



II SIMPOSIO DE

**TERAPIAS
AVANZADAS
Y
TECNOLOGÍAS
BIOMÉDICAS**

**LIBRO DE ABSTRACTS
*ABSTRACT BOOK***

17 DICIEMBRE 2021

Salón de Actos de la Facultad de Medicina
Universidad de Granada

ORGANIZA:

 **ibs.GRANADA**
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA

PROGRAMA

- **8:30h Inauguración del Simposio**
- **8:45 – 9:30h Conferencia invitada: Vectores virales y edición genómica, aliados en la lucha contra el cáncer**
 Dr. Francisco Martín Molina. Grupo de Terapia Génica y Celular. Centro Pfizer – Universidad de Granada – Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO)
- **9:30 – 10:30h Mesa 1. Terapias avanzadas: ingeniería tisular**
 1. Modesto T. López López, TEC05-Física de Interfases y Sistemas Coloidales:
Hidrogeles supramoleculares inyectables magnéticamente activos
 2. Razvan Ionut Ghinea, TEC09-Óptica de Biomateriales:
Técnicas ópticas y modelado inteligente para la evaluación y control de biomateriales biogenerados y sintéticos
 3. Antonio Campos Muñoz, TEC03-Ingeniería Tisular:
Nuevos modelos de piel artificial para su transferencia a la clínica
- **10:30 – 11:50h Mesa 2: Tecnologías y dispositivos biomédicos**
 1. Guillermo Rus Carlborg, TEC12-Biomecánica:
Why will viscosity and nonlinearity biomarkers recast elastographic clinical diagnosis?
 2. Francisco J. Gámiz Pérez, TEC04-Nanoelectrónica:
Multiplexación de sensores de grafeno para diagnóstico precoz
 3. Jesús María Villar del Moral, TEC13-Cirugía Avanzada:
Ensayo Ligradis: una respuesta conjunta para una vieja pregunta
 4. Saúl Abenhamar Navarro Marchal, TEC16-Terapias Avanzadas: Diferenciación, Regeneración y Cáncer:
Nanodispositivos inteligentes dirigidos frente a células madre cancerígenas"
- **11:50 – 12:40h Conferencia invitada: Traslación clínica de productos de terapias avanzadas**
 Dra. Natividad Cuende Melero. Coordinación Autonómica de Trasplantes.
- **12:40 – 14:00h Mesa 3. Farmacología, salud y grupos emergentes**
 1. Antonio Salmerón García, TEC01-Práctica segura en el uso de medicamentos:
En la frontera del conocimiento en la actual Farmacia Hospitalaria: de la seguridad y eficacia de los medicamentos biológicos/biotecnológicos a la farmacogenética
 2. Miriam Cerván Martín, TEC14-Reproducción Humana y Enfermedades Hereditarias y Complejas:
Esterilidad masculina idiopática como rasgo complejo: contribución de la variación común del genoma
 3. Salvador Arias Santiago, TECe19-Dermatología Clínica y Traslacional (Emergente):
Dermatología Clínica y Traslacional: proyectos destacados
 4. María Victoria Cano Cortés, TECe18-Nanochembio (Emergente)
Avances recientes en el desarrollo de estrategias nanotecnológicas con fines diagnóstico y terapéutico
- **14:00h Cierre de la jornada y conclusiones finales**

17 DICIEMBRE

II SIMPOSIO DE

TERAPIAS AVANZADAS
TECNOLOGÍAS BIOMÉDICAS

ibs.GRANADA
INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
BIOSANITARIA

ABSTRACTS PRESENTADOS EN FORMATO PÓSTER

*ABSTRACTS PRESENTED
AS POSTERS*

EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE HIDROGELES MAGNÉTICOS SUPRAMOLECULARES CON APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

Cristina Gila-Vilchez^{1,2}, Mari C. Mañas-Torres^{2,3}, Francisco Vazquez-Perez¹, Miguel Alaminos^{2,4}, Luis Álvarez de Cienfuegos^{2,3}, Modesto T. Lopez-Lopez^{1,2}

¹ Universidad de Granada, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, 18071 Granada, España.

² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, España.

³ Universidad de Granada, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, 18071 Granada, España.

⁴ Universidad de Granada, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, 18071 Granada, España.

Los hidrogeles supramoleculares formados por péptidos de cadena corta han encontrado recientemente varias aplicaciones biomédicas debido a sus interesantes propiedades, tales como alta porosidad, alto contenido de agua, biocompatibilidad o biodegradabilidad. Además, la inclusión de nanopartículas magnéticas (MNP) en la red de péptidos da lugar a hidrogeles supramoleculares magnéticos con un control preciso de las propiedades mecánicas y la estructura interna mediante la aplicación de campos magnéticos externos [1]. Así, estos hidrogeles capaces de autoensamblarse mediante interacciones no covalentes se han convertido en excelentes candidatos para la construcción de biomateriales inteligentes y funcionales.

En este trabajo se estudió en detalle un ferrogel biocompatible y biodegradable elaborado por péptidos cortos de fluorenilmetoxicarbonil-difenilalanina (Fmoc-FF) y Fmoc-arginina-glicina-ácido aspártico (Fmoc-RGD) desde un punto de vista físico-químico y mecánico [2]. Para ello se realizó una caracterización morfológica, microestructural y mecánica completa de los hidrogeles supramoleculares que contienen NPM. Nuestros resultados muestran un refuerzo de las propiedades mecánicas de los ferrogeles, así como propiedades de autocuración rápida cuando se someten a inyección, en comparación con los hidrogeles no magnéticos. Por lo tanto, dan como resultado ferrogeles supramoleculares biocompatibles y no tóxicos con mejores propiedades mecánicas y capacidad de inyectarse sin separación de fases. Gracias a esta combinación de propiedades superiores se pueden utilizar como andamios 3D para el crecimiento celular, siendo biomateriales ideales para aplicaciones biomédicas *in vivo* utilizando una cirugía mínimamente invasiva.

Agradecimientos:

Proyecto PID2020-118498GB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033 (España). Ayuda FPU17/00491 financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y FSE" El FSE invierte en tu futuro" y por la Universidad de Granada.

Referencias:

[1] R. Contreras-Montoya *et al.* 2018 *Mater. Chem. Front.* **2**, 686-699.

[2] M. C. Mañas-Torres *et al.* 2021 *ACS Appl. Mater. Interfaces* **13**, 49692-49704.

POTENCIAL REGENERATIVO ÓSEO EN DISTINTAS ÁREAS DE DEFECTOS CRÍTICOS EN CALOTA DE CONEJO: ZONA PERICRANEAL VS DURAMADRE

Cristina Vallecillo¹, Aida Gutierrez-Corrales², Manuel Toledano-Osorio¹, Marta Vallecillo-Rivas¹, María-Ángeles Serrera-Figallo², Raquel Osorio¹

1. Departamento de Odontología, Facultad de Odontología, Universidad de Granada, Colegio Máximo de Cartuja s/n, 18071 Granada, España.

2. Departamento de Odontología, Facultad de Odontología, Universidad de Sevilla, Avicena s/n, 41009, Sevilla, España.

Antecedentes: La Regeneración Ósea Guiada (ROG) es una técnica basada en el uso de membranas que actúan como barreras físicas evitando la infiltración, en la zona de reparación, de componentes celulares (células epiteliales y conjuntivas) distintos a células osteopromotoras. Se ha demostrado que tanto el hueso perilesional como la duramadre contribuye a la reosificación de los defectos calvariales, siendo la duramadre la fuente de hueso nuevo central. Es importante determinar los eventos espaciales de curación a diferentes distancias de la membrana de ROG, con el fin de proporcionar evidencia sobre la bioactividad y la influencia del entorno del defecto en la actividad osteogénica de las mismas.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de regeneración ósea de nuevas membranas nanoestructuradas cargadas con sílice y dopadas con zinc o doxiciclina en defectos óseos críticos creados en calota de conejo. Las áreas a enfrentar fueron la próxima a la membrana de regeneración y la zona próxima a la duramadre.

Materiales y métodos: Membranas nanoestructuradas de (MMA)1-co-(HEMA)1/(MA)3-co-(HEA)2 fabricadas mediante un proceso de electrohilado y cargadas con un 5% en peso de nanopartículas de SiO₂ (HOOC-Si-Membrana) fueron dopadas con zinc (Zn-HOOC-Si-Membrana) o doxiciclina (Dox-HOOC-Si-Membrana). Estas membranas se colocaron cubriendo los defectos óseos preparados en los cráneos de seis conejos. Después de seis semanas, se emplearon análisis histológicos (técnica de azul de toluidina) para determinar la regeneración ósea. Se calcularon los porcentajes de hueso recién formado, hueso osteoide y tejido blando en cada defecto a nivel del área total del defecto y dividiendo el área total del defecto en regiones superior e inferior o regiones central y periférica. Las seis zonas de estudio, que cubrían el área total del defecto, incluían la superior (cercana a la membrana), inferior (cercana a la duramadre), periférica (adyacente al hueso viejo) y central (la suma de las restantes zonas) regiones del defecto.

Resultados: El mayor potencial osteogénico se encontró en las zonas laterales del defecto demostrando la influencia del hueso perilesional en la regeneración. Al comparar la zona superior del defecto (en contacto con la membrana) frente a la zona inferior (en contacto con la duramadre), se observó que tanto en el grupo control (no membrana) como Dox-HOOC-Si-Membrana se produjo mayor formación ósea en la zona inferior mientras que al emplear Zn-HOOC-Si-Membrana y HOOC-Si-Membrana la formación de hueso fue mayor en la zona superior. En general, hubo un potencial osteogénico mayor en la zona vecina a la membrana que en la próxima a la duramadre.

Conclusiones: El potencial osteoregenerador fue mayor en la zona del defecto próxima a la membrana nanoestructurada. La formación de hueso nuevo debajo de la membrana ROG debe analizarse, por separado, en regiones específicas del defecto, ya que los resultados encontrados pueden enmascarar posibles diferencias entre membranas.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional [Proyecto PID2020-114694RB-I00]. M.T.-O. tiene una beca FPU del Ministerio de Universidades [FPU20 / 00450].

SHORT VERSUS STANDARD IMPLANTS AT SINUS AUGMENTED SITES: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

Enrique Fernández-Romero¹, Cristina Vallecillo¹, Marta Vallecillo-Rivas¹, Manuel Toledano-Osorio¹, Raquel Osorio¹, María T. Osorio¹, Christopher D. Lynch², Raquel Osorio¹, Manuel Toledano¹

1. Faculty of Dentistry, Dental Materials Section, University of Granada, Colegio Máximo de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain.

2. Restorative Dentistry, University Dental School & Hospital, University College Cork, Wilton, T12 E8YV Cork, Ireland

Introduction: Reduced alveolar bone height after extraction of teeth and maxillary sinus pneumatization not only limits the placement of standard length implants but also increases the risk of damage to anatomical structures. As an alternative to more complicated augmentation procedures, short dental implants are being increasingly used in case of vertical alveolar bone height insufficiencies.

Aim: To assess whether short dental implants can be used as an alternative to standard length implants with sinus augmentation procedures in patients with edentulous posterior atrophic maxilla, in terms of implant survival and marginal bone loss (MBL).

Data, Sources and Study selection: Comprehensive electronic and manual literature searches were performed across PubMed, EMBASE, Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL) and WOS to identify randomized controlled trials. A total of fourteen studies were selected for data extraction. Weighted means were calculated. Heterogeneity was determined using Higgins (I^2). A random-effects model was applied. When short implant and standard length implants with sinus augmentation procedures were compared, implant survival was 1.83 ranging from 0.72 to 4.63 (confidence interval 95%) for standard implants. Heterogeneity was $I^2 = 16\%$ and the significance of the random effect model $p = 0.20$. MBL resulted in 0.11 ranging from 0.01 to 0.20 and $p = 0.03$ ($I^2 = 78\%$) after a follow-up period of ≤ 1 year and 0.23 ranging from 0.07 to 0.39 and $p = 0.005$ ($I^2 = 74\%$) after > 1 year of follow-up, indicating that MBL was significantly higher in standard length implants. Secondary outcomes were found.

Conclusion: in patients with edentulous posterior atrophic maxilla, both treatment alternatives obtained satisfactory clinical results. However, MBL was significantly higher in patients treated with standard length implants.

Acknowledgements: This work was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund [Project PID2020-114694RB-I00]. M.T.-O. holds a FPU fellowship from the Ministry of Universities [FPU20/00450].

NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS COMO REACTIVOS UNIVERSALES PARA LA CODIFICACIÓN DE CÉLULAS VIVAS APLICADO A CITOMETRÍA DE MASAS

Jose Antonio Laz-Ruiz^{1,2,3}, Antonio Delgado-Gonzalez⁴, M. Victoria Cano-Cortes^{1,2,3}, Juan Jose Diaz-Mochon^{1,2,3}, Rosario M. Sanchez-Martin^{1,2,3,*}

¹ TECe18, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), Hospitales Universitarios de Granada-Universidad de Granada, Granada, 18071, España

² GENYO, Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Pfizer/Universidad de Granada/Junta de Andalucía, PTS Granada, Avda. Ilustración 114, 18016 Granada, España

³ Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica y Unidad de Excelencia de Química aplicada a Biomedicina y Medioambiente, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071, Granada, España

⁴ Fantl Lab, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA 94305–2004, EEUU

La citometría de masas es una novedosa técnica vanguardista que permite la detección de 60 marcadores por célula de manera individual. Surge de la fusión entre la citometría de flujo convencional y la espectrometría de masas (ICP-MS). Utiliza reactivos con metales conjugados en lugar de fluoróforos, como por ejemplo, anticuerpos conjugados a polímeros quelados con metales o metalointercaladores, permitiendo la identificación celular, análisis de ciclo celular o generación de códigos para el seguimiento de los distintos tipos celulares, entre otras aplicaciones. La importancia de esta última aplicación reside en la detección de la variabilidad y las fluctuaciones que se den entre muestras celulares gracias la sensibilidad de esta técnica.

Actualmente y cada vez más, se utilizan nanomateriales como nanopartículas de poliestireno, pequeños polímeros semiconductores coordinados con lantánidos (Pdots) o nanopartículas inorgánicas, como reactivos de citometría de masas. En este sentido, hemos desarrollado un reactivo universal, versátil, perdurable e inocuo constituido por nanopartículas poliméricas, conjugadas simultáneamente con un fluoróforo y un metal, nanopartículas metalofluorescentes, validando su uso en células vivas para la generación de códigos. La combinación de fluoróforos e isótopos metálicos proporciona señales únicas en citometría de flujo convencional y de masas, actuando como huellas dactilares para el seguimiento de diferentes poblaciones celulares. En este trabajo se ha evaluado la internalización celular de las nanopartículas metalofluorescentes en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 en condiciones de cocultivo, mediante citometría de flujo y masas, demostrando que lo hace de manera independiente a ningún receptor celular, validando su aplicación como reactivo universal. Además, se consiguió rastrear la señal del metal de las nanopartículas metalofluorescentes durante cuatro días, lo que demuestra la perdurabilidad de las mismas en células vivas a lo largo del tiempo. Por último, se realizaron ensayos de citotoxicidad que pusieron de manifiesto la viabilidad de las nanopartículas fluorescentes y su compatibilidad con paneles de anticuerpos marcados con metales para el análisis celular. Por lo tanto, los nanosistemas poliméricos duales, nanopartículas metalofluorescentes, desarrollados son idóneos para ensayos celulares a largo plazo, con una aplicación prometedora para la codificación de células vivas.

REMINERALIZACIÓN DE DENTINA CON PARTÍCULAS POLIMÉRICAS DOPADAS CON MELATONINA: ANÁLISIS QUÍMICO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN

María T. Osorio^{1*}; Manuel Toledano-Osorio¹; Manuel Toledano¹; Germaine Escames²; Antonio L. Medina-Castillo³; Esther Muñoz-Soto¹; Raquel Osorio¹; Modesto T. López-López⁴; Fátima S. Aguilera¹

¹ Universidad de Granada, Facultad de Odontología.

² Universidad de Granada, Facultad de Medicina. Departamento de Fisiología. CIBERFES, IBS.

³ Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento Química Analítica.

⁴ Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento Física Aplicada.

* Estudiante de Grado

El objetivo del estudio fue analizar el efecto de la aplicación de nanopartículas poliméricas dopadas con melatonina en la remineralización de la dentina radicular, mediante análisis químico. Método- 18 dientes humanos uniradiculares extraídos se someten a un tratamiento de endodoncia convencional. Antes de aplicar el cemento sellador se aplican soluciones (10 mg/mL) en PBS de NPs o ML-NPs, en un grupo control de dentina se aplica sólo PBS. Los dientes se seccionan a nivel cervical y apical, para exponer la interfaces de NPs-dentina, que se someten a estudio mediante microespectroscopía Raman, microscopio electrónico de transmisión y difracción de Rayos X tras 24 h y seis meses de almacenamiento en PBS. Resultados- Los valores de remineralización de dentina en la interfase se muestran en la tabla.

		Presencia relativa de mineral				Cristalinidad	
		Fosfato de calcio [960 cm ⁻¹]		Carbonato [1070 cm ⁻¹]		[Ratio 1020/ 1030 cm ⁻¹]	
		Concentración relativa mineral [960/1003]					
		24h	6m	24h	6m	24h	6m
Control	Cervical	16.20	25.43	74.78	38.15	9.46	0.48
	Apical	22.43	13.03	122.26	66.93	14.25	0.69
NPs	Cervical	12.82	17.14	56.33	64.98	12.75	0.76
	Apical	22.01	34.21	103.67	99.49	14.76	0.67
ML-NPs	Cervical	25.72	21.39	96.36	94.9	16.77	0.75
	Apical	33.58	31.41	110.79	105.3	17.13	0.73

La aplicación de ML-NPs produjo aumento de la concentración relativa de mineral, tanto fosfato como carbonato de calcio en los especímenes en los que se aplicaron ML-NPs. Existe formación de hidroxiapatita en forma de cristales. Raman y difracción de RX muestran mayor cristalinidad de la dentina radicular tratada con ML-NPs. Los cristales se pueden observar mediante microscopía de transmisión. Agradecimientos: Proyecto PID2020-114694RB-100 MINECO/AEI/FEDER/UE. M.T.-O. es becario FPU del Ministerio de Universidades [FPU20/00450].

REMINERALIZACIÓN DE DENTINA CON PARTÍCULAS POLIMÉRICAS DOPADAS CON MELATONINA: ESTUDIO MORFO-HISTOLÓGICO

Raquel Toledano^{1*}; Manuel Toledano-Osorio¹; Manuel Toledano¹; Fátima S. Aguilera¹; Germaine Escames²; Antonio L. Medina-Castillo³; Esther Muñoz-Soto¹; Raquel Osorio¹; Estrella Osorio¹

¹ Universidad de Granada, Facultad de Odontología.

² Universidad de Granada, Facultad de Medicina. Departamento de Fisiología. CIBERFES, IBS.

³ Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento Química Analítica.

* Estudiante de Grado

El tratamiento convencional de endodoncia conlleva una desmineralización de la dentina radicular que disminuye las propiedades mecánicas del tejido dentinario radicular, lo que en ocasiones provoca la fractura dentaria. El objetivo del estudio es evaluar la remineralización de dentina como efecto de la aplicación de nanopartículas poliméricas (NPs) dopadas con melatonina (ML), en el tratamiento de endodoncia. Método- 18 dientes humanos uniradiculares extraídos se someten a un tratamiento de endodoncia convencional. Antes de aplicar el cemento sellador se aplican soluciones (10 mg/mL) en PBS de NPs o ML-NPs, y se añade un grupo control donde se aplica sólo PBS. Los dientes se seccionan a nivel cervical y apical, para exponer la interfaces de NPs-dentina, que se someten a estudio mediante Microscopio de Fuerzas Atómicas y Microscopía Electrónica de Barrido tras 24 h y seis meses de almacenamiento en PBS. Resultados- Las interfaces de dentina aparecen sin defectos y adecuadamente selladas en los grupos tratados con ambos tipos de NPs, no ocurre así en el grupo control. Las NPs sin dopar provocan cierre de algunos túbulos con mineral amorfo, pero existen porosidades en el interior y coexisten túbulos sin ocluir y túbulos parcialmente abiertos. En los especímenes en los que se aplicaron ML-NPs el cierre tubular es completo, en algunas zonas es incluso difícil distinguir los túbulos dentinarios. El sellado de los túbulos es mejor en los especímenes tratados con ML-NPs. A los seis meses el cierre tubular y el sellado de la interfase es mejor en el grupo de especímenes de dentina tratados con NPs dopadas con melatonina.

Agradecimientos- Proyecto PID2020-114694RB-100 MINECO/AEI/FEDER/UE. M.T.-O. es becario FPU del Ministerio de Universidades [FPU20/00450].

EFICACIA DE LOS ANTIBIÓTICOS SISTÉMICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA PERIIMPLANTITIS. REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS

Marta Vallecillo-Rivas¹, Cristina Vallecillo¹, Manuel Toledano-Osorio¹, Raquel Toledano¹, Fátima S. Aguilera¹, María T. Osorio¹, Esther Muñoz-Soto¹, Franklin García-Godoy², Raquel Osorio¹

1. Departamento de Estomatología, Facultad de Odontología, Universidad de Granada, Colegio Máximo de Cartuja s/n, 18071 Granada, España.

2. College of Dentistry, Health Science Center, University of Tennessee, 875 Union Avenue, Memphis, TN 381632110, USA.

Objetivos: El propósito de esta revisión sistemática y meta-análisis fue comprobar la eficacia de la administración de antibióticos sistémicos en el tratamiento de la periimplantitis en términos de sangrado al sondaje (BoP) y profundidad de sondaje (PPD).

Fuentes, Selección de Estudios y Extracción de Datos: Se realizó una búsqueda exhaustiva de la literatura, tanto electrónica como manual, en PubMed, EMBASE y en el Registro Cochrane Central de Ensayos Controlados (CENTRAL) para identificar ensayos clínicos aleatorizados y estudios clínicos observacionales. Un total de 18 estudios (605 pacientes y 870 implantes) fueron seleccionados para la extracción de datos. Se calcularon las medias ponderadas. La heterogeneidad se determinó mediante Higgins (I^2). Se aplicó un modelo de efectos aleatorios. Tras la administración de antibióticos sistémicos para el tratamiento de la periimplantitis, la PPD se redujo 0,11 mm (-0,24 a 0,47, intervalo de confianza 95%), siendo esta diferencia no significativa ($p > 0.05$). El BoP mostró un *odds ratio* de 1,15, indicando que la probabilidad de sangrado es casi similar en el grupo control que en el grupo test cuando no se administran antibióticos sistémicos. Otras variables secundarias también fueron estudiadas.

Conclusiones: En el tratamiento de la periimplantitis, la administración de antibióticos sistémicos no reduce ni la PPD ni el BoP, comparado con un grupo control al que no se le administró antibiótico sistémico. No obstante, se puede esperar la obtención de resultados significativos, junto con la aplicación de otros tratamientos coadyuvantes, en otras variables secundarias como el nivel de inserción clínica, supuración, recesiones, pérdida ósea y recuentos bacterianos totales. También pudieron desencadenarse algunos efectos adversos.

Significación Clínica: La periimplantitis es considerada la complicación biológica más importante de los tratamientos con implantes. Las lesiones periimplantarias están asociadas con la presencia de BoP y un aumento de la PPD. Ninguno de estos parámetros clínicos se ha visto alterados tras la administración de antibióticos sistémicos. Por lo tanto, tras los resultados obtenidos, el uso de antibióticos sistémicos para el tratamiento de la periimplantitis debe ser cuestionado, contribuyendo a reducir su consumo y los problemas de resistencia a los antibióticos.

Agradecimientos: Este estudio está financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional [Proyecto PID2020-114694RB-I00]. M.T.-O. tiene una beca FPU del Ministerio de Universidades [FPU20/00450].

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES NANOMECAÑICAS DE DENTINA TRATADA CON PARTÍCULAS POLIMÉRICAS DOPADAS CON DEXAMETASONA

Nuria Infante Nieve^{1*}; Fátima S. Aguilera¹; María T. Osorio^{1*}; Raquel Toledano^{1*}; Manuel Toledano-Osorio¹; Antonio L. Medina-Castillo²; Estrella Osorio¹

¹ Universidad de Granada, Facultad de Odontología.

² Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento Química Analítica.

3. * Estudiante de Grado

Objetivo: analizar el efecto de la aplicación de nanopartículas (NPs) poliméricas dopadas con dexametasona (Dex) y dexametasona+zinc (Dex+Zn) en la remineralización de superficies de dentina, mediante el análisis de sus nanopropiedades. **Material y métodos:** Se obtuvieron discos de 1 mm de espesor de dentina sana y pulidos hasta 0,1 μm , utilizando pasta de diamante. Sobre las superficies se aplicaron soluciones (10 mg/mL) en PBS de NPs, Dex-NPs, Dex+Zn-NPs y se añade un grupo control donde se aplica sólo PBS. Tras 24 horas de almacenado a 37 °C se evaluaron sus propiedades nanomecánicas mediante un TriboIndentador Ti-750D equipado con el paquete Nano DMA (nanoscale Dynamic Mechanical Analysis). Se tomaron datos de áreas de 30x30 μm (aprox.) con una frecuencia de barrido de 0,2 Hz y una fuerza dinámica (oscilante) de 5 μN . **Resultados:** Los valores medios y desviación estándar de Complex Modulus, Storage Modulus, Dureza y Módulo de Young (E) obtenidos para los grupos experimentales se muestran en la tabla.

	Complex Modulus (GPa)	Storage Modulus (GPa)	Dureza (GPa)	Young Modulus (GPa)
Control	69.65 (19.4) a	68.46 (19.44) a	1.14 (0.15) a	27.91 (3.68) a
NPs	91.27 (36.75) a	91.28 (36.83) a	0.88 (0.38) ab	24.62 (7.72) a
Dex-NPs	8.68 (5.3) b	4.27 (3.48) c	0.49 (0.09) b	12.70 (2.20) b
Dex-Zn-NPs	18.08 (9.08) b	14.86 (7.29) b	0.48 (0.06) b	13.52 (1.85) b

Abreviaturas: NPs: Nanoparticles no dopadas; Dex: Dexametasona.

Complex Modulus, Storage Modulus, Dureza y Módulo de Young fueron analizados separadamente. Para cada variable, letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

Agradecimientos: Proyecto PID2020-114694RB-100 MINECO/AEI/FEDER/UE. M.T.-O. es becario FPU del Ministerio de Universidades [FPU20/00450].

DEXAMETHASONE-DOPED POLYMERIC NANOPARTICLES REMINERALIZE SURFACE DENTIN: RAMAN CHEMICAL ANALYSIS

Michelle Pérez-Segura^{1*}; Estrella Osorio¹, Antonio L. Medina-Castillo²; Raquel Toledano^{1*}, María T. Osorio^{1*}, Manuel Toledano-Osorio¹; Fátima S. Aguilera¹

¹ Universidad de Granada, Facultad de Odontología.

² Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento Química Analítica.

* Estudiante de Grado

Objective: To evaluate the biochemical composition of remineralized dentin surfaces treated with nanoparticles (NPs) doped with Dexamethasone (Dex) and dexamethasone and zinc (Dex+Zn) by Raman microspectroscopy. **Material and Methods:** Sound dentin discs 1 mm thick were obtained and metallographically polished. An ethanol suspension of NPs, Dex-NPs or Dex+Zn-NPs were applied on dentin surfaces. A control group without NPs was included. A dispersive Raman spectrometer/microscope (Horiba Scientific Xplora) was used to analyze dentin surfaces, at 24 h and 21 d time points, in hydrated conditions (simulated body fluid solution-SBFS). A near-infrared diode laser (785 nm), was employed to acquire the 12x12 μm mappings Raman spectra (625 points per map) from 400 to 1,700 cm^{-1} wavenumber. Chemical mapping was submitted to K-means cluster (KMC) analysis and Hierarchical Cluster Analysis (HCA). At this point, the dentin mineral and organic components were assessed. **Results:** The phosphate and the carbonate peaks, augmented more at surfaces promoted with Dex+Zn-NPs than with Dex-NPs after 21 d of storage, but crystallinity did not differ at the treated surfaces with both doped NPs. Crosslinking of collagen and the secondary structure of collagen improved with Dex+Zn-NPs and Dex-NPs dentin infiltration.

		Relative Presence of Mineral			Crystallinity (FWHM _p)
		Phosphate [961 cm^{-1}]	Stoichiometric HAp [963 cm^{-1}]	Carbonate [1070 cm^{-1}]	
Control	24h	713.96	640.28	87.70	19.52
	21d	715.25	684.90	88.21	19.76
NPs	24h	742.34	698.57	96.28	19.00
	21d	755.21	671.90	94.72	19.82
Dex-NPs	24h	697.79	626.44	85.62	19.36
	21d	867.27	778.29	110.09	19.90
Dex+Zn-NPs	24h	787.33	829.94	107.97	19.08
	21d	925.87	872.52	116.90	19.59

Abbreviations: NPs: undoped/unloaded nanoparticles; Dex: Dexamethasone; HAp: Hydroxyapatite; FWHM_p: Full Width at Half Maximum (phosphate peak). For all the components, the peaks values had been normalized to the intensity of the Amide II band basis near 1510 cm^{-1} . Peaks positions are expressed in cm^{-1} .

Acknowledgments: This work was funded by the Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund (PID2020-114694RB-I00 MINECO/AEI/FEDER/UE). M.T.-O. is fellow FPU of Ministerio de Universidades [FPU20/00450].

VARIACIONES DE COLOR A TRAVÉS DE LA ESTRUCTURA DENTAL

Javier Ruiz-López^{a,b}, Cristina Gasparik^c, Diana Dudea^c, Maria Tejada-Casado^{a,b}, María del Mar Pérez^{a,b}, Razvan Ghinea^{a,b,d}

^a Department of Optics, Faculty of Science, University of Granada, Granada, Spain. jruizlo@ugr.es; mariatejadac@ugr.es; rghinea@ugr.es; mmperez@ugr.es

^b Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Spain

^c Department of Prosthodontics and Dental Materials, Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania. cristina_gasparik@yahoo.com; ddudea@umfcluj.ro

^d Department of Physics, Faculty of Sciences, University of Craiova, Craiova, Romania. rghinea@ugr.es

Objetivos. Analizar las variaciones colorimétricas en la sección transversal buco-lingual de diferentes piezas dentales extraídas: molares, caninos e incisivos.

Material y método. Se realizaron secciones buco-linguales sagitales con un grosor aproximado de 0,7 mm de 4 dientes humanos recién extraídos: tercer molar superior (TMS), tercer molar inferior (TMI), canino superior (CS) e incisivo inferior (II). La reflectancia espectral, sobre un área de tejido duro correspondiente en cada una de las secciones buco-linguales (área de medida 1/8°), fue medida usando un espectrorradiómetro (PR-670). Se empleó una geometría de iluminación/medición CIE 45°/0° y background negro. A partir de las reflectancias, se calcularon las coordenadas de color CIE L*a*b* para cada sección buco-lingual.

Resultados. CIE L* aumentó a partir de la primera sección, y aumentó (TMI, II), permaneció constante (TMS) o disminuyó ligeramente (CS) a medida que se avanzó en dirección lingual. Se encontró un importante descenso de la luminosidad en la sección más lingual de todos los dientes. El valor de coordenada CIE a* disminuyó desde la sección más externa hacia la más lingual. Sin embargo, las variaciones de la coordenada CIE b* no mostraron un comportamiento característico. Así, aumentó (TMS y TMI), se mantuvo constante (CS) y disminuyó (II) a partir de la primera sección y, posteriormente, disminuyó ligeramente y se recuperó (TMS), siguió aumentando y luego disminuyó (TMI, CS) o disminuyó continuamente al acercarse a la zona lingual (II).

Conclusiones. Se encontraron variaciones de todas las coordenadas de color a lo largo de las secciones transversales buco-linguales de los cuatro tipos de dientes estudiados. Estas variaciones dependieron del tipo de diente.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por los proyectos R+I+D PGC2018-101904-A-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ERDF "Una manera de hacer Europa", el proyecto R+I+D P20-00200 de la Junta de Andalucía y A.TEP.280.UGR18 de la Universidad de Granada.

EXPRESIÓN GÉNICA Y PROLIFERACION DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS SOBRE TITANIO RECUBIERTO CON NANOPARTÍCULAS DOPADAS CON DOXICICLINA

Manuel Toledano-Osorio¹, Francisco J. Manzano-Moreno^{1,2}, Víctor J. Costela-Ruiz^{2,3}, Antonio L. Medina-Castillo⁴, Concepción Ruiz^{2,3}, Elvira de Luna-Bertos^{2,3}

¹ Departamento de Estomatología, Facultad de Odontología, Universidad de Granada, España

² Grupo Bio-277. BioTejSalud (TEC17). Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.Granada

³ Departamento de Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, España

⁴ Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España

La peri-implantitis es un proceso patológico que conlleva la pérdida de osteointegración de los implantes dentales y/o la pérdida ósea alrededor de los mismos. Se produce por la contaminación bacteriana de la superficie de titanio, que provoca la pérdida de la pasivación de este metal y la falta de proliferación de osteoblastos sobre su superficie. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del recubrimiento de discos de titanio con nanopartículas dopadas con doxiciclina sobre la proliferación de osteoblastos en cultivo.

Material y Método: Se fabricaron por técnica de polimerización precipitación nanopartículas poliméricas de aproximadamente 150 nm. Dichas partículas se doparon con doxiciclina por método de inmersión. Sobre discos de titanio grado 2, de superficie estándar SLA se aplica una suspensión (1 mg/ml en PBS) de las nanopartículas sin dopar (NPs) o dopadas con doxiciclina (Dox-NPs), se utilizan superficies de titanio sin recubrir como control. Se cultivaron sobre ellas osteoblastos (MG-63) durante 48 h. Posteriormente se realizó un estudio de proliferación celular mediante la técnica MTT, y un análisis de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR). En RT-qPCR se estudiaron genes relacionados con la proliferación de osteoblastos: TGF- β 1, TGF β -R1, TGF β -R2 y TGF β -R3. Cada uno de los tests se realizó por triplicado. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA y test de Tukey ($p < 0,01$).

Resultados: No existen diferencias entre los grupos de estudio en lo que se refiere a proliferación celular medida mediante MTT. Los genes estudiados TGF- β 1, TGF β -R1 y TGF β -R2 se encuentran sobre-expresados en el grupo de osteoblastos cultivados sobre titanio recubierto con Dox-NPs. Las concentraciones se expresan en nG mRNA/ nG HK. Los osteoblastos del grupo Dox-NPs expresan el cuádruple el gen TGF- β 1 que los del grupo control (Dox-NPs:8,48; C:1,77). Para los genes TGF β -R2 (Dox-NPs:5,28; C:0,88) y TGF β -R1 (Dox-NPs:7,93; C:1,05), los valores de expresión génica son cinco y ocho veces mayores respectivamente, comparados al grupo control. Sólo la expresión del gen TGF β -R3 no muestra diferencias entre los dos grupos (Dox-NPs:0,53; 0,72).

Conclusión: Los osteoblastos cultivados sobre discos de titanio recubiertos con Dox-NPs expresan en mayor medida genes proliferativos que los cultivados sobre superficies de titanio estándar. Pudiendo esto indicar que las Dox-NPs sean un tratamiento adecuado para mejorar la regeneración ósea sobre la superficie de implantes de pacientes afectados de peri-implantitis. Agradecimientos: Proyecto PID2020-114694RB-100 MINECO/AEI/FEDER/UE. M.T.-O. es becario FPU del Ministerio de Universidades [FPU20/00450].

USE OF SECRETOME DERIVED FROM MESENCHYMAL STEM CELLS TO IMPROVE THE SCALE-UP PROCESS IN TISSUE ENGINEERING

Cristina Blanco-Elices^{1,2}, Oriol Cases-Perera¹, Miguel Ángel Martín Piedra^{1,2}, Olimpia Ortiz Arrabal^{1,2}, David Sánchez Porras^{1,2}, Fernando Campos^{1,2}, Miguel Ibáñez^{1,2}, Ricardo Fernández-Valadés^{1,2,3}, Miguel Alaminos^{1,2}, Ingrid Garzón^{1,2}

¹ Department of Histology (Tissue Engineering Group), University of Granada, Spain

² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Spain

³ Division of Pediatric Surgery, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

The recent advances in tissue engineering (TE) have been focused on the rapid manufacturing and easy scale up process of artificial tissues such as oral mucosa, skin and cornea. However, one of the main drawbacks in TE is the requirement of high number of viable cells in short periods of time. This fact limits the manufacturing process and slowdown de scale up process. In this context, mesenchymal stem cells (MSC) are able to synthesize numerous trophic and inductive factors contained in the secretome, that could enhance cell culture protocols in order to accelerate the process of development of bioengineered tissues.

In this work, we have evaluated the effects of three different types of secretomes derived from MSC: adipose derived stem cells (ADSC), dental pulp stem cells (DPSC) and Wharton's jelly stem cells (WJSC) on human skin fibroblasts. Human skin fibroblasts were cultured using DMEM enriched with MSC secretome for 72 hours. Cell viability test was assessed by Live/Dead[®] assay and WST-1.

Our results revealed that the use of secretome derived from MSC could improve currently available cell culture protocols. The use of the secretomes derived from MSC are is safe and could be associated with an increase of cell viability, being DPSC secretome and WJSC secretome higher inductive than ADSC secretome (Figure 1). To summarize, secretomes obtained from MSC can be safely used in TE protocols and could be consider as a promising product to enrich cell culture media.

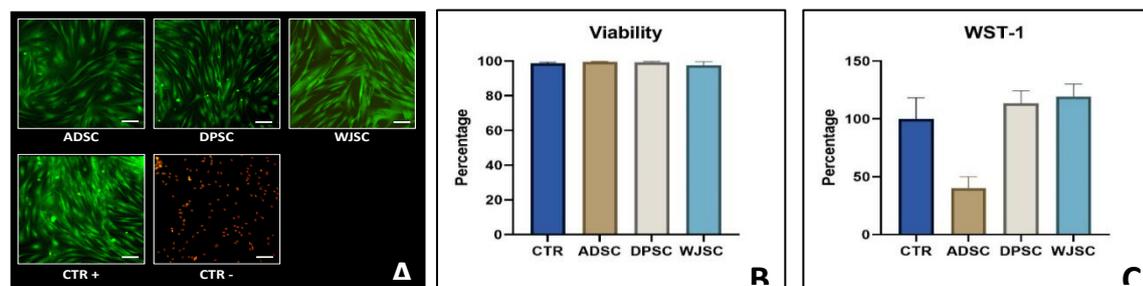


Figure 1. Cellular viability and WST-1 assessment of culture medium supplemented with different types of MSC secretome. A) Qualitative images of Live/Dead assay. B) Quantification of cellular viability of Live/Dead assay. C) Quantification of WST-1 assay.

This study was supported by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) of the Spanish Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI18/0331, FIS PI21/0980, FIS PI18/0332, FIS PI20/0317, ICI19/00024 and ICI21/00010, and by grants PE-0395-2019 and PI-0442-2019 from the Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain, and B-CTS-450-UGR20 (proyectos de I+D+i en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF - FEDER) "Una manera de hacer Europa".

GENERATION OF IMPROVED BIOMIMETIC MODELS OF HUMAN CORNEA FOR FUTURE CLINICAL APPLICATION

Juan Muñoz Hurtado^{1,*}, Juan Pereira Martínez^{1,*}, David Sánchez Porras^{1,2}, Óscar Darío García García^{1,2}, Fernando Campos^{1,2}, Olimpia Ortiz Arrabal^{1,2}, Carmen González-Gallardo^{1,2,3}, Miguel Alaminos^{1,2}, Ingrid Garzón^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Spain

² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Spain

³ Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain

* Both authors contributed equally

Human artificial cornea models developed by tissue engineering have been recently improved in order to achieve more biomimetic tissues. In this context, novel nanostructuring techniques induce microstructural changes with high impact in their extracellular matrix (ECM) and thus in their mechanical properties. In this work, we have applied novel nanostructuring technique to evaluate the effects on the ECM of bioengineered corneas at *in vitro* and *in vivo* levels to determine their potential clinical use in translational ophthalmology.

To achieve this, human artificial cornea models were developed using 5×10^6 human keratocytes immersed in a mixture of 2% fibrin-agarose, 1% CaCl_2 , tranexamic acid and human plasma. Once stromal substitutes were developed, cornea epithelial cells were cultured on top and stratification process was carried out using air-liquid culture technique during 7 days. After *in vitro* development, *in vivo* experiments were performed using four New Zealand laboratory rabbits with 12 months follow-up. Non operated rabbits were used as controls.

Our results demonstrated that human cornea models improved with nanostructuring techniques showed similar histochemical and immunohistochemical patterns compared with native human corneas. The synthesis of cornea ECM proteins markedly evolved after the *in vivo* implantation of the corneas in the experimental animals. In general, the presence of collagen fibers and essential corneal proteoglycans such as lumican or keratocan was similar to the native cornea control, demonstrating a high level of biomimeticity of the improved models of artificial human cornea.

To summarize, cornea enhanced models showed higher levels of biomimeticity by the expression of several ECM proteins. Cornea improved models by nanostructuring techniques could represent a potential therapeutic tool based on advanced therapies for the treatment of corneal pathology.

This study was supported by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) of the Spanish Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI20/0317 and ICI21/00010, and by grant PI-0086-2020 from the Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain, and B-CTS-504-UGR20 (proyectos de I+D+i en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF - FEDER) "Una manera de hacer Europa".

**DESIGN AND GENERATION BY TISSUE ENGINEERING OF A NEW MODEL OF
ARTIFICIAL DERMIS AS AN ADVANCED THERAPY MEDICINAL PRODUCTS**

Jesús Chato Astrain^{1,2}, Cristina Blanco Elices^{1,2}, Juan Muñoz Hurtado¹, Óscar Darío García García^{1,2}, Olimpia Ortiz Arrabal^{1,2}, David Sánchez Porras^{1,2}, Miguel Alaminos^{1,2}, Víctor Carriel^{1,2}, Fernando Campos^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Spain

² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Spain

Advanced therapies play a fundamental role in the research and development of new biomaterials that may be applicable in the medicine of the future. This is the case of the previously described UGRSKIN fibrin-agarose artificial skin model (1) that has biomechanical properties that allow its surgical handling, which has allowed it to be used as a pharmaceutical product for advanced therapies in Spain.

The present study is focused on the improvement of this model with the aim of obtaining a biomimetic artificial dermis with enhanced structural and functional features. The aim of this preliminary study was to evaluate at the preclinical level the effects of the combination of two natural biomaterials such as fibrin and collagen in the fabrication of new artificial dermis models. Fibrin, fibrin-agarose and fibrin-collagen hydrogels were generated and subjected to different quality control analyses including *ex vivo* biomechanical characterization and cell-biomaterial interaction. Human fibroblasts were used for cell-biomaterial interaction which were isolated as previously described (2) and a complete cell-biomaterial characterization was then performed using Live/Dead Cell Viability Assays, water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) assays and DNA-release analyses after 48 hours.

Biological studies confirmed a high cell viability in all the biomaterials generated in the study, especially in fibrin-agarose and fibrin-collagen hydrogels. Moreover, tensile biomechanical testing revealed that fibrin and fibrin-agarose hydrogels had significantly higher overall biomechanical properties as compared with fibrin-collagen.

This pilot study demonstrated that novel tissue engineering biofabrication protocols can be applied for the generation of novel dermis substitutes with excellent *ex vivo* biocompatibility properties. Future studies should be focused on improving the biomechanical properties of these dermis substitutes.

This study was supported by Convocatoria de Proyectos Intramurales ibs.GRANADA (INTRAIBS-2020-08) and by grant PE-0395-2019 from the Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain. Supported by grant P18-RT-5059, Consejería de Consejería De Economía, Conocimiento, Empresas Y Universidad, Junta de Andalucía, Spain. Supported by B-CTS-450-UGR20 and A-CTS-498-UGR18 (proyectos de I+D+i en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF - FEDER) "Una manera de hacer Europa". Supported by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) of the Spanish Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grant FIS PI20/0318.

References:

1. Chato-Astrain J, et al. Biomedicines. 2021 Nov 6;9(11):1634
2. Irastorza-Lorenzo A, et al. Evaluation of Marine Agarose Biomaterials for Tissue Engineering Applications. Int J Mol Sci. 2021 Feb 15;22(4):1923

A DYNAMIC CELL CULTURE PLATFORM TO ENHANCE THE MESENCHYMAL STEM CELLS MICROENVIRONMENT

Cristina Blanco-Elices^{1,2}, Miguel Ángel Martín Piedra^{1,2}, Jesús Chato Astrain^{1,2}, Juan Pereira Martínez¹, Miguel Ibáñez^{1,2}, Ricardo Fernández-Valadés^{1,2,3}, Miguel Alaminos^{1,2}, Antonio Campos^{1,2}, Ingrid Garzón^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Spain

² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Spain

Bidimensional cell culture technique is widely spread around the world and represents a vast number of limitations due to the fact that the technique does not reproduce the native cellular environment. In contrast, tridimensional cell culture technique closely resembles the native status of cells. In this way, the generation of solubilized extracellular matrix could allow the creation of a tridimensional microenvironment that simulates the physiological conditions in which the cells are found *in vivo*, stimulating the interactions between cell and cell and between cell and extracellular matrix with potential application in tissue engineering protocols.

In this work, we have generated solubilized extracellular matrix at different concentrations (0%, 25%, 50%, 75% and 100%) using Wharton's jelly stem cells (WJSC). The control group correspond to 0%, which cells are only immersed in Dulbecco's modified Eagle's medium Advanced -DMEM- (Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). After 7 days of tridimensional culture, RNA was obtained of each hydrogel and cDNA was generated. RT-PCR test was performed in order to identify the presence of BCL2, CASP3, CD9, MKI67, NANOG and XIAP.

Our results revealed that the use of the 3D system may inhibit apoptosis, as the absence of CASP3 expression revealed. In addition, the 75% concentration group showed the highest expression of proliferation (MKI67) and apoptotic regulators markers (BCL2, XIAP). The high expression of NANOG marker showed that the 3D system also maintained the undifferentiated profile of WJSC (Figure 1). In conclusion, the 3D system could be efficiently used in tissue engineering protocols as tridimensional cell culture platform.

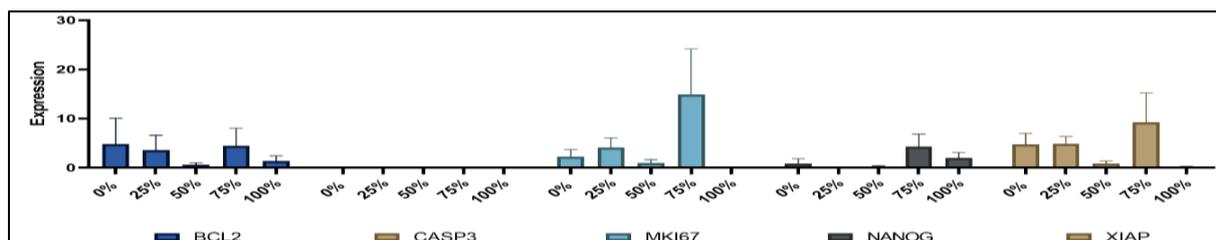


Figure 1. Expression of studied markers in different types of 3D systems (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) with Wharton's jelly stem cells

This study was supported by grant PSETC-19-001, Plan Propio de la Universidad de Granada (Proyectos singulares y estratégicos de transferencia de conocimiento) and by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) of the Spanish Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI18/0331, FIS PI21/0980, FIS PI18/0332, FIS PI20/0317, ICI19/00024 and ICI21/00010. Supported by grants PE-0395-2019 and PI-0442-2019 from the Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain, and B-CTS-450-UGR20 (proyectos de I+D+i en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF - FEDER) "Una manera de hacer Europa".

USE OF ACTIVATED PROTEIN C (APC) AS AN ENHANCER OF HUMAN KERATINOCYTE CELL CULTURES IN TISSUE ENGINEERING PROTOCOLS

Jesús Chato Astrain^{1,2,*}, Miguel Ibáñez^{1,2,*}, Cristina Blanco Elices^{1,2}, Óscar Darío García García^{1,2}, Miguel Ángel Martín Piedra^{1,2}, María del Carmen Sánchez Quevedo^{1,2}, Ricardo Fernández-Valadés^{1,2,3}, Miguel Alaminos^{1,2}, Ingrid Garzón^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Spain

² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Spain

³ Division of Pediatric Surgery, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

* Both authors contributed equally

The human oral cavity can be affected by diverse and complex diseases which could be clinically treated by oral mucosa substitutes. Full thickness oral mucosa substitutes are composed by oral keratinocytes seeded on top of a stromal layer containing oral fibroblast. Among all the oral substitutes generated, there is still a lack of complete rete ridges and chorionic papillae *in vitro*, a vital factor in epidermal adhesion and homeostasis, and especially important in the oral cavity due to the continuous physical aggressions of the oral mucosa. In this sense, previous studies suggest that the cell cultures enriched with activated C protein (APC) could be useful to enhance epithelial and connective tissue interaction promoted by the formation of rete ridges and chorionic papillae (1).

In this preliminary study, we have isolated and cultured human keratinocytes to study the effect in cell proliferation and metabolism of the incorporation of the APC in the basal keratinocyte medium (QC). First, human biopsies were processed by the explant technique and before confluence was achieved, cells were trypsinized and seeded in p96 well culture plates. Basal keratinocyte medium (QC) was supplemented with 10µg/ml of APC and cells were kept under culture conditions for 3, 5 and 7 days. Cell count and metabolic activity were studied using flow cytometry and WST1 respectively, and cell viability was assessed by the live/death technique. The results showed that the APC incorporation in the cell culture medium not only increased the number of cells but also their metabolic activity, specially at 7 days where significant statistical differences were found. Our results showed that the effect of APC was more effective on day 7, confirming its anti-apoptotic and barrier protection properties described in previous studies (2).

This pilot study demonstrated the usefulness of APC in the cell culture of demanding cells such as oral keratinocytes and confirmed its usefulness in the generation of complete oral mucosal models. This study opens the door to the use of APC in complete oral mucosal substitute cultures, which could favor not only in the keratinocyte proliferation but also in the epithelial maturation which could improve the development of rete ridges and chorionic papillae, which in turn could improve adhesion and clinical function.

This study was supported by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) of the Spanish Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI18/0331, FIS PI21/0980, FIS PI18/0332, FIS PI20/0317, ICI19/00024 and ICI21/00010, and by grants PE-0395-2019 and PI-0442-2019 from the Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain, and B-CTS-450-UGR20 (proyectos de I+D+i en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF - FEDER) "Una manera de hacer Europa".

(1) Xue, M., Chow, S. O., Dervish, S., Chan, Y. K., Julovi, S. M., & Jackson, C. J. (2011). Activated protein C enhances human keratinocyte barrier integrity via sequential activation of epidermal growth factor receptor and Tie2. *The Journal of biological chemistry*, 286(8), 6742–6750

(2) McKelvey, K., Jackson, C. J., & Xue, M. (2014). Activated protein C: A regulator of human skin epidermal keratinocyte function. *World journal of biological chemistry*, 5(2), 169–179

THE METHODOLOGICAL CHALLENGE IN THE ECONOMIC EVALUATIONS OF ADVANCED THERAPY MEDICINAL PRODUCTS: A SYSTEMATIC REVIEW WITH RECOMMENDATIONS

Antonio Olry de Labry-Lima^{1,2}, Angela Ponce-Polo³, Leticia García-Mochón¹, Marta Ortega-Ortega⁴, Daniel Pérez-Troncoso⁵, David Epstein⁵

¹ Escuela Andaluza de Salud Pública

² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA

³ Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas

⁴ Universidad Complutense de Madrid

⁵ Universidad de Granada

Background & Aim: The number of available advanced therapy medicinal products (ATMPs) has grown considerably in recent years. These treatments are likely to present promising results for a wide range of diseases, but also high prices. Robust methodologies are needed to evaluate such therapies and ensure value for money for payers and health systems. The objective of this work is to compile the methodological aspects of conducting economic evaluations of ATMPs.

Methodology: A systematic review was carried out and the following databases were consulted (11 September 2020): PubMed, Embase, Web of Science (WOS) and The Cochrane Library, complemented by exploratory search in Google Scholar. Two systematic reviews were located that served to identify further publications through the reference list. The search strategy was constructed with controlled and free terms, including the commercial names of ATMPs.

Inclusion and exclusion criteria: all articles that carried out a cost analysis or economic evaluation of ATMPs were included. Those articles that evaluated the production process were excluded; the search was limited to the previous 15 years. The results of the literature search were stored in a Rayyan QCR library and the screening process was performed in pairs.

Results: A total of 1522 papers were assessed for eligibility, and 38 were chosen for the review. 3 papers (8%) reviewed cell therapies for ischemic stroke, Parkinson's disease, and Chron's disease. 26 (68%) papers reviewed gene therapies for R/R DLBCL (9), R/R B-ALL (8), haemophilia A (2), spinal muscular atrophy (2), and other 5 different diseases. Finally, 9 (24%) papers reviewed tissue-engineered products for cartilage defects (7), corneal blindness (1), and stress urinary incontinence (1). 32 studies were Cost-Utility Analysis (CUA -that is, modelled cost and QALYs for two or more treatment options), 2 Cost-Effectiveness Analysis (CEA -that is, included cost and clinical outcomes for two or more treatment options) and 4 were cost only studies. Cost-effectiveness is often one of the criteria that payers use for whether to adopt a therapy or the price at which it should be reimbursed. This review includes therapies which are represented in three of the four "quadrants" of the cost-effectiveness plane, each of the areas of the plane comparing incremental costs and QALYs of a therapy over another. In addition, some broad themes emerge as common issues in the economic evaluations of ATMPs: size and design of clinical trials, clinical evidence, long term, risk of bias, among others.

Conclusion: This work makes it possible to identify the gaps in the existing literature, reporting the main methodological approaches and offering some key recommendations for researchers and policy-maker.

DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CON POTENCIAL APLICACIÓN EN TERAPIAS AVANZADAS

Ana Medina¹, Paul Immanuel Buhagiar^{1,2}, Owen Sciberras^{1,2}, José L Arias^{1,3,4}

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
2. Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Surgery, University of Malta.
3. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, 18016 Granada, España.
4. Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS) - Universidad de Granada, 18012 Granada, España.

En los últimos años se ha empleado la poli(ε-caprolactona) (PCL) como material para el diseño de nanopartículas, uno de los polímeros con mayor interés para estos sistemas debido a su estabilidad, alta permeabilidad, biocompatibilidad y selectividad (1). Algunas de las aplicaciones de las nanopartículas de PCL son en terapia génica (2), terapia celular (3) o en ingeniería tisular (4).

La síntesis se ha realizado mediante un método de emulsión/evaporación (5), que implica la preparación de una solución orgánica de PCL en diclorometano a añadir bajo agitación en una solución acuosa de Kolliphor® P-188 (0,5%, p/v). La mezcla de las dos fases se realizó: una bajo agitación mecánica (1000 rpm, 30 min) y otra alternativa que combina la agitación mecánica con el uso de ultrasonidos utilizando un homogeneizador ultrasónico (5 min, sonicator input: 4 y 25 min de agitación mecánica a 1000 rpm), siendo en ambos casos el disolvente eliminado mediante evaporación. Se ha realizado por triplicado (n=3) cada alternativa, para su posterior caracterización.

Una vez formuladas las nanopartículas, se sometieron a una centrifugación única (5000 rpm, 25 min) para limpiar las muestras, obteniendo un sobrenadante con una conductividad aproximada de 200 µs/cm.

Para su caracterización, se ha medido el tamaño de partícula y la carga eléctrica superficial mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS) y electroforesis, respectivamente.

Tabla 1: Valores de tamaño (nm) y Potencial Zeta (mV) de las nanopartículas de PCL.

	AGITACIÓN MECÁNICA	AGITACIÓN MEDIANTE ULTRASONIDOS
TAMAÑO (nm)	246,6±50,3	195±18,02
PDI	0,317±0,05	0,144±0,02
POTENCIAL ZETA (mV)	-16,58±7,2	-16,63±1,3

Como se puede ver en la Tabla 1, el tamaño es similar, siendo la media de 246,6 nm y de 195 nm de las muestras obtenidas mediante agitación mecánica y agitación mediante ultrasonidos respectivamente y se puede apreciar cómo mediante ultrasonidos se obtiene un menor tamaño de partícula, lo que daría lugar a un menor aclaramiento y, por lo tanto, un mayor tiempo de permanencia en el organismo. Asimismo, se puede observar que en todos los casos la carga eléctrica superficial de las nanopartículas es negativa, por lo que no hay variación entre un método u otro de obtención.

Se ha desarrollado una metodología reproducible y organizada de formulación de nanopartículas de PCL con utilidad y aplicación en terapias avanzadas.

Agradecimientos: (ISCIII) (proyecto PI19/01478) Junta de Andalucía (proyecto I + D + i A1-FQM-341-UGR18), Junta de Andalucía (proyecto PY20_00346).

1. Arias JL y cols. Colloids Surf. B Biointerfaces. 2010;75:204–8.
2. Palamà I y cols. Ther Deliv. 2015;6:769-71.
3. Huang S y cols. Nanoscale. 2015;7:889–95.

4. Tayebi T y cols. Sci Rep. 2021;11:1–12.
5. García-García G y cols. Polymers. 2020;12:2790.

PERFIL METABOLÓMICO EN SEMEN DE HOMBRES CON NORMO- Y OLIGOZOOSPERMIA

Molina, N.M.^{1,2}; Sola-Leyva, A.^{1,2}; Pérez-Prieto, I.^{1,2}; Vargas, E.^{1,2}; Casas-Matas, A.¹; Rodríguez-Izquierdo, C.J.³; Clavero-Gilabert, A.³; Gonzalvo-López, M.C.³; Morales-Rincón, N.^{2,3}; Vaquero, A.⁴; Aguilera, C.M.^{2,5,6,7}; Altmäe, S.^{1,2,8}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España.

²Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, España.

³Unidad Reproducción, UGC Laboratorio clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. HU Virgen de las Nieves, Granada, España.

⁴CEIFER Biobanco - NextClinics, Granada, España.

⁵Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España.

⁶Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix", Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, España.

⁷CIBEROBN (Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

⁸Competence Centre on Health Technologies, Tartu, Estonia.

Actualmente, los análisis de semen que se llevan a cabo en la clínica no evalúan el estado funcional de los espermatozoides, haciendo que las causas de infertilidad por factor masculino permanezcan a menudo desconocidas. Sin embargo, se sabe que el semen está compuesto de una amplia diversidad de metabolitos. Por ello, nuestro objetivo fue describir el perfil metabolómico completo del semen humano y determinar si la composición de metabolitos difiere entre hombres con parámetros de calidad seminal superiores e inferiores a los valores de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se diseñó un estudio de caso-control aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía que incluyó un total de 100 hombres (edad= 29.73 ± 8.9 años). Se recolectaron muestras de semen de 67 hombres con parámetros de calidad seminal superiores a los valores de referencia de la OMS (World Health Organization, 2010) y de 32 hombres con oligozoospermia. El metaboloma completo de las muestras de semen no procesadas se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. La extracción de los datos brutos, la identificación de los picos y el procesamiento del control de calidad se llevó a cabo utilizando el hardware y software de Metabolon (metabolon.com). Además, se aplicó un modelo de regresión múltiple controlando por edad e índice de masa corporal de los participantes utilizando el software R. Finalmente, se detectaron un total de 695 metabolitos diferentes en las muestras seminales, donde el ácido docosahexaenoico (DHA), la fosfocolina, el ácido dihomo- γ -linolénico, el ácido docosapentaenoico y el adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPC) fueron los más prevalentes. Los perfiles metabolómicos seminales difirieron significativamente entre hombres con parámetros espermáticos superiores e inferiores a los valores de referencia de la OMS. Los metabolitos más abundantes en hombres con normozoospermia pertenecieron a la ruta metabólica de los lípidos, mientras que la ruta metabólica de los nucleótidos predominó en muestras de semen con baja calidad ($p < 0.05$). En particular, la principal sub-ruta metabólica en hombres con normozoospermia fue la de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (n3 y n6), mientras que la sub-ruta del metabolismo de la purina y la pirimidina prevaleció en muestras de semen con baja calidad. El DHA y el AMPC dominaron en hombres con parámetros de calidad seminal por encima y por debajo de los valores de referencia, respectivamente ($p < 0.05$ en todas las comparaciones). Los resultados de nuestro estudio podrían ayudar a comprender el trasfondo molecular de la reducción de la calidad seminal y la infertilidad masculina, y conducir a la identificación de biomarcadores moleculares de espermatozoides funcionales.

AVANCES RECIENTES EN LA BIOFABRICACIÓN DE SUSTITUTOS CELULARES DÉRMICOS FUNCIONALES Y MADUROS

Manuel Ríos-Galacho^a, Daniel Martínez-Moreno^{a,b,c}, Elena López-Ruiz^{a,b,c,d}, Patricia Gálvez-Martín^e, Juan Antonio Marchal^{a,b,c,f}

^a Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Granada, España.

^b Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), Hospitales Universitarios de Granada-Universidad de Granada, Granada, España.

^c Unidad de Investigación de Excelencia "Modeling Nature" (MNat), Universidad de Granada, Granada, España.

^d Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, Jaén, España.

^e I+D Salud Humana y Animal, Bioibérica S.A.U., Barcelona, España

^f Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España.

La piel es un órgano capaz de regenerarse al sufrir ciertos tipos de lesiones. Este fenómeno se conoce como proceso de curación de la herida y se lleva a cabo en cuatro etapas: inflamación, regeneración, proliferación y maduración. Sin embargo, lesiones graves como las úlceras y quemaduras son incapaces de iniciar o finalizar la regeneración, quedándose el proceso estancado en alguna de sus etapas. Estas heridas son denominadas heridas crónicas de la piel. Para su tratamiento, la ingeniería de tejidos se ha centrado en la biofabricación de sustitutos dérmicos celulares que cubren y protegen la herida con el fin de restaurar el proceso de regeneración. Existen dos tipos de sustitutos dérmicos: sustitutos acelulares (SA), que suplen las funciones que la piel dañada no puede realizar (ej: barrera frente a patógenos); y sustitutos celulares (SC), que además de suplir las funciones de la piel dañada, incorporan células que secretan factores de crecimiento y citoquinas capaces de reactivar el proceso de regeneración. La biofabricación de un SC se lleva a cabo en un proceso secuencial compuesto por cuatro etapas: a) Estudio de la herida, donde se determina la dimensión y profundidad de la lesión; b) Diseño y formulación del SC, donde se seleccionan las células, biomateriales y tipo de estructura (hidrogel o andamio sólido, monocapa/bicapa) más aplicables al tipo de herida a regenerar; c) Biofabricación del SC, donde se selecciona la metodología de biofabricación más adecuada en función de los componentes seleccionados durante el diseño; y d) Maduración, donde se somete al SC a estímulos químicos y mecánicos para recuperar la funcionalidad de las células. Mientras que las tres primeras etapas han sido ampliamente estudiadas en la literatura y actualizadas a las nuevas tecnologías, la etapa de maduración suele ser suprimida o tenida poco en cuenta. El SC ha sido biofabricado "in-vitro", lo que implica que las células incorporadas en su estructura han sido privadas de las señales químicas y físicas (ej. factores de crecimiento o estímulos mecánicos) que determinan su funcionalidad. En esta etapa, se suele recurrir a la tecnología de biorreactores. Los biorreactores son sistemas capaces de replicar procesos biológicos dentro de un ambiente aséptico y controlado. De esta manera, mediante el uso de biorreactores de piel se puede replicar la etapa de maduración del SC, recuperando su funcionalidad celular. En nuestro estudio se ofrece una actualización de la tecnología de los biorreactores en el campo de la biofabricación de SC y en la regeneración de la piel.

CHITOSAN COATING OF NANOPARTICLES

Paul Immanuel Buhagiar^{[1][2]}, Owen Sciberras^{[1][2]}, Ana Medina^[2], José Luis Arias Mediano^{[2][3][4]}

1. Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Surgery, University of Malta
2. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada
3. Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Center for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, 18016 Granada, Spain
4. Biosanitary Institute of Granada (ibs. GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS) - Universidad de Granada, 18012 Granada, Spain

Gene therapy uses the introduction of a gene into affected cells as the treatment for diseases such as cancer. Recent advancements and interest in the field of gene therapy is in the use of non-viral vectors to carry the gene to the target. One such non-viral vector is chitosan which has been studied for gene delivery in brain cancer gene therapy [1]. Chitosan can be used to coat other nanoparticles as well as possesses mucosal adhesiveness allowing it to attach to mucosal surfaces such as the uterus, the lungs, and the gut. Chitosan also possesses a positively charged surface potential. It was shown that upon coating with chitosan the nanoparticle size increased, and the surface potential changed from anionic to cationic as can be seen in Table 1. This proves that the chitosan had in fact coated the nanoparticles.

	PCL without coated Chitosan	PCL with coated Chitosan	PBCA without coated chitosan	PBCA with coated chitosan
Size/nm	361.6 ±84.76	769.57 ±18.6	282.74 ±66.70	515.77 ±32.66
Polydispersity Index	0.376 ±0.088	0.296 ±0.045	0.420 ±0.080	0.425 ±0.035
Zetapotential/mV	-25.5 ±1.46	16.27 ±1.07	-25.6 ±0.90	19.23 ±0.45

Table 1 Mean Size and Mean Zeta Potential with Standard Deviation of Chitosan Coated and Uncoated Nanoparticles

The behaviour of the different nanoparticle formulations was then tested in different KNO₃ solutions. This was done to observe the effect of different ionic concentrations on the chitosan coated and uncoated nanoparticles, as can be seen in Figure 1. The experiments were done in triplicate and the mean values were recorded.

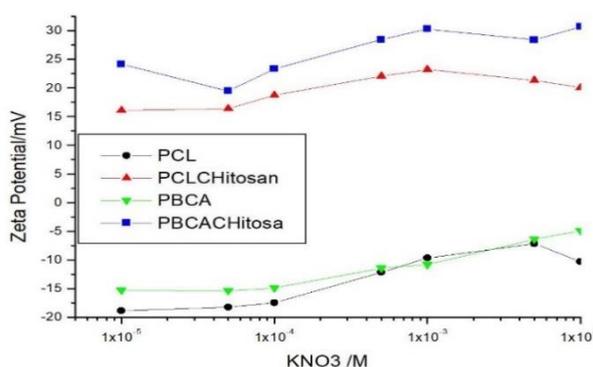


Figure 1 Graph of Zeta Potential/mV vs KNO₃ Concentration/M

Reference:

1. Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS journal*, 23(4), 78. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00608-7>

Agradecimientos: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (proyecto PI19/01478) (FEDER), Programa Operativo FEDER de Andalucía 2014–2020 (Junta de Andalucía, proyecto I + D + i A1-FQM-341-UGR18), y Programa de Ayudas a Proyectos I + D + i destinadas a

Universidades y Entidades Públicas de Investigación (Junta de Andalucía, proyecto PY20_00346).

INVOLVEMENT OF THE COMMON GENETIC VARIATION OF THE *KATNAL1* GENE IN THE SUSCEPTIBILITY TO SEVERE PHENOTYPES OF MALE INFERTILITY

Andrea Guzmán-Jiménez^{1,*}, Miriam Cerván-Martín^{1,2,*}, Lara Bossini-Castillo^{1,2,*}, Rocío Rivera-Egea^{3,4}, Nicolás Garrido^{4,5}, Saturnino Lujan⁵, Gema Romeu⁵, Samuel Santos-Ribeiro^{6,7}, *IVIRMA Group*⁸, *Lisbon Clinical Group*⁸, José A. Castilla^{2,9,10}, M. Carmen Gonzalvo^{2,9}, Ana Clavero^{2,9}, Vicente Maldonado¹¹, F. Javier Vicente^{2,12}, Miguel Burgos¹, Rafael Jiménez¹, Sara González-Muñoz¹, Warintorn Ruksiriwanich¹³, Josvany Sánchez-Curbelo¹⁴, Olga López-Rodrigo¹⁴, Iris Pereira-Caetano¹⁵, Patricia I. Marques^{16,17}, Filipa Carvalho^{16,18}, Alberto Barros^{16,18}, Lluís Bassas¹⁴, Susana Seixas^{16,17}, João Gonçalves^{19,20}, Sara Larriba²¹, Alexandra M. Lopes^{16,17}, Rogelio J. Palomino-Morales^{22,2,†}, F. David Carmona^{1,2,†}

¹Departamento de Genética e Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Spain. ²Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. ³Andrology Laboratory and Sperm Bank, IVIRMA Valencia, Valencia, Spain. ⁴IVI Foundation, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain. ⁵Servicio de Urología. Hospital Universitari i Politecnico La Fe e Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain. ⁶IVIRMA Lisbon, Lisbon, Portugal. ⁷Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal. ⁸See supplementary note. ⁹Unidad de Reproducción, UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Granada, Spain. ¹⁰CEIFER Biobanco - NextClinics, Granada, Spain. ¹¹UGC de Obstetricia y Ginecología, Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Spain. ¹²UGC de Urología, HU Virgen de las Nieves, Granada, Spain. ¹³Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. ¹⁴Laboratory of Seminology and Embryology, -Andrology Service-Fundació Puigvert, Barcelona, Spain. ¹⁵Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal. ¹⁶Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto (I3S), Porto, Portugal. ¹⁷Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal. ¹⁸Serviço de Genética, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal. ¹⁹Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal. ²⁰ToxOmics - Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, Nova Medical School, Lisbon, Portugal. ²¹Human Molecular Genetics Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ²²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada, Granada, Spain. *Contributed equally. †Share senior authorship.

Spermatogenesis is a multistep process that demands an exhaustive control of its underlying genetic mechanisms to produce viable and motile male gametes. The most extreme phenotypes of male infertility caused by a severe spermatogenic failure (SpF) are characterised by a radical (severe oligozoospermia, SO) or total (non-obstructive azoospermia, NOA), decrease in the sperm counts of the ejaculate. The aetiology of most SpF patients remains unknown, and increasing evidence suggests that this idiopathic form of male infertility represents a complex trait (involving both genetic and environmental factors).

We investigated whether the non-coding common variation of the *KATNAL1* gene (which encodes an essential regulator of the microtubules implicated in the establishment of the Sertoli cell/germ cell interactions) is involved in the development of male infertility due to SpF, as well as on the possible prognostic role of this variation in the testicular sperm extraction (TESE) from biopsies of patients undergoing assisted reproductive techniques.

With that aim, we designed a case-control genetic association study for three single nucleotide polymorphisms (SNPs; rs2077011, rs7338931 and rs2149971) located at the 3' and 5' ends of *KATNAL1*. The study population was composed of 715 infertile men (505 NOA and 210 SO) and 1058 healthy controls from Spain and Portugal. The genotyping was carried out with the TaqMan technology and the possible association of the analyzed SNPs with the studied phenotypes was assessed considering different logistic regression models in Plink.

Our results indicated that the haplotype including the alleles rs2077011*C, rs7338931*T, and rs2149971*A confers risk to SpF ($P = 3.45E-02$, OR = 2.33), NOA ($P = 8.22E-03$, OR = 2.97), arrest in the germ line maturation (MA; $P = 2.44E-02$, OR = 5.00), Sertoli cell only syndrome (SCO; $P = 4.03E-03$, OR = 5.16), and TESE outcome ($P=2.22E-04$, OR=6.13). Subsequent *in silico* analyses evidenced that the effect on SpF predisposition could rely on alteration of the *KATNAL1* splicing pattern, likely by favouring the overrepresentation of a short non-functional transcript isoform in the testis.

In summary, our study suggests that the common genetic variation of non-coding regions of *KATNAL1* confers risk to develop male infertility due to SpF. This type of studies may definitively help to develop more effective prognostic markers of the TESE success, thus improving the counseling in cases of idiopathic SpF.

Key words: idiopathic male infertility, *KATNAL1*, SNP, spermatogenesis, splicing.

FINE-MAPPING OF THE MHC REGION TO IDENTIFY POLYMORPHIC VARIANTS
INVOLVED IN SERTOLI-CELL ONLY SYNDROME DEVELOPMENT

Sara González-Muñoz¹, Miriam Cerván-Martín^{1,2}, Frank Tüttelmann³, Alexandra M. Lopes^{4,5,*}, Lara Bossini-Castillo^{1,2}, Rocío Rivera-Egea^{6,7}, Nicolás Garrido^{7,8}, Saturnino Lujan⁸, Gema Romeu⁸, Samuel Santos-Ribeiro^{9,10}, José A. Castilla^{2,11,12}, M. Carmen Gonzalvo^{2,11}, Ana Clavero^{2,11}, F. Javier Vicente^{2,13}, Miguel Burgos¹, Rafael Jiménez¹, Andrea Guzmán-Jiménez¹, Alberto Pacheco⁷, Cristina González⁷, Susana Gómez⁷, David Amorós⁷, Jesus Aguilar⁷, Fernando Quintana⁷, Carlos Calhaz-Jorge¹⁴, Ana Aguiar¹⁴, Joaquim Nunes¹⁴, Sandra Sousa¹⁴, Isabel Pereira¹⁴, Maria Graça Pinto¹⁵, Sónia Correia¹⁵, Jovany Sánchez-Curbelo¹⁶, Olga López-Rodrigo¹⁶, M. Fernanda Peraza¹⁶, Javier Martín¹⁷, Iris Pereira-Caetano¹⁸, Patricia I. Marques^{4,5}, Filipa Carvalho^{4,19}, Alberto Barros^{4,19}, Jörg Gromoll²⁰, Lluís Bassas¹⁶, Susana Seixas^{4,5}, João Gonçalves^{18,21}, Sara Larriba²², Sabine Kliesch²³, Rogelio J. Palomino-Morales^{2,24,*}, F. David Carmona^{1,2,*}

¹Departamento de Genética e Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Spain. ²Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. ³Institute of Reproductive Genetics, University of Münster, 48149, Münster, Germany. ⁴Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto (I3S), Porto, Portugal. ⁵Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal. ⁶Andrology Laboratory and Sperm Bank, IVIRMA Valencia, Valencia, Spain. ⁷IVI Foundation, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain. ⁸Servicio de Urología. Hospital Universitari i Politècnic La Fe e Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain. ⁹IVI-RMA Lisbon, Lisbon, Portugal. ¹⁰Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal. ¹¹Unidad de Reproducción, UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Granada, Spain. ¹²CEIFER Biobanco - NextClinics, Granada, Spain. ¹³UGC de Urología, HU Virgen de las Nieves, Granada, Spain. ¹⁴Unidade de Medicina da Reprodução, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal. ¹⁵Centro de Medicina Reprodutiva, Maternidade Alfredo da Costa, Centro Hospitalar Lisboa Central, Lisboa, Portugal. ¹⁶Laboratory of Semiology and Embryology, -Andrology Service-Fundació Puigvert, Barcelona, Spain. ¹⁷Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra', IPBLN-CSIC, PTS Granada, Granada, Spain. ¹⁸Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal. ¹⁹Serviço de Genética, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal. ²⁰Institute of Reproductive and Regenerative Biology, Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster, University Clinics, Albert-Schweitzer-Campus 1, Building D11, 48149, Münster, Germany. ²¹ToxOmics - Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, Nova Medical School, Lisbon, Portugal. ²²Human Molecular Genetics Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ²³Department of Clinical and Surgical Andrology, Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University Hospital Münster, 48149, Münster, Germany. ²⁴Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada, Granada, Spain. *Comparten última autoría.

Male infertility is a complex pathology affecting around 15% of couples worldwide. One of the main disorders related with male infertility, and the most severe, is non-obstructive azoospermia (NOA), which is characterized by the complete absence of sperm in the ejaculate without any obstruction in the post-testicular ducts, as a consequence of a severe spermatogenic failure. NOA presents different clinical manifestations according to the affected spermatogenic stage: hypospermatogenesis (HS, production of an extremely low number of sperm cells), maturation arrest (MA, incomplete maturation of the germ line), and Sertoli cell-only syndrome (SCO, total absence of germ cells). There are several known congenital causes of NOA (including Y-chromosome microdeletions, karyotypic abnormalities, and point mutations in genes related to the testicular function). However, such causes explain only around 25% of all NOA cases, being the infertility of the remaining patients classified as idiopathic NOA. Several previous studies suggest that this form of infertility presents a complex etiology and, with the aim of elucidating its genetic component, genome wide association studies (GWAS) have been performed in the last decade. These GWAS of NOA have made it possible to identify polymorphic variants associated with the disease, among which those belonging to major histocompatibility complex (MHC) region stand out. Furthermore, additional evidence has been reported suggesting the important role that the immune system may play in the development of NOA. Taking all the above into account, the present study was carried out in order to identify possible genetic and aminoacidic polymorphic variants involved in a greater susceptibility of suffering from SCO, the most extreme phenotype of NOA, in populations of European descent. With this purpose, a fine-mapping of the MHC region was conducted based on previously obtained NOA GWAS data from a total of 2,723 individuals (772 NOA cases and 1,951 controls). The methodology followed consisted in an in-depth imputation of the HLA region using a previously validated method (as implemented in SNP2HLA software), using the Type I Diabetes Genetic Consortium (T1DGC) dataset as reference panel. Case-control association analyses were performed by analyzing logistic regression models adjusted by the 10 first principal components using the PLINK software, and the Omnibus association analysis to determine the influence of each polymorphic aminoacidic position on disease susceptibility using R. The single-nucleotide polymorphism (SNP) rs1136759, located in the coding region of the MHC Class II gene *HLA-DRB1* was identified as significantly associated with SCO under the additive model ($p=1.32E-08$; $OR=1.80$). The risk allele of this SNP defined a serine at position 13 of the encoded protein. Interestingly, this same amino acid position represents the strongest association signal in many immune-mediated disorders. In conclusion, our results suggest that the presence of serine at position 13 in MHC class II molecule HLA-DR β 1 represents a relevant risk factor for SCO development. Key words: male infertility, NOA, SCO, GWAS, MHC, fine-mapping, SNP.

VALORACIÓN DEL EFECTO DEL BISFENOL A SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS OSTEÓBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

García Recio, Enrique^{1,2}; González Acedo, Anabel^{1,2}; Rueda Fernández, Manuel^{1,2}; Ruíz; Costela, Víctor Javier^{1,2}; Ruiz Rodríguez, Concepción^{1,2}; De Luna Bertos, Elvira^{1,2}

1: Grupo de Investigación Biosanitaria BIO277. Departamento de Enfermería, Universidad de Granada
2: BIOTEJSALUD Group (TEC17). Instituto Investigación Biosanitaria, ibs.Granada. Universidad de Granada, España

Introducción: El Bisfenol A (BPA) es un compuesto orgánico empleado en la fabricación de varios tipos de plásticos, presente en productos de uso diario tales como botellas, cubiertos, fiambreras, juguetes, tiques, esmaltes, etc. Por su similitud estructural con el 17β -estradiol y su capacidad para unirse a sus receptores se le considera un disruptor endocrino. El tejido óseo es altamente sensible al perfil estrogénico y modula su actividad en función de este. Es por ello que el BPA altera el normal funcionamiento de dicho tejido. En concreto, sobre el osteoblasto, la célula formadora de hueso, el BPA parece tener una actividad inhibitoria de su capacidad proliferativa y propiciar un aumento de la apoptosis, tal y como se ha podido ver en algunos estudios *in vitro* sobre células de origen murino.

Objetivos: estudiar el efecto del BPA sobre la capacidad proliferativa y sobre el proceso de apoptosis y necrosis sobre osteoblastos primarios humanos.

Material y métodos: Las células fueron cultivadas en presencia de BPA a dosis de 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M. Para el estudio de la proliferación se empleó la técnica espectrofotométrica del MTT. Para el estudio de la apoptosis y necrosis, las células previamente tratadas fueron marcadas con anexina V y yoduro de propidio y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo con laser de argón de 488 nm. Los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS.

Resultados: Tras 24 horas de tratamiento con BPA a las tres dosis estudiadas se aprecia una disminución estadísticamente significativa de la proliferación de entre un 11 y un 17 %, siendo esta reducción dosis-dependiente. El estudio de la apoptosis reveló que el tratamiento con BPA aumentó el porcentaje de células apoptóticas, disminuyendo por tanto la viabilidad celular.

Discusión: Según nuestros resultados, el BPA parece inhibir la capacidad proliferativa e inducir al proceso de apoptosis en osteoblastos humanos. Dado que esta población celular es la principal encargada del proceso de reconstrucción ósea, podríamos inferir que el BPA tiene un efecto negativo en el tejido óseo como otros autores han apuntado en estudios previos sobre otros tejidos. Nuestros hallazgos van en línea con lo observado en cultivos de osteoblastos murinos.

EFFECTO DEL TIROSOL, PRESENTE EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA, SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

Anabel González-Acedo¹, Lucía Melguizo-Rodríguez^{1,2}, Enrique García-Recio^{1,2}, Rebeca Illescas-Montes^{1,2}, Javier Ramos Torrecillas^{1,2}, Olga García-Martínez^{1,2}

¹Grupo de investigación BIO277. Departamento de Enfermería. Universidad de Granada, España

²BIOTEJSALUD Group (TEC17). Instituto Investigación Biosanitaria, ibs.Granada. Universidad de Granada, España

Introducción: En la actualidad, los compuestos bioactivos de diversas especies vegetales, como el tirosol presente en el aceite de oliva virgen extra, se presentan como una nueva alternativa terapéutica en el manejo de las heridas crónicas gracias a su capacidad para estimular diversos mecanismos involucrados en el proceso de cicatrización. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tirosol sobre la proliferación y la capacidad de migración de fibroblastos humanos en cultivo.

Metodología: La línea de fibroblastos CCD-1064Sk fue tratada con tirosol a diferentes concentraciones ($10^{-5}M$ - $10^{-9}M$). La capacidad proliferativa se determinó mediante la técnica espectrofotométrica del MTT tras 24 horas de tratamiento, mientras que la migración celular se evaluó mediante la técnica del scratch a las 4,8,12 y 24 horas del tratamiento. En todos los ensayos se incluyeron células no tratadas como grupo control.

Resultados: Las dosis de $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$ estimularon significativamente la proliferación celular, especialmente en los cultivos tratados con las dosis de $10^{-5}M$ y $10^{-6}M$. Para evaluar la migración celular se utilizaron las concentraciones que tuvieron un mayor efecto en el ensayo de proliferación, obteniéndose resultados significativos con ambas dosis a las 12 y 24 horas del tratamiento.

Conclusión: Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el tirosol podría estimular la regeneración de los tejidos, en términos de incrementar la proliferación y migración celular de fibroblasto humanos, presentándose como una posible opción terapéutica en el tratamiento de heridas crónicas.

**BIOMATERIALES BASADOS EN HIDROGELES DE ALGINATO DE SODIO:
EFECTO DE LA DESHIDRATACIÓN MECÁNICAMENTE CONTROLADA**

Alberto León-Cecilla¹, Cristina Gila-Vílchez^{1,2}, Juan D.G. Durán^{1,2}, Luis Álvarez de Cienfuegos^{2,3}, Modesto T. López-López^{1,2}

¹ Universidad de Granada, Departamento de Física Aplicada, Campus de Fuentenueva, 18071 Granada, España

² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, España

³ Universidad de Granada, Departamento de Química Orgánica, Campus de Fuentenueva, 18071 Granada, España

El diseño y síntesis de biomateriales con propiedades adecuadas es una tarea esencial en el desarrollo de campos como la biomedicina y la ingeniería tisular. Conseguir un buen control del comportamiento mecánico y de la estructura microscópica de estos materiales es crucial para su biocompatibilidad y seguridad. Actualmente, unos de los biomateriales más usados son los hidrogeles poliméricos, que se pueden definir como redes tridimensionales de polímeros entrecruzados capaces de retener agua o fluidos biológicos en su interior. Además, el porcentaje de agua que almacenan puede llegar hasta el 99% de su volumen, lo cual afecta a su estructura, porosidad, la disposición de las fibras de polímero, biocompatibilidad y propiedades mecánicas. En este trabajo, el contenido en agua de dos tipos de hidrogeles de alginato de sodio fue modificada usando dos métodos diferentes en los que los hidrogeles eran deshidratados controladamente bajo un esfuerzo de compresión o tracción [1-2]. Estos procesos de deshidratación provocan una reorganización de las fibras de polímero que produce un aumento de su concentración, así como la generación de nuevos enlaces entre ella, permitiéndonos generar materiales anisótropos con propiedades mecánicas ajustables. Gracias a ello, sería sencillo controlar adecuadamente las características de los hidrogeles con el fin de obtener matrices extracelulares biocompatibles capaces de imitar la estructura y las propiedades mecánicas de los tejidos naturales.

Referencias

[1] G. Scionti et al. 2014 J. Biomed. Mater. Res. Part A 102, 2573-2582.

[2] Md. T. I. Mredha et al. 2018 Adv. Mater. 30, 1704937.

Agradecimientos

Proyecto PID2020-118498GB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (España). Ayuda FPU19/01801 financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y FSE "El FSE invierte en tu futuro" y por la Universidad de Granada.

EFFECTO DE LA PUNICALAGINA Y DEL ÁCIDO ELÁGICO SOBRE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE FIBROBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

Manuel Rueda Fernández¹, Rebeca Illescas Montes^{1,2}, Enrique García Recio^{1,2}, Lucía Melguizo Rodríguez^{1,2}, Olga García Martínez^{1,2}, Javier Ramos Torrecillas^{1,2}

¹Grupo de Investigación Biosanitario (BIO277), Departamento de Enfermería, Universidad de Granada, España.

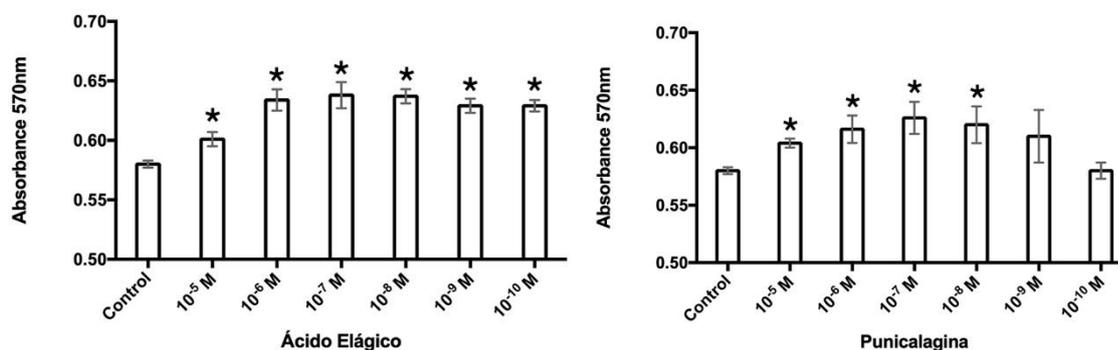
²BIOTEJSALUD Group (TEC17). Instituto Investigación Biosanitaria, ibs.Granada. Universidad de Granada, España.

INTRODUCCIÓN. La granada (*punica granatum*) contiene elagitaninos, entre los que destacan la punicalagina y el ácido elágico. Ambos son polifenoles que se concentran tanto en la cáscara como en las membranas y las médulas de la fruta. Entre los conocidos efectos sobre la salud se encuentran la capacidad antioxidante o antiinflamatoria y anticancerígena. Así mismo, estos polifenoles podrían estimular a poblaciones celulares responsables de la reparación de heridas, como son los fibroblastos.

OBJETIVO. Evaluar el efecto de la punicalagina y el ácido elágico sobre la capacidad proliferativa de fibroblastos humanos en cultivo.

METODOLOGÍA. Los fibroblastos humanos (línea tipificada CCD-1064Sk) fueron cultivados en placas de 96 pocillos en medio DMEM a una concentración de 1×10^4 células/ml. 24 horas después de su incubación, fueron tratados con la punicalagina y el ácido elágico a las concentraciones de 10^{-5} a 10^{-10} M. La capacidad proliferativa fue estudiada a las 24 horas del tratamiento mediante la técnica espectrofotométrica de MTT. Se cultivaron células a las que se le adicionó medio sin polifenoles como grupo control.

RESULTADOS. Los resultados mostraron que tanto el tratamiento con punicalagina y ácido elágico, en todas las concentraciones ensayadas (10^{-5} a 10^{-10} M) incrementaron significativamente la capacidad proliferativa de los fibroblastos humanos en cultivo; excepto cuando las células fueron tratadas con punicalagina a las dosis de 10^{-9} y 10^{-10} M, donde no se observaron diferencias significativas con respecto al control.



CONCLUSIONES. Los polifenoles punicalagina y ácido elágico presentes en la fruta de la granada incrementan la proliferación de fibroblastos humanos en cultivo a un rango de concentraciones de 10^{-5} a 10^{-8} M, lo que sugiere su potencial uso para la mejora de la cicatrización de heridas.

**NON-CLINICAL TOXICOLOGY ASSAYS TO DEMONSTRATE THE SAFETY OF A
CELL MEDICINAL PRODUCT BEFORE FIRST CLINICAL USE**

Cynthia Morata Tarifa¹, Cristina Antúnez Rodríguez², Natividad Martín Morales³, Francisco O'Valle³, Rosario Sánchez Pernaute¹

¹ Red Andaluza de diseño y traslación de Terapias Avanzadas. Fundación Progreso y Salud. Sevilla.

² Área de Terapia Celular, Centro de transfusion, tejidos y células. Málaga.

³ Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA), Granada.

We have previously shown that clinical-grade human mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord (MSC) and irradiated with 2 Gy (IR-MSC), display good viability and upregulate the expression of tumor suppressor genes 48 hours after irradiation (*TRAIL*, *DKK3* and *ANXA1*), enhancing the effect of radiotherapy in tumor-bearing mice. To prove that the systemic administration of these cells is safe, we carried-out two subchronic toxicity studies (90 days) in NSG mice (single and repeat doses) under Good Laboratory Practices (GLP). 18 mice (6 per group) were injected intravenously with a single dose of 5000 IR-MSC, MSC or transformed MSC (tMSC, positive control) / g, a dose similar to that intended to be administered in a planned clinical trial. tMSC was generated using the retrovirus (coding for the catalytic subunit of human telomerase (hTERT)), HPV-16 E6 and E7, small T antigen SV40 (ST) and an oncogenic allele of H-Ras (H-RasV12) to induce transformation. At the end of the experiment, tMSC-injected mice showed a significant weight reduction compared to the MSC mice. Two tMSC-mice showed nodules in spleen and lung. In addition, one of them, presented an increase in size and inflammation in the spleen. No significant alterations were detected in the organs of IR-MSC and MSC mice. Next, we carried-out PCR for Alu sequences to determine the presence of human DNA in isolated organs. Human DNA was detected in the organs of 3 mice injected with tMSC (#16, heart; #17 heart and lung; #18, lung), showing that tMSC may be present at 90 days post-injection. In addition, we performed a repeat dose assay (days 1 and 3), similar to the previous one, using IR-MSC and MSC. The histological analysis of the evaluated organs showed that the intravenous administration of IR-MSC and MSC does not produce morphological alterations. Besides, human DNA was not detected in any organ. In conclusion, the results of both studies indicated that systemic administration of IR-MSC and MSC is safe.

NANO3DEVICES: NANODISPOSITIVOS TERANÓSTICOS CON APLICACIÓN TRASLACIONAL

Carlos Peris Torres^{1,2}, María Victoria Cano Cortés^{1,3,4}, Saúl Abenhamar Navarro-Marchal^{5,6,7},
Juan José Díaz Mochón^{1,3,4}, Juan Antonio Marchal^{4,5,7}, Rosario M. Sánchez-Martín^{1,3,4}

¹NANOCHEMBIO: Desarrollo de estrategias terapéuticas y de diagnóstico. Centro GENYO de Genómica e Investigación Oncológica, Granada 18016, España.

²NanoGetic S.L. Granada 18016, Spain.

³Dpto de Química Farmacéutica y Orgánica, Unidad de Excelencia de Química aplicada a Biomedicina y Medio ambiente, Universidad de Granada, Granada 18071, España. ⁴Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), Granada 18012, España.

⁵Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Granada 18016, España.

⁶Dpto. De Física Aplicada, Universidad de Granada, Granada 18071, España. ⁷Dpto. de Anatomía Humana y Embriología, Unidad de Excelencia "Modeling Nature" (MNat), Universidad de Granada, Granada, 18016, España.

Los nanodispositivos teranósticos son capaces tanto de administrar terapias como de seguir o rastrear una determinada enfermedad mediante sistemas de imágenes. Previamente hemos validado un nuevo nanodispositivo teranóstico trifuncionalizado para el cáncer, denominado Nano3Device. Consiste en nanopartículas sintéticas que portan un fármaco quimioterápico (doxorrubicina), un marcador Cy7 para poder hacer el seguimiento de dichas nanopartículas, y un péptido de localización CRGDK que reconoce activamente el receptor neuropilina-1, sobreexpresado en las células de cáncer de mama triple negativo. El objetivo principal de este trabajo es avanzar hacia la validación de este nanodispositivo como eficaz, seguro, versátil y no tóxico para su uso *in vivo* con aplicación teranóstica, es decir, para un tratamiento antitumoral selectivo y monitorizado. Para ello, el Nano3Device ha sido caracterizado fisicoquímicamente y se ha realizado una evaluación preclínica. Dicha evaluación se realizó tanto *in vitro* como *in vivo*, abordando la farmacocinética (incluyendo la distribución tisular), la toxicología y la farmacodinámica. También se ha investigado el potencial teranóstico *in vivo* del Nano3Device, comparándolo con la quimioterapia de primera línea de referencia y con tratamientos más selectivos, como la administración de fármacos basada en liposomas. Se han obtenido resultados preliminares en xenoinjertos de cáncer de mama triple negativo (células MDA-MB-231 en ratones NSG), demostrando que el uso de las nanopartículas Nano3Device reduce la dosis requerida de quimioterapia, promueve una acción local en la zona que rodea al tumor y reduce significativamente el volumen tumoral sin evidencia de toxicidad. Además, los niveles de Nano3Device en el tumor, el hígado y el plasma han sido indetectables tras el final del tratamiento, lo que sugiere que el nanodispositivo podría eliminarse con éxito. Este novedoso nanodispositivo aún debe ser validado en diferentes aspectos. Una vez confirmada su versatilidad, se le podrá unir una amplia gama de fármacos, marcadores y péptidos o anticuerpos selectivos, ampliando el potencial del nanodispositivo para el tratamiento del cáncer. Este trabajo tiene un claro enfoque traslacional, facilitando la transición de la investigación básica al desarrollo de aplicaciones clínicas que conduzcan a un mejor diagnóstico y tratamiento del cáncer.

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO POROSO PARA LA REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO ARTICULAR

Galocha-León Cristina¹, Antich Cristina^{2,3,4,5}, Clares-Naveros Beatriz¹, Voltes-Martínez Ana^{2,3,4,5}, Marchal Juan Antonio^{2,3,4,5}, Gálvez-Martín Patricia^{1,6}

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Granada E-18071, Spain

² Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research, University of Granada, Granada E-18100, Spain.

³ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, University Hospitals of Granada University of Granada, 18100 Granada, Spain

⁴ Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada E-18012, Spain

⁵ Excellence Research Unit "Modeling Nature" (MNat), University of Granada, Spain

⁶ R&D Animal and Human Health, Bioibérica S.A.U., Barcelona E- 08029, Spain

Los avances en la bioimpresión tridimensional (3D) han supuesto un gran progreso en el tratamiento de las lesiones del cartílago articular mediante la biofabricación de cartílago artificial como constructos biomiméticos que restauran o regeneran el tejido dañado. Para la fabricación de este tipo de constructos es fundamental la elección de biomateriales adecuados, especialmente para la fabricación de las biotintas cargadas con células. Este biomaterial no sólo debe proporcionar un buen entorno para que las células proliferen y se diferencien, sino que también debe protegerlas durante el proceso de bioimpresión 3D. El constructo desarrollado fue fabricado bioimprimiendo una biotinta a base de ácido hialurónico (AH) y alginato (AL) cargada con células madre mesenquimales humanas (hMSC) junto con otra tinta de soporte formulada a partir de ácido poliláctico (PLA) con el fin de imitar el entorno y las propiedades mecánicas del cartílago articular. El AH es el componente principal de la matriz extracelular del cartílago. Mientras que el AL es considerado como uno de los biomateriales más apropiados para la bioimpresión 3D, debido a sus adecuadas propiedades fisicoquímicas y reológicas y a sus propiedades bioinertes que han demostrado promover la condrogénesis. El principal objetivo de este proyecto se centra en el diseño, desarrollo y caracterización de un producto de ingería tisular que: 1) sirva como sustrato para la adhesión de las células, 2) asegure la viabilidad y liberación de las células en el tejido u órgano diana tras su implantación, 3) proporcione un soporte mecánico temporal para el tejido nuevo y 4) guíe el desarrollo de nuevos tejidos con la función apropiada. La biotinta de AL/AH cargada con hMSC fue desarrollada preparando una solución constituida por AL (2% p/v) y AH (1% p/v). Primero se depositaron varias capas de PLA y posteriormente se inyectó la biotinta cargada con células. Finalmente, se reticuló mediante inyección de cloruro de calcio. La viabilidad celular, la proliferación celular y las propiedades fisicoquímicas como la porosidad y la degradación fueron evaluadas con el fin de determinar la funcionalidad del constructo desarrollado. Los resultados del análisis biológico demostraron que el constructo biomimético desarrollado ofrecía un entorno favorable para las hMSCs, manteniendo un alto porcentaje de viabilidad celular durante 14 días. Además, se observó un aumento significativo de la proliferación celular durante ese periodo. Desde el punto de vista fisicoquímico, los resultados mostraron una porosidad adecuada para facilitar el intercambio de nutrientes y fluidos, así como la migración celular, creando un entorno favorable para la regeneración de tejidos. Por último, se observó una tasa de degradación lenta lo que representaría una ventaja en la regeneración del cartílago, ya que se requieren largos periodos de tiempo para su cicatrización. El constructo diseñado presenta a priori unas características prometedoras para la regeneración de cartílago. Sin embargo, son precisos más ensayos para caracterizar plenamente y evaluar su funcionalidad.

PREDICCIÓN DEL COLOR EN RESINAS DE COMPOSITE DENTALES ESTRATIFICADAS

Tejada-Casado María ^{a,b}, Pérez María del Mar ^{a,b}, Ghinea Razvan ^{a,b,c}, Ionescu Ana Maria ^{a,b}, Ruiz-López Javier ^{a,b}, Herrera Luis Javier ^d

^a Department of Optics, Faculty of Science, University of Granada, Campus de Fuentenueva, s/n 18071 Granada, Spain. mariatejadac@ugr.es; rghinea@ugr.es; mmperez@ugr.es; jruizlo@ugr.es

^b Instituto de Investigación Biosanitaria IBS GRANADA, Spain

^c Department of Physics, Faculty of Sciences, University of Craiova, 13 Al Cuza Street, Craiova, 200585, Romania. rghinea@ugr.es

^d Department of Computer Architecture and Computer Technology, E.T.S.I.I.T. University of Granada, s/n 18071, Granada, Spain. lherrera@ugr.es

Objetivo: El objetivo principal de este estudio fue el desarrollo de un método predictivo basado en el Análisis de Componentes Principales (PCA), para la reconstrucción de la reflectancia espectral y la estimación del color de los composites de resina dental con capas de diferentes espesores.

Material y método: Se fabricaron 25 muestras bicapa de diferentes espesores clínicamente relevantes utilizando diferentes tonos de VITAPAN Excell (VE) y VITAPAN Dentine (VD), combinados con sus correspondientes tonos de esmalte. La reflectancia espectral fue medida con un espectrorradiómetro (PR-670) sobre un fondo negro estándar y usando geometría iluminación/medida CIE 45°/0°. Se construyó un algoritmo basado en PCA a partir de un conjunto de entrenamiento de 9 muestras (distribuidas de forma heurística para abarcar completamente el espacio de muestreo), mientras que para la evaluación del algoritmo se utilizó un conjunto de test formado por las restantes 16 muestras. Para la evaluación del algoritmo se utilizaron el error cuadrático medio (RMSE), la bondad del ajuste (GFC), así como el ΔE_{00} con los correspondientes umbrales de aceptabilidad y percepción del 50:50%.

Resultados: Los valores obtenidos al comparar las reflectancias medidas (reales) y las estimadas fueron $RMSE < 0.0098$ y $GFC > 0.9999$. La diferencia de color media entre el color estimado y medido fue $\Delta E_{00} = 0.45$, siendo el 100% de las diferencias de color (ΔE_{00}) menores que el umbral de aceptabilidad y el 87.5% menores que el umbral de perceptibilidad.

Conclusiones: El método predictivo propuesto, basado en PCA, permite reconstruir la reflectancia espectral y estimar el color de los composites de resina dental estratificados de diferentes espesores con un alto grado de precisión. Estos resultados abren el camino para el diseño y la fabricación personalizada de resinas de composite y podrían ser una herramienta útil para el éxito clínico de las restauraciones dentales.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por los proyectos R+I+D PGC2018-101904-AI00 y RTI2018-101674-B-I00, financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ERDF "Una manera de hacer Europa", la beca R+I+D P20-00200 de la Junta de Andalucía y A.TEP.280.UGR18 de la Universidad de Granada. María Tejada Casado es estudiante de doctorado subvencionada por la Universidad de Granada y VITA Zahnfabrik H. Rauter GmbH & Co. KG (Contrato OTRI 4346).

EFECTO DEL TIROSOL, COMPUESTOS FENÓLICO PRESENTE EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA, SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

Anabel González-Acedo¹, Olga García-Martínez^{1,2}, Lucía Melguizo-Rodríguez^{1,2}, Enrique García-Recio^{1,2}, Rebeca Illescas-Montes^{1,2}, Javier Ramos Torrecillas^{1,2}

¹ Grupo de investigación BIO277. Departamento de Enfermería. Universidad de Granada

² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Spain

Introducción: En la actualidad, los compuestos bioactivos de diversas especies vegetales, como el tirosol presente en el aceite de oliva virgen extra (3), se presentan como una nueva alternativa terapéutica en el manejo de las heridas crónicas gracias a su capacidad para estimular diversos mecanismos involucrados en el proceso de cicatrización (1,2). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tirosol sobre la proliferación y la capacidad de migración de fibroblastos humanos en cultivo.

Metodología: La línea de fibroblastos CCD-1064Sk fue tratada con tirosol a diferentes concentraciones ($10^{-5}M$ - $10^{-9}M$). La capacidad proliferativa se determinó mediante la técnica espectrofotométrica del MTT tras 24 horas de tratamiento (4), mientras que la migración celular se evaluó mediante la técnica del scratch a las 4,8,12 y 24 horas del tratamiento (5). En todos los ensayos se incluyeron células no tratadas como grupo control.

Resultados: Las dosis de $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$ estimularon significativamente la proliferación celular, especialmente en los cultivos tratados con las dosis de $10^{-5}M$ y $10^{-6}M$. Para evaluar la migración celular se utilizaron las concentraciones que tuvieron un mayor efecto en el ensayo de proliferación, obteniéndose resultados significativos con ambas dosis a las 12 y 24 horas del tratamiento.

Conclusión: Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el tirosol podría estimular la regeneración de los tejidos, en términos de incrementar la proliferación y migración celular de fibroblasto humanos, presentándose como una posible opción terapéutica en el tratamiento de heridas crónicas.

Bibliografía:

1. Addis R, Cruciani S, Santaniello S, Bellu E, Sarais G, Ventura C, et al. Fibroblast Proliferation and Migration in Wound Healing by Phytochemicals: Evidence for a Novel Synergic Outcome. *Int J Med Sci.* 2020;17(8):1030–42.
2. Melguizo-Rodríguez L, de Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Illescas-Montesa R, Costela-Ruiz VJ, García-Martínez O. Potential Effects of Phenolic Compounds That Can Be Found in Olive Oil on Wound Healing. *Foods.* 2021 Jul 15;10(7):1642.
3. Carrara M, Kelly MT, Roso F, Larroque M, Margout D. Potential of Olive Oil Mill Wastewater as a Source of Polyphenols for the Treatment of Skin Disorders: A Review. *J Agric Food Chem.* 2021 Jul 7;69(26):7268–84.
4. Illescas-Montes R, Melguizo-Rodríguez L, Manzano-Moreno FJ, García-Martínez O, Ruiz C, Ramos-Torrecillas J. Cultured Human Fibroblast Biostimulation Using a 940 nm Diode Laser. *Materials.* 2017 Jul;10(7):793.
5. Cappiello F, Casciaro B, Mangoni ML. A Novel In Vitro Wound Healing Assay to Evaluate Cell Migration. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2018 Mar 17;(133):e56825.



II SIMPOSIO DE

TERAPIAS AVANZADAS Y TECNOLOGÍAS BIOMÉDICAS

LIBRO DE ABSTRACTS
ABSTRACT BOOK

17 DICIEMBRE 2021

Salón de Actos de la Facultad de Medicina
Universidad de Granada

ORGANIZA:

 **ibs.GRANADA**
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA