSCLC): current status and future perspectives. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70(3):619-31.
3. Sui H, et al. Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer: Toward Personalized Medicine and Combination Strategies.
4. Wang DR, Wu XL, Sun YL. Therapeutic targets and biomarkers of tumor immunotherapy: response versus non-response. *Signal Transduct Target Ther*. 19 de septiembre de 2022;7:331.
5. Xu J, Zhang Q, Tian K, Wang H, Yin H, Zheng J. Current status and future prospects of the strategy of combining CAR-T with PD-1 blockade for antitumor therapy (Review). *Molecular Medicine Reports*. 1 de febrero de 2018;17(2):2083- 8.
6. Adusumilli PS, et al. A Phase I Trial of Regional Mesothelin-Targeted CAR T- cell Therapy in Patients with Malignant Pleural Disease, in Combination with the Anti-PD-1 Agent Pembrolizumab. *Cancer Discovery*. 1 de noviembre de 2021;11(11):2748-63.
7. Cavaille F, et al. Real-world efficacy and safety of pembrolizumab in patients with non-small cell lung cancer: a retrospective observational study. *Tumori*.
8. Man J, Millican J, Mulvey A, GebSKI V, Hui R. Response Rate and Survival at Key Timepoints With PD-1 Blockade vs Chemotherapy in PD-L1 Subgroups: Meta-Analysis of Metastatic NSCLC Trials. *JNCI Cancer Spectr*.



# IDENTIFYING THE NEURAL CELLULAR TARGETS OF ANDROGEN SIGNALING UNDERLYING MALE REPRODUCTIVE FUNCTION AND BEHAVIOR

*Palacios Sánchez P, Desroziers E, Mhaouty-KODJA S*

*Instituto de Biología Paris-Seine*

## INTRODUCCIÓN

For the survival of mammalian species, sexual reproduction is required. Male reproductive function and behavior are controlled by neural circuits which are regulated by sex steroids (1). Sex hormones exert organizational effects during the perinatal period followed by an activation of the brain structures at adulthood. In males, testosterone irreversibly masculinizes these circuits, acting through the androgen receptor (AR), but also, after aromatization into estradiol, through two estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) (2). Previous studies have demonstrated the predominant role of androgen signaling in male reproduction (2). Indeed, specific neural AR knockout male mice present impaired typical male sexual behaviors (decrease sexual motivation and performance but also aggressivity toward an intruder male) (2,3). Nevertheless, some crucial aspects of the AR signaling pathway specifics are still unknown, such as which neural cell types are the main target of AR-mediated androgen signaling. To elucidate this question, here, we followed an anatomical approach to determine the presence of AR in neurons and/or in glial cells. To do so, a specific and sensitive immunohistochemical protocol against this receptor must be designed.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Brains from transcardially perfused animals were extracted, postfixed overnight in 4% PFA and cryoprotected in 0.1M PBS containing 30% of sucrose. Coronal sections (30  $\mu$ m) were obtained using a cryostat and processed for immunolabeling using three anti-AR primary antibodies: sc816 (Santa Cruz Biotechnology), ab133273 (Abcam) and PG21 Upstate 06-680 (Sigma-Aldrich). Two different immunohistochemistry protocols were performed, using diaminobenzidine (DAB) or fluorescence for the staining. All the tests were paired with some sections without incubation with the primary antibody, in order to check the specificity of the secondary antibody used.

## RESULTADOS.

We started our test using colorimetric immunohistochemistry as it is more sensitive than immunofluorescence. The first test revealed that ab133273 staining was the best one of the 3 tested antibodies. A second test was done where we tried to reduce background noise but we also reduced the signal therefore the ratio background/signals was not optimal. Our next step will be to use Nickel-DAB revelation which should enhance the staining. Nevertheless, we then try the antibody by immunofluorescence since the next step will be to perform double labeling immunofluorescence against AR and specific markers for neurons (Neurofilament 200) or glial cells (GFAP). We also succeeded in getting staining by immunofluorescence but improvements are also needed.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Although more tests are needed, we have succeeded in finding an antibody that detects AR. To go further, the specificity of ab133273 antibody in neural AR KO adult male mice tissue will be checked. The next step will be the establishment of the double immunofluorescence to provide anatomical evidence of the neural cellular targets of AR mediated androgen signaling in adult male mice.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mhaouty-Kodja, S. (2018). Role of the androgen receptor in the central nervous system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 465, 103–112.
- (2) Trouillet, A.-C., Ducroq, S., Naulé, L., Capela, D., Parmentier, C., Radovick, S., Hardin-Pouzet, H., & Mhaouty-Kodja, S. (2022). Deletion of neural estrogen receptor alpha induces sex differential effects on reproductive behavior in mice. *Communications Biology*, 5.
- (3) Raskin, K., de Gendt, K., Duittoz, A., Liere, P., Verhoeven, G., Tronche, F., & Mhaouty-Kodja, S. (2009). Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: Effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *Journal of Neuroscience*, 29, 4461–4470.

# IDENTIFICACIÓN DE DÉFICITS EN EL RECONOCIMIENTO INDIVIDUAL EN UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

*Cebrián-Ferreras M<sup>1</sup>, Teruel-Sanchis A<sup>1</sup>, Savarelli-Balsamo C<sup>2</sup>, Vila-Martín ME<sup>1</sup>, Teruel-Martí V<sup>2</sup>, Lanuza E<sup>1</sup>*

*1. Departamento de Biología Celular, Funcional y Antropología Física, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València. 2. Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universitat de València.*

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de deterioro cognitivo y se caracteriza por una degeneración neurológica progresiva. La causa de la enfermedad en la mayoría de los casos es desconocida, pero en algunos casos se hereda a través de mutaciones en genes como presenilina 1, presenilina 2 y proteína precursora de amiloide. Varios estudios han sugerido que los déficits de memoria observados en las primeras etapas de AD se debe a la codificación ineficaz de la nueva información. Se han desarrollado diferentes modelos animales con mutaciones genéticas similares a las humanas, como el modelo de triple transgénico de AD (B6;129-Tg(APP<sup>Swe</sup>,tauP301L)1Lfa Psen1<sup>tm1Mpm</sup>/Mmjax), que nos permiten estudiar en roedores la patología (O Oddo, 2003). En este modelo, el reconocimiento individual se basa en el patrón de proteínas urinarias (MUPs) presentes en las marcas de orina y detectados por el sistema vomeronasal (Hurst, 2001).

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Se evaluó la capacidad de reconocimiento individual de hembras de 3xTg AD de 2-4 y 7-9 meses de edad. Durante 4 días, las hembras fueron habituadas al paradigma presentando botes con viruta limpia. Durante los siguientes días de entrenamiento, se presentó orina de dos machos conoespecíficos para familiarizarse. El día de test, una de las orinas fue reemplazada por orina de un macho novedoso. La conducta fue analizada con DeepLabCut (Mathis, 2018), un software que utiliza herramientas de deep learning para estimar la posición de un animal en cada fotograma. Los datos obtenidos fueron procesados en Python y se consideró exploración positiva cuando la cabeza del animal estaba dentro de una región de interés. Se calculó un índice de discriminación para comparar la cantidad de tiempo explorando cada bote y determinar si hubo una preferencia por el bote novedoso o por el viejo.

## RESULTADOS.

El estudio mostró que los ratones de 2-4 meses, sin fenotipo de la EA, identificaron el olor del macho novedoso, como indica un índice de discriminación significativamente mayor a 0. Sin embargo, a los 7-9 meses los individuos exploran ambos estímulos por igual, indicando un déficit en el reconocimiento individual. La histopatología nos indica una ausencia completa de los marcadores beta amiloide y tau a los 3 meses. A los 9 meses identificamos la patología, pero el fenotipo varía mucho entre individuos, siendo completo a partir de los 12 meses.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

La prueba de conducta de reconocimiento individual y análisis de DeepLabCut permiten identificar un deterioro cognitivo en el modelo 3xTgAD. Sin embargo, es importante considerar

la variabilidad entre individuos. En este sentido, en futuros estudios analizaremos si existe una correlación entre los marcadores neuropatológicos y el déficit cognitivo. Los pacientes de Alzheimer también muestran un déficit en el reconocimiento individual, y aunque en humanos éste se basa en pistas visuales, estudios previos han mostrado que tanto la información visual como la vomeronasal se procesa posteriormente en el circuito entorrino-hipocámpico (Villafranca-Faus, 2021), lo que sugiere similitudes entre el modelo animal y la patología que vale la pena investigar.

## BIBLIOGRAFÍA

Hurst, J.L., Payne, C.E., Nevison, C.M., Marie, A.D., Humphries, R.E., Robertson, D.H.L., Cavaggioni, A., Beynon, R.J. (2001). Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature*, 414(6864), 631-4. doi: 10.1038/414631a. PMID: 11740558.

Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K.M., Abe, T., Murthy, V.N., Mathis, M.W., Bethge, M. (2018). DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat Neurosci*, 21, 1281–1289. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0209-y>

O Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409-21. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00434-3. PMID: 12895417.

Villafranca-Faus, M., Vila-Martín, M.E., Esteve, D., Merino, E., Teruel-Sanchis, A., Cervera-Ferri, A., Martínez-Ricós, J., Lloret, A., Lanuza, E., Teruel-Martí, V. (2021). Integrating pheromonal and spatial information in the amygdalo-hippocampal network. *Nat Commun*, 12(1):5286. doi: 10.1038/s41467-021-25442-5. PMID: 34489431; PMCID: PMC8421364

# COGNITIVE, IMMUNOLOGICAL AND RECEPTOR CHANGES IN A MURINE MODEL OF NMDAR ENCEPHALITIS BY ACTIVE IMMUNIZATION

Marmolejo L<sup>1</sup>, Maudes E<sup>1</sup>, Planagum J<sup>1</sup>, Radosevic M<sup>1</sup>, García-Serra A<sup>1</sup>, Mannara F<sup>1</sup>, Dalmau J<sup>1,2</sup>

1 Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona 2 Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Departament of Neurology, University of Pennsylvania

## INTRODUCCIÓN

Anti-N-Methyl-D-Aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a neurological disorder mediated by antibodies against an extracellular epitope of the NMDAR-GluN1 subunit (Dalmau, 2008; (Dalmau & Graus, 2018). Previous studies showed that patients' antibodies against NMDAR are pathogenic, as they cause neuronal dysfunction in vitro, and molecular and behavioral changes in mouse models of intracerebral transfer of antibodies (Planagumà, 2017). Here we aimed to determine the pathogenic mechanisms using an active immunization model.

## MATERIAL Y MÉTODOS

8-week-old female C57BL/6 mice were immunized with GluN1 peptide or saline, along with AddaVax adjuvant and Bordetella pertussis toxin, and were boosted at day 28. NMDAR antibodies were detected by cell-based assays (CBA). Brain tissue immunological infiltrates and effects of antibodies were assessed at 42 days with confocal imaging and electrophysiology. Activation of spleen-derived B and T cells after exposure to the peptide was measured by Elispot. Memory and behavioral alterations were assessed with a standard panel of tests: Novel Object Location (memory), Prepulse Inhibition (psychotic-like behaviour), and video-recording (stereotypies and abnormal movements).

Differences in the number of infiltrate cells, IgG deposits, and NMDAR cluster density were analyzed using independent t-tests or a 2-way analysis of variance with Bonferroni correction, as appropriate. The number of spots/mm was used to graphically quantify the differences between groups. Behavioral tests were analyzed using a longitudinal linear model of fixed effects. The alpha level used to determine significance was  $p < 0,05$ . Statistical tests and graphs were performed using Prism (v7; GraphPad Software, San Diego, CA) and R studio (v4.0.0).

## RESULTADOS

NMDAR antibodies were detected in the serum and CSF of immunized mice, but not controls. Compared with control mice, immunized mice showed brain infiltrates of CD79+/CD138+ plasma cells and CD4+ Th cells, as well as increased deposits of IgG. Elispot revealed increased levels of interferon gamma in immunized mice, suggesting increased T-helper cell activation compared to controls. These findings were associated with a significant decrease of NMDAR clusters, impairment of hippocampal long-term potentiation, and accompanying symptoms, including memory deficit, psychotic-like behavior, and stereotypies.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

This model of active immunization causes immunological and molecular alterations similar to those observed with antibodies from patients with anti-NMDAR encephalitis, expanding the previously existing models. The model will help to determine the immunobiology of the disease and how pharmacological interventions (e.g., allosteric modulation of NMDAR) can be used as an adjuvant to immunotherapy.

## BIBLIOGRAFÍA

Dalmau, J., Gleichman, A. J., Hughes, E. G., Rossi, J. E., Peng, X., Lai, M., Dessain, S. K., Rosenfeld, M. R., Balice-Gordon, R., & Lynch, D. R. (2008). Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *The Lancet. Neurology*, 7(12), 1091–1098. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70224-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70224-2)

Dalmau, J., & Graus, F. (2018). Antibody-Mediated Encephalitis. *The New England journal of medicine*, 378(9), 840–851. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1708712>

Planagumà, J., Leypoldt, F., Mannara, F., Gutiérrez-Cuesta, J., Martín-García, E., Aguilar, E., Titulaer, M. J., Petit-Pedrol, M., Jain, A., Balice-Gordon, R., Lakadamyali, M., Graus, F., Maldonado, R., & Dalmau, J. (2015). Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain : a journal of neurology*, 138(Pt 1), 94–109. <https://doi.org/10.1093/brain/awu310>

# INTOXICACIÓN POR BIOTOXINAS MARINAS BAJO UN ENFOQUE 'ONE HEALTH'

*Salvador Jáimez Alcántara*

*Universidad de Córdoba.*

## INTRODUCCIÓN

La ciguatera es una intoxicación alimentaria causada por la ingesta de pescado contaminado con ciguatoxinas, una zoonosis endémica en los trópicos y subtrópicos, de creciente presentación en la Unión Europea.

Está considerada, actualmente, como la intoxicación por biotoxinas marinas más común a nivel mundial (50.000 – 200.000 casos/año).

La movilidad, la globalización del comercio y el calentamiento global están ayudando a su expansión.

La enfermedad fue descrita por el navegante James Cook en 1.774, estando muy localizada en zonas costeras de la cuenca del Pacífico, Océano Índico y el Mar Caribe. Actualmente, la zona de riesgo comprende entre las latitudes 35°S a 35°N, donde se encuentran islas europeas como el archipiélago canario o la isla de Madeira (Portugal).

## OBJETIVOS

1. Caracterizar la enfermedad.
2. Determinar su incidencia en España y Europa.
3. Promocionar el Proyecto Eurocigua.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica.

## RESULTADOS

Existen varios tipos de ciguatoxinas que son sintetizadas por microalgas dinoflageladas (*Gambierdiscus toxicus*). Estas viven en el fondo marino, adheridas a corales y algas macroscópicas, entrando a formar parte de la cadena trófica marina a través de los peces que se alimentan de estas.

Dichas toxinas no les afectan ni son eliminadas, por lo que su concentración se amplifica, teniendo un riesgo considerable para la salud en peces de mayor tamaño (> 2kg) como son el picudo, abade, mero o pez espada, entre otros (peces ciguatos).

Además, las toxinas son termoestables (no las destruye ni la congelación ni el cocinado) e incoloras, inodoras e insípidas, lo que las convierte en inapreciables por los sentidos.

La sintomatología humana puede aparecer en las primeras 12-24 horas postingesta con síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea) y neurológicos (parestesia y

disestesia). Los síntomas cardiovasculares (bradicardia o taquicardia e hipotensión) son menos frecuentes.

Tras esta fase aguda (4º día), pueden perdurar el picor, la debilidad muscular, o la cefalea hasta varios meses. En este período o fase de reagudización puede aparecer un nuevo cuadro clínico tras el consumo de carne de pescado, alcohol, nueces, cafeína, carne de pollo o cerdo o por ejercicio físico excesivo.

El diagnóstico es sintomático y en base a la dieta, teniendo que considerar otras intoxicaciones como la marea roja o la causada por tetrodotoxina (peces globo, Fugu, peces erizo).

La prevención consiste en evitar el consumo de peces que provengan de zonas tropicales y subtropicales, especies de gran tamaño y sus vísceras (hígado, huevas, pieles y cabezas).

Además, en el archipiélago canario, desde 2015, es considerada como enfermedad de declaración obligatoria con el fin de dar mayor protección al consumidor.

En este contexto, se ha llevado a cabo desde 2016 el Proyecto Eurocigua, cofinanciado por la EFSA y coordinado, entre otros, por la AESAN, para caracterizar el riesgo por Ciguatera en la Unión Europea, participando 15 instituciones europeas de seis Estados miembros (España, Portugal, Francia, Alemania, Grecia y Chipre).

## DISCUSIÓN

El Proyecto EuroCigua ha evidenciado presencia de peces ciguatóxicos autóctonos en Canarias y Madeira (Portugal), así como Gambierdiscus en el mar Mediterráneo (Baleares), lo que confirma la emergencia del riesgo en la Unión Europea.

## BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) (2020). GP/EFSA/AFSCO: Workshop Eurocigua. [Vídeo].

Youtube: [https://www.youtube.com/watch?v=sgllrQlo\\_C0](https://www.youtube.com/watch?v=sgllrQlo_C0)

Proyecto Eurocigua (AESAN). (2022, Noviembre). Risk chracterization of ciguatera food poisoning in Europe.

[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/ciguatera/home/aecosan\\_home\\_ciguatera.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/ciguatera/home/aecosan_home_ciguatera.htm)

Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Canarias (2022, Noviembre). Ciguatera.

[https://www.gobiernodecanarias.org/pesca/temas/Control\\_calidad\\_productos/ciguatera.html](https://www.gobiernodecanarias.org/pesca/temas/Control_calidad_productos/ciguatera.html)

Food and Agriculture Organizartion of the United Nations (FAO) / World Health Organization (WHO) (2020): Report of the Expert Meeting on Ciguatera Poisoning

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332640/9789240006294-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Codex Alimentarius Commission (2017) Side evento on relevant work to be considered for ciguatoxins.



<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-11%252FSIDE-EVENTS%252FCiguatera.pdf>

Friedman, M. et al. (2017). An Updated Review of Ciguatera Fish Poisoning: Clinical, Epidemiological, Environmental, and Public Health Management. *Mar. Drugs* 2017, 15(3), 72. <https://doi.org/10.3390/md15030072>

Ryder, J., Iddya, K., Ababouch, L. (2014). Assessment and managements of seafood safety and quality: Current practices and emerging issues. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*; Rome N° 574, (2014).

European Food Safety Authority (EFSA) (2010). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1627>

# GENERACIÓN DE ADHESINAS SINTÉTICAS BIESPECÍFICAS EN ESCHERICHIA COLI DIRIGIDAS CONTRA ANTÍGENOS TUMORALES DE SUPERFICIE CELULAR.

*Anguiano I.*

*Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).*

## INTRODUCCIÓN

La terapia contra el cáncer basada en bacterias es una estrategia prometedora. No obstante, para emplear este tipo de aproximaciones es necesario conseguir que las bacterias se adhieran específicamente a células tumorales. En este sentido, recientemente se han hecho avances como el diseño de adhesinas sintéticas (SAs). Las SAs son proteínas que se insertan en la membrana externa de las bacterias y permiten expresar en su superficie un nanoanticuerpo capaz de reconocer a un determinado antígeno de superficie tumoral. Se ha conseguido generar y expresar en cepas de *Escherichia coli* SAs contra EGFR y HER2 (dos antígenos frecuentemente sobreexpresados en ciertos tipos de tumores epiteliales). Sin embargo, surge el problema de las mutaciones espontáneas en tumores. En caso de que las células tumorales mutasen o dejarasen de expresar bien EGFR o bien HER2, las bacterias modificadas con las SAs contra estos antígenos dejarían de adherirse con afinidad aumentada a las células tumorales. Como solución a este problema, en este proyecto se plantea la generación de adhesinas sintéticas biespecíficas, capaces de unirse tanto a EGFR como a HER2, y que, por tanto, podrán adherirse a células tumorales que expresen EGFR y/o HER2.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se generarán plásmidos integrativos, capaces de insertar una secuencia en la posición deseada del cromosoma bacteriano de *E. coli* (3' del gen *flu*, una adhesina natural). Lo que insertemos en esta posición codificará por el dominio que se expone en la superficie de *E. coli*. En nuestro caso, estos plásmidos contendrán la secuencia de dos nanoanticuerpos (uno contra HER2 y otro contra EGFR), unidos por un linker peptídico. Diseñaremos diferentes SAs biespecíficas variando el orden de los nanoanticuerpos y la longitud del linker peptídico entre ellos. Tras la generación de los plásmidos (mediante amplificación por PCR de las secuencias necesarias y ligación por el método de Gibson Assembly), modificaremos genéticamente cepas bacterianas de *E. coli* mediante conjugación bacteriana de los plásmidos e integración en el cromosoma bacteriano. A continuación, comprobaremos la correcta expresión de las adhesinas mediante Western Blot, y su correcta unión a antígenos EGFR y HER2 purificados mediante citometría de flujo. Por último, realizaremos un ensayo de adhesión, en el que infectaremos líneas celulares que sobreexpresen EGFR o HER2 con las cepas bacterianas modificadas, y observaremos si las bacterias quedan adheridas mediante microscopía de fluorescencia.

## RESULTADOS

A continuación, enumeramos los resultados esperados en este proyecto. Por un lado, esperamos que la generación de las SAs, su expresión por parte de las cepas bacterianas y su funcionalidad sean correctos, lo cual se observará en los resultados positivos del Western Blot y la citometría de flujo. En cuanto al ensayo de adhesión, esperamos que las bacterias modificadas con las SAs biespecíficas sean capaces de unirse a líneas celulares que sobreexpresen EGFR o HER2.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Si las bacterias modificadas para expresar SAs biespecíficas son capaces de unirse a células tumorales que expresan únicamente EGFR o únicamente HER2, habremos sorteado la limitación que tenían las SAs mono-específicas con relación a las mutaciones espontáneas en tumores.

## BIBLIOGRAFÍA

Piñero-Lambea, C., Bodelón, G., Fernández-Periáñez, R., Cuesta, A. M., Álvarez-Vallina, L., & Fernández, L. Á. (2015). Programming controlled adhesion of *E. coli* to target surfaces, cells, and tumors with synthetic adhesins. *ACS Synthetic Biology*, 4(4), 463-473. doi:10.1021/sb500252a

Salema, V., & Fernández, L. Á. (2017). *Escherichia coli* surface display for the selection of nanobodies. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1468-1484. doi:10.1111/1751-7915.12819

Salema, V., Mañas, C., Cerdán, L., Piñero-Lambea, C., Marín, E., Roovers, R. C., et al. (2016). High affinity nanobodies against human epidermal growth factor receptor selected on cells by *E. coli* display. *mAbs*, 8(7), 1286-1301. doi:10.1080/19420862.2016.1216742

Salema, V., Marín, E., Martínez-Arteaga, R., Ruano-Gallego, D., Fraile, S., Margolles, Y., et al. (2013). Selection of single domain antibodies from immune libraries displayed on the surface of *E. coli* cells with two  $\beta$ -domains of opposite topologies. *PloS One*, 8(9), e75126. doi:10.1371/journal.pone.0075126

# Discovery of de novo cyclic peptides for linear ubiquitin chains using rapid technology.

*Irene Olivas Cano*

*University of Copenhagen*

## INTRODUCCIÓN

Ubiquitin is a small, very stable protein associated to a wide range of functions, including protein degradation in association with the proteasome, and DNA repair, among others. The target of this project, M1-linked 'linear' ubiquitin is mainly linked to inflammation signalling, but drug-like molecules to bind and modulate linear ubiquitin are needed to fully understand its biology.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Biotinylated protein was produced and purified for selection. Cyclic peptide libraries were generated by a combination of PURE system (in vitro *Escherichia coli* translation machinery) and flexizyme. Flexizyme is an unnatural ribozyme able to load amino acid-like molecules onto tRNA for subsequent incorporation to the peptide (Murakami et al., 2006). This allows for amino acid substitutions for other molecules, also known as genetic code reprogramming. All sequences were initiated with a phenylalanine residue loaded with a chloroacetyl group and terminated with a cysteine residue. These amino acids form a disulfide bond, irreversibly cycling the peptide. Random non-standard peptides integrated discovery (RaPID) technology is an innovative selection method that allows screening of a trillion - cyclic peptide libraries for binding molecules (Passioura & Suga, 2017). These peptides have great potential as drug-like molecules due to their binding ability and chemical stability. Furthermore, they have been successfully used with other ubiquitin chains. Results are received in the form of DNA, which is analysed via qPCR to calculate positive sample-negative control ratio. DNA sequencing is used to identify the peptide-encoding sequences corresponding to best binders.

## RESULTADOS

Protein production and purification gave rise to a sufficient amount of appropriately-tagged protein attached to biotin (essential for physical support during selection). Selection against different lengths of linear ubiquitin chains (four and eight monomers) resulted in enriched peptide sequences over six to eight rounds of selection. These sequences correspond to better binders than the rest of peptides in the library. Remarkably, an amino acid motif found in peptides binding other ubiquitin chains (such as Lys48-linked ubiquitin) was observed in most of the linear ubiquitin results (Dreier et al., 2022; Rogers et al., 2020).

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Linear ubiquitin is a key element in most eukaryotic organisms, including humans. However, few tools are available for linear ubiquitin studies, and a new approach was required. RaPID technology was successfully used for the discovery of cyclic peptides binding different lengths of ubiquitin chains. There is a wide range of possibilities to consider about this interaction. Linear ubiquitin is found in flexible, very open chains which can adopt many different conformations in solution. Their lack of quaternary structure might stand in the way of peptide interaction given monomers are apart and likely independent from each other. However, the remarkable flexibility of these chains could allow for structure adaptation upon peptide binding. Therefore, further details about protein-peptide interaction need to be elucidated.

## BIBLIOGRAFÍA

Dreier, J. E., Prestel, A., Martins, J. M., Brøndum, S. S., Nielsen, O., Garbers, A. E., Suga, H., Wouter Boomsma, ·, Rogers, J. M., Hartmann-Petersen, R., Birthe, ·, & Kragelund, B. (2022). A contextdependent and disordered ubiquitin-binding motif. *79*, 484. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04486-w>

Murakami, H., Ohta, A., Ashigai, H., & Suga, H. (2006). A highly flexible tRNA acylation method for non-natural polypeptide synthesis. *Nature Methods*, *3*(5), 357–359. <https://doi.org/10.1038/NMETH877>

Passioura, T., & Suga, H. (2017). A RaPID way to discover nonstandard macrocyclic peptide modulators of drug targets. *Chemical Communications*, *53*(12), 1931–1940. <https://doi.org/10.1039/C6CC06951G>

Rogers, J. M., Nawatha, M., Lemma, B., Vamisetti, G. B., Livneh, I., Barash, U., Vlodaysky, I., Ciechanover, A., Fushman, D., Suga, H., & Brik, A. (2020). In vivo modulation of ubiquitin chains by highly non-proteinogenic cyclic peptides.

# Potencial antiinflamatorio del género *Harpagophytum*

Jose Alejandro Bernabeu Martínez (1); Fernando Mialdea Branchat (2)

Universitat de València

## INTRODUCCIÓN

El género *Harpagophytum* es una planta herbácea de la familia de las pedaliáceas originaria de África Meridional y Oriental y se obtiene mayoritariamente de Namibia, en cantidades menores de Sudáfrica y Botswana. Este género incluye las especies *Harpagophytum procumbens*, conocido como "garra del diablo", y *Harpagophytum zeyheri*. Tradicionalmente, ha sido utilizada como antiinflamatoria y analgésica. De acuerdo con la Farmacopea Europea y Británica, la droga de mayor interés es *Harpagophytum radix*, que consiste en las raíces secundarias tuberosas troceadas, desecadas y con un contenido mínimo de un 1,2% de harpagósido (respecto a la droga seca).

## MATERIAL Y MÉTODOS.

La bibliografía se obtuvo mediante las siguientes bases de datos online: PubMed, Scopus y Web of Science. Se utilizaron los términos de búsqueda: *Harpagophytum*, Devil's Claw y clinical trials. Como límites se emplearon que su fecha de publicación sea superior al año 2000 y que sean publicaciones de acceso abierto.

## RESULTADOS.

Siguiendo la estrategia de búsqueda indicada anteriormente, se obtuvieron 36 resultados. Después de realizar de nuevo un filtrado, según su calidad, se seleccionaron 9 artículos, todos ellos ensayos clínicos de calidad donde se utilizaba la planta de interés.

## DISCUSIÓN / CONCLUSIONES

Los ensayos se hacían sobre diferentes patologías, todas relacionadas con la inflamación, como artritis, osteoartritis, dolor de espalda, de rodilla... pero todos coinciden en sus conclusiones en que el harpagósido es eficaz en las dolencias estudiadas, además de aportar efectos beneficiosos, como producir menores efectos adversos que algunos fármacos con los que se compara, la reducción de dosis de antiinflamatorios para tratar las patologías... De manera que se puede concluir que el harpagofito es una opción a tener en cuenta en estas patologías y en pacientes que se puedan beneficiar de sus ventajas.

## BIBLIOGRAFÍA

Menghini, L.; Recinella, L.; Leone, S.; Chiavaroli, A.; Cicala, C.; Brunetti, L.; Vladimir-Knezevic, S.; Orlando, G.; Ferrante, C. Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) and chronic inflammatory diseases: A concise overview on preclinical and clinical data. *Phytother. Res.* 2019, 33, 2152–2162. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

Chrubasik, S.; Conradt, C.; Black, A. The quality of clinical trials with *Harpagophytum procumbens*. *Phytomedicine* 2003, 10, 613–623. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]

Suter, A.; Whittaker, P.; Dickson, S.; McIntyre, L.; Tan, J. Positive influence of a *Harpagophytum procumbens* preparation on different rheumatic complaints—Results from clinical trial. *Planta Med.* 2006, 72, P\_200. [Google Scholar] [CrossRef]

Farpour HR, Rajabi N, Ebrahimi B. The Efficacy of Harpagophytum procumbens (Teltonal) in Patients with Knee Osteoarthritis: A Randomized Active-Controlled Clinical Trial. Xing G, editor. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 19 de octubre de 2021;2021:5596892.