

*Organizado por el:*



SALÓN DE ACTOS

# I SIMPOSIUM DE MEDICINA DE PRECISIÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO CLÍNICO SAN CECILIO

*Solicitada Acreditación  
en la ACSA*



Agencia de Calidad Sanitaria  
de Andalucía

**13 DICIEMBRE**



Escuela Andaluza de Salud Pública  
CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS

## COMUNICACIONES

Ponente: Alba Ortigosa Palomo

Título: Transcriptomic analysis of cell subpopulations in breast cancer patients

Ponente: Eco Javier Manzano Moreno

Título: Efecto de la clorhexidina de uso oral sobre la inducción de apoptosis/necrosis en el osteoblasto

Ponente: Jose Antonio Laz Ruiz

Título: A novel nanodevice for the detection and isolation of EVs based on antibody specific recognition

Ponente: Antonio Delgado González

Título: Chem-NAT: A chemical approach for miR-21 direct detection and quantification

Ponente: Sergio Cuenca López

Título: Chromosomal rearrangement detection as a tumor biomarker using magnetic capture, microscopy and flow cytometry

Ponente: Teresa Vezza

Título: THE IMPACT OF OLIVE LEAF EXTRACT ON INTESTINAL PERMEABILITY AND LIVER INFLAMMATION IN A MOUSE MODEL OF DIET-INDUCED OBESITY

Ponente: Mireia Tena-Garitaonaindia

Título: Prebiotics as alternative prophylactic strategies against *Pseudomonas aeruginosa* infection

Ponente: Patricia Diez Echave

Título: Effect of a *Hibiscus sabdariffa* extract in liver inflammation and intestinal epithelial permeability in obese mice

Ponente: María Soledad Benítez Cantos

Título: Computational T-cell receptor repertoire analysis from high-throughput sequencing data

Ponente: Ana Fuentes

Título: Nuevos Retos, Nuevas Oportunidades: Microeliminación de hepatitis C en el área de Medicina Interna de un Hospital de Especialidades

Ponente: Ana Fuentes

Título: Diagnóstico descentralizado integrado de la Hepatitis C

Ponente: Ana Fuentes

Título: Alertas compartidas: un paso más para asegurar el éxito del DxIP de la Hepatitis C

Ponente: Francisco Javier López Delgado

Título: Synthesis of Reagents for ChemNAT technology

Ponente: Olga Martínez Augustín

Título: La calprotectina regula la diferenciación de organoides de epitelio intestinal deratón. Implicación del metabolismo del Zinc

Ponente: Jose Alberto Molina Tijeras

Título: THE IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF THE PROBIOTIC *LACTOBACILLUS REUTERI* INIA P572 CONTRIBUTE TO ITS INTESTINAL ANTIINFLAMMATORY EFFECTS IN DSS-COLITIS IN MICE

Ponente: Fermín Sanchez de Medina

Título: La delección génica del receptor de glucocorticoides NR3C1 produce un fenotipo proinflamatorio en organoides intestinales murinos

Ponente: Juan Jose Guardia Monteagudo  
Título: DETECTION OF NUCLEIC ACID WITH DGL BASED ON THE SERINE AMINO ACID

Ponente: Jose Francisco Díaz Cuélla  
Título: Characterization of exosomes and their progenitor cells by cytometry and quantitative PCR

Ponente: Antonio Jesus Ruiz Malagón  
Título: EFFECT OF A MORUS ALBA LEAF EXTRACT IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF OBESITY: IMPACT ON LIVER STEATOSIS AND INFLAMMATION.

Ponente: María Jesus Rodriguez Sojo  
Título: EFECTO INMUNOMODULADOR DEL PROBIÓTICO LACTOBACILLUS PARACASEI INIA P272 EN COLITIS INDUCIDA POR DSS: IMPACTO SOBRE POBLACIONES DE CÉLULAS INMUNE

Ponente: Raquel Gonzalez Perez  
Título: CORTISOL EN CABELLO: PREDICTOR DE DEPRESIÓN POSPARTO Y BIOMARCADOR DE ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO-ADRENAL

Ponente: Matilde Ortiz González  
Título: Design of nanosystems conjugated with antibody fragments to treat the neurological stage of African trypanosomiasis

Ponente: Diego Almagro Nievas

Título: BROTE DE TOXINFECCIÓN ALIMENTARIA POR NOROVIRUS GII POSIBLEMENTE RELACIONADO CON ESTABLECIMIENTO ALIMENTARIO

Ponente: Saray Montalvo Acosta  
Título: INFLAMASOMAS COMO BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS DE SEVERIDAD EN EL PROCESO INFLAMATORIO DE LA ENFERMEDAD PERIIMPLANTARIA

Ponente: Adolfo de Salazar  
Título: Análisis de resistencias de fallos a Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir en vida real

Ponente: José David Puentes Pardo  
Título: INFLUENCIA DE P53 EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES POR PARP-1 EN EL CÁNCER COLORRECTAL

Ponente: Sara Moreno San Juan  
Título: Agomelatina como nueva estrategia de tratamiento frente al cáncer colorrectal

Ponente: María García Costela  
Título: Narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) seed β-conglutin proteins induce G0/G1 arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells

Ponente: Laura Hidalgo García  
Título: TNF- $\alpha$  AND IFN- $\gamma$  INDUCE AN ANTIINFLAMMATORY PHENOTYPE IN INTESTINAL MESENCHYMAL STROMAL CELLS

**TITLE: PHAGOCYTIC CAPACITY OF HUMAN DERIVED ADIPOSE TISSUE MESENCHYMAL STROMAL CELLS.**

**Authors.** Víctor J. Costela-Ruiz <sup>1,2</sup>; Lucia Melguizo-Rodríguez <sup>1,2</sup>; Enrique García-Rocio<sup>1,2</sup>; Rebeca Illescas-Montes <sup>1,2</sup>; Elvira De Luna-Bertos <sup>1,2</sup>; Concepción Ruiz <sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>*BIOTEJSALUD Group (TEC-17). Instituto Investigación Biosanitaria, ibs.Granada, C/ Doctor Azpitarte 4, 4<sup>a</sup> planta, 18012. Granada, Spain.*

<sup>2</sup>*Biomedical Group (BIO277). Department of Nursing, Faculty of Health Sciences. University of Granada, Avda. Ilustración 60, 18016. Granada, Spain.*

**Introduction.** Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) are characterized by colony-forming capacity, adherence to plastic, the expansion in *in vitro* cultures, and their pluripotential character; conferring them with potential osteogenic, adipogenic, and chondrogenic (1,2). MSCs show multiple clinical applications. Thus, it has been attributed immunomodulatory properties to MSCs that may be useful to control inflammation and tissue damage (3).

**Aim.** The aim of this study was to determine if MSCs in culture have phagocytic capacity.

**Metodology.** Human adipose tissue MSC (AT-MSC) lines were isolated from three adipose tissue samples from three different donors. Samples were digested and then harvested. After that, cells were typified by flow cytometry and differentiated to osteogenic and adipogenic lineage. After characterization, MSC were harvested for 24h with latex beads (1.8 $\mu$ m). MSCs phagocytic capacity was analyzed using transmission electron microscope (LIBRA 120 PLUS of Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Germany).

**Results.** Transmission electron microscopy showed the capacity of the cells to internalize latex beads (Fig 1). The high phagocytic index observed was noteworthy.

**Discussion.** This study demonstrated the phagocytic capacity of AT-MSCs. These findings support the internalization of Mycobacterium tuberculosis through scavenger receptors reported by other authors (4).

**Conclusion.** The high phagocytic capacity observed in MSCs, which have known regenerative potential, may offer an advance in the approach to certain local and systemic infections.

**References.**

1. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. octubre de 1970;3(4):393-403.

2. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* septiembre de 1991;9(5):641-50.
3. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cyotherapy.* febrero de 2016;18(2):160-71.
4. Khan A, Mann L, Papanna R, Lyu M-A, Singh CR, Olson S, et al. Mesenchymal stem cells internalize *Mycobacterium tuberculosis* through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy. *Sci Rep.* 8 de noviembre de 2017;7(1):15010.

**TITLE: DEVELOPMENT A NOVEL MULTIFUNCTIONAL NANODEVICE FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

**Authors.** Victoria Cano-Cortés<sup>1,2</sup>, Jose A. Laz-Ruiz<sup>1,2</sup>, Cristina Cano-Cortés<sup>3</sup>, Juan J. Díaz-Mochón<sup>1,2</sup>, Rosario Mª Sánchez-Martín<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada / Andalusian Regional Government (GENyO). NANOCHEMbio Laboratory, PTS Granada, Avenida de la Ilustración, 114, 18016 Granada, Spain.* <sup>2</sup>*Faculty of Pharmacy, Department of Medicinal and Organic Chemistry, University of Granada, Campus universitario Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain.* <sup>3</sup>*Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Campus de Teatinos, S/N, 29010 Málaga* E-mail [vcortes@go.ugr.es](mailto:vcortes@go.ugr.es)

NanoChemBio group has a robust know-how in the Nanotechnology's field. We have prepared a broad portfolio of nanoparticles of different nature that has been broadly used in nanomedicine. We have developed a series of normalized protocols for multifunctionalization of these nanoparticles based on orthogonal protection strategies. These engineered nanoparticles have been successfully conjugated to small molecules (drugs and sensors), proteins and nucleic acids (oligonucleotides, plasmid DNA, siRNA and miRNA) without altering the properties and activity of the bioactive cargoes. In this project, it has been developed an effective, safe and non-toxic nanosystem based on the use of synthetic nanospheres that are multivalent and trifunctionalized with (i) a drug, (ii) a diagnostic tracker and (iii) a ligand for targeted delivery.

In order to achieve it, protocols have been successfully developed to generate these theranostic nanoparticles in a reproducible manner and to determine their physico-chemical properties. The cellular uptake efficiency and cell viability in a panel of breast cancer cell lines have been successfully achieved (analysis by flow cytometry and confocal microscopy). Tumour development and tracking of nanodevices were analysed by NIR fluorescence imaging. From the *in vivo* studies, there are three main achievements worth highlighting: (1) location of the multifunctionalized nanoparticles within the tumour area; (2) tumour sizes were markedly reduced; and (3) in contrast to free drug, nanoparticle-bound drug did not induce any toxicity in the mice.

In conclusion, a prototype of this theranostic nanodevice to treat breast cancer and to monitor treatment efficiency together with to determine localization of the tumour focus and, what is even more important, to locate metastatic foci has been developed.

**TITLE: TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF CELL SUBPOPULATIONS IN BREAST CANCER PATIENTS**

**Authors.** Ortigosa-Palomo, Alba<sup>1</sup>; Garrido-Navas, Carmen<sup>1</sup>; García Puche, José Luis<sup>1</sup>; Torné, Pablo<sup>2,3</sup>; Lorente, José Antonio<sup>1,4</sup>; Serrano, María José<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>*GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research (Pfizer / University of Granada / Andalusian Regional Government), PTS Granada Av. de la Ilustración, 114, 18016, Granada, Spain.*

<sup>2</sup>*Department of Surgery, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain.*

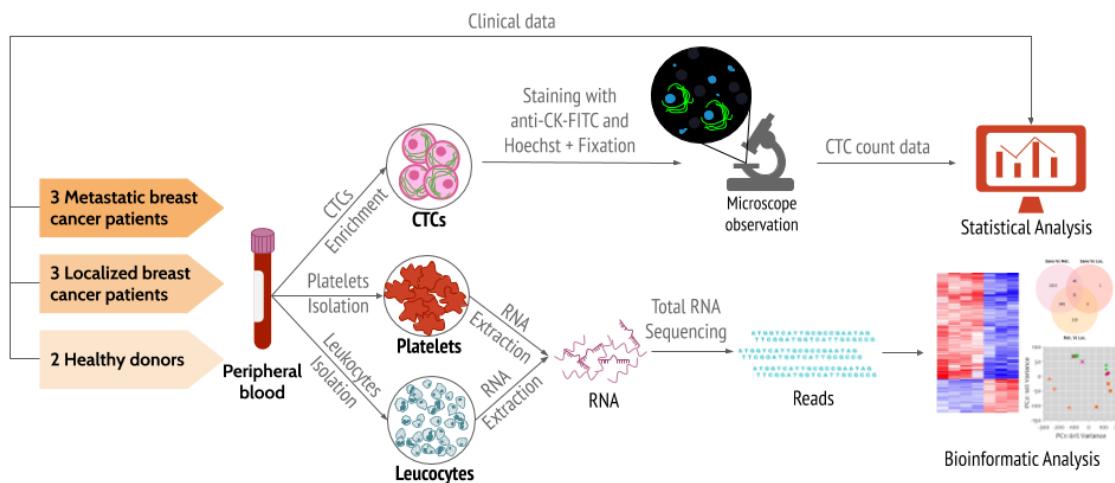
<sup>3</sup>*Unit of Mammary Pathology, General Surgery Service, University Hospital Campus de la Salud, Granada, Spain.*

<sup>4</sup>*Laboratory of Genetic Identification, Department of Legal Medicine, University of Granada, Av. de la Investigación, 11, 18071 Granada, Spain.*

<sup>5</sup>*Integral Oncology Division, Virgen de las Nieves University Hospital, Av. Dr. Olóriz 16, 18012, Granada, Spain.*

Breast cancer is the second most common type of cancer in the world and the most common in women. Survival rates are greater when cancer is detected earlier, before metastasis occurs, thus understanding the mechanisms driving cancer dissemination is of great interest. This has driven the development of new strategies for detection of prognostics and treatment response biomarkers of the disease. Among these strategies, liquid biopsy (LB) is becoming an useful tool as it is a non-invasive technique allowing to obtain tumor information in a body fluid repeatedly in time. The main biomarkers used in LB up to date are circulating tumor cells (CTCs) and cell-free DNA (cfDNA). However, their scarcity in blood and the need of highly sensitive technologies to study them difficult their clinical implementation. Recently, novel biomarkers such as tumor educated platelets (TEPs) and leukocytes, more abundant in blood than CTCs and cfDNA are attracting interest. The main objective of this study was to analyze the transcriptomic profiles of leukocyte and platelet subpopulations in both breast cancer patients and healthy donors in order to identify diagnostic biomarkers in this type of cancer. In addition, the presence of CTCs in these cohorts was determined and correlated with clinicopathological variables. Preliminary results showed that levels of *miRNA5690* and *FHL3* in leukocytes and of *GLYATL2*, *HLA-B*, *CTSW*, *CDK16* and *SH3PXD2A* in platelets might be potential diagnostic biomarkers of the disease.

**Keywords:** *Breast cancer, liquid biopsy, platelets, leukocytes, transcriptomic*



**TÍTULO: EFECTO DE LA CLORHEXIDINA DE USO ORAL SOBRE LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS/NECROSIS EN EL OSTEOBLASTO**

**Autores.** Francisco Javier Manzano Moreno<sup>1,2</sup>, Víctor Javier Costela Ruiz<sup>2,3</sup>, Enrique García Recio<sup>2,3</sup>, Rebeca Illescas Montes<sup>2,3</sup>, Lucia Melguizo Rodríguez<sup>2,3</sup>, Javier Ramos Torrecillas<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Estomatología. Facultad de Odontología. Universidad de Granada

<sup>2</sup> Grupo BIOTEJ SALUD (IBS-TEC-17). Instituto de Investigaciones Biosanitarias, ibs. Granada

<sup>3</sup> Departamento de Enfermería. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Granada.

**Introducción:** El hueso autólogo recogido mediante fresado biológico ha demostrado tener capacidad osteogénica y bajo riesgo de contaminación bacteriana en comparación con otras técnicas de recogida de injertos óseos. Sin embargo, sigue existiendo una alta susceptibilidad de contaminación bacteriana del hueso recogido por este procedimiento, debido a la gran cantidad de microorganismos que constituyen la flora oral habitual, por ello se hace necesario su tratamiento con antisépticos previa a su aplicación clínica. Entre ellos, la clorhexidina se ha mostrado claramente efectiva para disminuir la carga bacteriana de los injertos óseos. Sin embargo, estudios de nuestro grupo han mostrado que el tratamiento de los osteoblastos con clorhexidina al 0,12% durante 1 minuto, conduce a una disminución significativa de la proliferación celular.

**Objetivo:** Evaluar el efecto citotóxico de la clorhexidina al 0,12% durante 1 minuto osteoblastos humanos en cultivo, mediante el análisis de la inducción de apoptosis/necrosis.

**Metodología:** Las líneas celulares establecidas de osteoblastos humanos, obtenidas mediante cultivo primario de explantes óseos intraorales, fueron tratadas con clorhexidina al 0,12%. Células tratadas con suero fisiológico fueron utilizadas como grupo control. El estudio del efecto citotóxico se determinó mediante el análisis de la inducción de la apoptosis/necrosis mediante el doble marcaje con Anexina V e Ioduro de Propidio, tras 1 minuto de tratamiento y su posterior lectura por citometría de flujo.

**Resultados y conclusión:** El tratamiento de los osteoblastos con clorhexidina al 0,12% durante 1 minuto, mostró un efecto citotóxico, el cual se tradujo en un aumento significativo de células apoptóticas ( $p=0.004$ ) y de células necróticas ( $p=0.003$ ) con respecto al control (suero fisiológico).

El efecto citotóxico observado, con inducción de apoptosis y de necrosis, explicaría la disminución de la proliferación celular observada previamente cuando los osteoblastos son tratados durante 1 minuto con clorhexidina al 0,12%. Hemos de señalar que esta es la dosis utilizada habitualmente empleadas de forma tópica en la cavidad oral. Nuestros resultados sugieren que a pesar de ser un agente efectivo para la descontaminación

bacteriana, debe ser utilizado con cautela puesto que puede tener efectos adversos sobre la regeneración del tejido óseo de la cavidad oral.

**Keywords:** antisépticos; clorhexidina; osteoblastos; apoptosis; citometria.

**TITLE: A NOVEL NANODEVICE FOR THE DETECTION AND ISOLATION OF EVS  
BASED ON ANTIBODY SPECIFIC RECOGNITION**

**Authors.** José Antonio Laz-Ruiz<sup>1,2,3</sup>, María Victoria Cano-Cortés<sup>1,2,3</sup>, María Belén García-Ortega<sup>2,4</sup>, Juan Antonio Marchal-Corrales<sup>2,5</sup> and Rosario María Sánchez Martín<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*GENYO: Pfizer – Universidad de Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics & Oncological Research, Health Science Technological Park (PTS), Avenida de la Ilustración 114, 18016 Granada, Spain.*

<sup>2</sup>*Biosanitary Institute of Granada (ibis.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, Granada, Spain.*

<sup>3</sup>*Department of Medicinal & Organic Chemistry and Excellence Research Unit of Chemistry applied to Biomedicine and the Environment, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain.*

<sup>4</sup>*Oncology Department, Oncology Unit, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain.*

<sup>5</sup>*Department of Human Anatomy and Embryology, Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of Granada, Granada, Spain.*

**Abstract.** In addition to their role in cellular communication, EVs have re-emerged as a novel source of potential biomarkers for numerous diseases such as cancer. The development of efficient methods for the detection and isolation of EVs is a current challenge. The aim of this project is the development of a novel nanodevice based on the conjugation of specific antibodies to bind EVs receptors to fluorescent-labelled polystyrene nanoparticles (PS-NPs) in order to isolate EVs and be detected by flow cytometry. For this proof of concept, tetraspanins proteins have been targeted. Protocols based on standard solid phase chemistry are used for the decoration of the nanoparticles in a controlled manner. The efficiency of detection and isolation of EVs using this nanodevice was evaluated by flow cytometry, confocal microscopy, imaging flow cytometry and TEM. The functionalization of the nanodevice conjugated to the specific antibody with a fluorophore to allow the tracking of the PS-NPs by fluorescent based techniques such as flow cytometry has been successfully achieved. The detection of EVs using this nanodevice was efficient.

**TITLE: CHEM-NAT: A CHEMICAL APPROACH FOR MIR-21 DIRECT DETECTION AND QUANTIFICATION**

**Authors.** A. Delgado-Gonzalez<sup>1,2</sup>, A. Robles-Remacho<sup>1,2</sup>, A. Marin-Romero<sup>1,2,3</sup>, B. Lopez-Longarela<sup>3</sup>, F.J. Lopez-Delgado<sup>1,3</sup>, J.J. Guardia-Monteagudo<sup>3</sup>, M.A. Fara<sup>3</sup>, M. Tabraue-Chavez<sup>3</sup>, S. Pernagallo<sup>3</sup>, R.M. Sanchez-Martin<sup>1,2</sup>, J.J. Diaz-Mochon<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research (GenYo), Granada, Spain.

<sup>2</sup> Department of Medicinal and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain.

<sup>3</sup>DestiNA Genomica S.L., Armilla, Spain.

**Abstract.** miR-21 is an oncomiR upregulated in a lot of pathological conditions, being often associated with poor prognosis in cancer. miR-21 upregulation is directly associated to cell proliferation, cell migration, and invasion, aside from the generation of chemoresistance. To date, the gold standard technique to identify and quantify miRNAs is RT-qPCR; nevertheless, it is not particularly suitable for small RNA species. The need of isolating small RNA population from biological specimens during sample prep joined to the elongation and conversion of target molecules into cDNA to then perform, PCR amplification steps, represents substantial drawbacks. Aiming to overcome these issues, a chemical and PCR-free approach for the detection and quantification of miRNAs, especially miR-21, directly from cells, in a rapid, robust, and cost-effective way, has been developed.

For that, peptide nucleic acids (PNA) probes fully complementary to miR-21 and containing an abasic position in front of a nucleotide of study (**DGL probes**) were coupled through EDC chemistry to magnetic Dynabeads® to give rise to **Magbeads-21**. Pellets obtained from tumour cell lines MDA-MB-231 (breast cancer) and H1975 (lung cancer) overexpressing miR-21, and from PBMCs, which lack miR-21 expression, were used as biological sources. Thereupon cell lysis, **Magbeads-21** were incubated with cell lysates to capture miR-21 molecules which hybridise in an antiparallel orientation with the DGL probes, forming a perfect duplex. After a magnetic purification, **Magbeads-21** capturing miR-21 were added to a solution containing a biotinylated reactive aldehyde-modified non-natural adenine (**Smart-2dA-biotin**) and a reducing agent (NaBH<sub>3</sub>CN). The perfect duplex formed between the DGL probes and miR-21 molecules acts as a template for a thermodynamically controlled reaction that takes place between the aldehyde of the **Smart-2dA-biotin** and the secondary amine of the abasic position, giving rise to a reversible specie iminium, which is immediately reduced to a stable tertiary amine, producing a dynamic chemistry labelling (**DCL**). In order to detect the **Smart-2dA-biotin** specific incorporation, a biolabelling step is performed through a fluorogenic enzymatic assisted assay: Streptavidin-β-Galactosidase (SbG) binds to biotinylated **Smart-2dA** and Resorufin-β-D-Galactopyranoside (RGP) reacts with SbG, releasing the fluorescent compound resorufin upon enzymatic hydrolysis. Given that resorufin fluorescence is directly proportional to the amount of SbG presented in

**Magbeads-21**, the number of molecules of miR-21 presented in the tumour cells could be determined using a calibration curve. This methodology is not limited only to cells and can be extended to other biological sources such as plasma or serum.

**TITLE: CHROMOSOMAL REARRANGEMENT DETECTION AS A TUMOR BIOMARKER USING MAGNETIC CAPTURE, MICROSCOPY AND FLOW CYTOMETRY.**

**Authors.** Cuenca-López, S.<sup>1</sup>; Álvarez-Cubero, M.J.<sup>2</sup>; Catalina; P.<sup>3</sup>; Marchal, J.A.<sup>4</sup>; Jiménez, G<sup>5</sup>; Santiago, O<sup>6</sup> and Martínez, L.J.<sup>7</sup>.

<sup>1</sup> *Master of Translational Research and Personalized Medicine; University of Granada;*  
*sergio8lopez@correo.ugr.es*

<sup>2</sup> *GENYO. Centro Pfizer – Universidad de Granada – Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica; Department of Biochemistry and Molecular Biology III and Immunology, University of Granada; mjesusac@ugr.es*

<sup>3</sup> *Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz, Granada;*  
*purificacion.catalina@juntadeandalucia.es*

<sup>4,5</sup> *Department of Human Anatomy and Embryology, University of Granada;*  
*jmarchal@ugr.es; gemajg@ugr.es.*

<sup>6,7</sup> *GENYO. Centro Pfizer – Universidad de Granada – Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica; luisjavier.martinez@genyo.es; olivia.santiago@genyo.es*

**Abstract.** Cancer heterogeneity constitutes the major source of disease progression and therapy failure. Tumors comprise functionally diverse subpopulations, with cancer stem cells (CSCs) as the source of this heterogeneity. CSCs have high genomic instability that seems to be influenced in some ways by the surrounding microenvironment. Previous studies showed that CSCs cultured in conditioned medium (CM), obtained from mesenchymal stem cells (MSCs), contain alterations in the band q25 of chromosome 17. Greater knowledge of the aforementioned alterations could provide a template that serves as a pattern with clinical use in the diagnosis, cancer classification, and prognosis at early stages. To track an unstable area in DNA, it is very interesting to use different techniques that let us to visualize it microscopically, for a quick quantification of the sample by cytometry and knowing the exact sequence of this area by next-generation sequencing. In this work, the possibility of performing a study using these three techniques mentioned above has been successfully carried out. For this, two common DNA probes have been used for all techniques. Each of the techniques commented above individually presents great advantages for its use as a diagnostic tool against cancer. However, using multifunctional probes, which we present in this work, these advantages are enhanced since the weak points of each technique are covered by the strong points of others. Besides, the degree of comparability between the techniques is total because the targeted and analyzed region does not change. So, this combined strategy will allow us to study the region q25 of chromosome 17 exhaustively and search for alterations in the genome of CSCs. The analysis of this region is necessary since there is some certainty that this region can provide us with a genomic pattern of malignancy. This pattern may be the key to the diagnosis, classification, and prognosis of cancer in its early stages. In the same way that breast cancer is divided into subtypes with different prognosis and treatment, other types of cancers could be characterized and improved treatment by this pattern. The knowledge of these genomic variations

opens the door to a translational application of this work. Once these alterations are known, this technology can be used as an early diagnostic kit.

**TITLE: THE IMPACT OF OLIVE LEAF EXTRACT ON INTESTINAL PERMEABILITY AND LIVER INFLAMMATION IN A MOUSE MODEL OF DIET-INDUCED OBESITY .**

**Authors.** T Vezza<sup>1</sup>, A Rodriguez-Nogales<sup>1</sup>, F Algieri<sup>1</sup>, J Garrido-Mesa<sup>1</sup>, M Romero<sup>2</sup>, M Sanchez<sup>2</sup>, M Toral<sup>2</sup>, C Rodriguez-Perez<sup>3,4</sup>, AM Gómez-Caravaca<sup>3,4</sup>, A Segura-Carretero<sup>3,4</sup>, V Micol<sup>5</sup>, MP Utrilla<sup>1</sup>, J Duarte<sup>2</sup>, ME Rodríguez-Cabezas<sup>1,\*</sup>, J Galvez<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> CIBER-EHD, Department of Pharmacology, ibs.GRANADA, Center for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, 18071-Granada, Spain.

<sup>2</sup> CIBER-Enfermedades Cardiovasculares, Department of Pharmacology, ibs.GRANADA, Center for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, 18071-Granada, Spain.

<sup>3</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071-Granada, Spain.

<sup>4</sup> Research and Development Centre for Functional Food (CIDAF), Health-Science Technological Park, Avenida del Conocimiento 37, 18016-Granada, Spain.

<sup>5</sup> CIBERobn, Instituto de Salud Carlos III (CB12/03/30038), Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB), Miguel Hernández University (UMH), 03202-Elche, Alicante, Spain.

**Introduction:** The incidence of obesity and its related conditions, including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), has dramatically increased in all age groups worldwide. The intestinal permeability (IP) and increased gut microbial dysbiosis contribute to the inflammatory pathway involved in steatohepatitis development associated with obesity. Recent evidence from the literature show how IP can be modulated by several phenolic plant extracts and be the target for future preventive and curative treatment of these disease. In this way we evaluate the effect of olive leaf extract (OLE) in diet-induced obesity (DIO) in mice, to investigate its impact on IP and liver inflammatory status in obese mice.

**Methods:** Male C57BL/6J mice (7–9 weeks old) were randomly assigned to different groups ( $n=9$ ): control, control-treated, obese and obese-treated. Control mice received a normal chow diet whereas obese mice were fed a high-fat diet (HFD). The obese mice were daily administered with the olive leaf extract at different doses (1, 10 and 25 mg/kg), dissolved in water, by oral gavage for 5 weeks. Animal body weight, food and water intake were controlled regularly during the treatment. Once sacrificed, the inflammatory status was evaluated biochemically by determining the liver expression of mediators involved in the inflammatory response or in the intestinal epithelial barrier function.

**Results:** The administration of OLE to HFD-fed mice significantly decreased body weight gain, although no difference in energy intake were observed among the groups. This effect was associated with a reduced expression of liver pro-inflammatory mediators (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$ ), while increasing that of key players of the intestinal epithelial integrity (occludin, ZO-1, MUC-2 and MUC-3). In addition, OLE ameliorated gene expression of adipocyte-specific transcription factors, such as peroxisome proliferation-

activity receptor (PPARs), and upregulated the mRNA expression of leptin receptor, which is critical for adipogenesis. In accordance with these beneficial effects, OLE treatment to obese mice resulted in a significant decrease in Toll-like receptor (TLR)-4 expression by liver.

**Discussion / Conclusion:** The olive leaf extract exerts beneficial effects in HFD-induced obesity in mice, revealing an improvement of liver inflammatory status, together with an amelioration of the gut barrier function.

**TITLE: PREBIOTICS AS ALTERNATIVE PROPHYLACTIC STRATEGIES AGAINST  
PSEUDOMONAS AERUGINOSA INFECTION**

**Authors.** Mireia Tena-Garitaonaindia<sup>1</sup>, Diego Ceacero Heras<sup>1</sup>, Fermín Sánchez de medina<sup>2</sup>, Olga Martínez-Augustin<sup>1</sup> and Abdelali Daddaoua<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Pharmacy School, Granada University, Granada 18011, Spain.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Granada 18071, Spain.

**Abstract.** *Pseudomonas aeruginosa* is ubiquitously present in the environment and acts as opportunistic pathogen on human, animals and plants. The permanence of these infections is due to the ability of this bacterium to resist the effect of antibiotics through various system as the formation of biofilms, motility and secretion system. Prebiotics are defined as compounds that have beneficial effects on humans by altering the intestinal microbiota. The scientific and commercial interest in prebiotics, as well as their effect on human health and disease, has increased in the last decade. Several lines of evidence have shown that certain substance present in nature possesses potent antibacterial activity. Fructooligosaccharides (FOS) are hydrolysis products of the prebiotic polysaccharide inulin and Active hexose correlated compound (AHCC) is an enzyme fermented extract prepared from mycelia of a *Basidiomycete mushroom* (*Lentinula edodes*) that is available as a dietary supplement which can be considered as prebiotic. Previous studies have shown that FOS reduces growth, biofilm formation, through decrease of its ability to motility and exotoxin secretion. However, the transcriptional basis for these phenotypic alterations remains unclear. To gain insights into the detailed molecular processes triggered by FOS, the obtained results from gene pathway analysis of different exposure genes (DEG) revealed a specific FOS-mediated reduction in transcript levels of genes that participate in several canonical pathways involved in metabolism and growth, motility, biofilm formation,  $\beta$ -lactam resistance and in the modulation of type III and VI secretion system. Furthermore, AHCC was found to inhibit bacterial growth rate of strain PAO1 and a dramatic reduction of biofilm was observed in the presence of AHCC a concentration dependent manner. Opposing effects were observed for bacterial motility; while AHCC no caused change in swarming motility, it was found that inhibited the swimming and twitching motility at 15 and 30 mg/ml of AHCC. In co-cultures with eukaryotic cells AHCC reduced the secretion of inflammatory cytokines IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ .

This is the first study to show that these correlative effects of AHCC and FOS tend to reduce the levels of pathogenicity produced by *P. aeruginosa* through distinct signaling pathways and these effects offer a number of alternative prophylactic strategies.

**TITLE: EFFECT OF A *HIBISCUS SABDARIFFA* EXTRACT IN LIVER INFLAMMATION AND INTESTINAL EPITHELIAL PERMEABILITY IN OBESE MICE**

**Authors.** P. Diez-Echave<sup>1</sup>, T. Vezza<sup>1</sup>, L. Hidalgo-García<sup>1</sup>, J. Garrido-Mesa<sup>1</sup>, S. Pimentel-Moral<sup>2</sup>, A. Segura-Carretero<sup>2</sup>, M.E. Rodriguez-Cabezas<sup>1</sup>, J. Gálvez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIBER-EHD. ibs. GRANADA, CIBM, University of Granada, Granada, Spain

<sup>2</sup>Research and Development Centre for Functional Food (CIDAF), Granada, Spain

**Introduction:** Although liver disease is not fully considered as a complication of obesity, the prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in obese patients is high. Obesity has been related to intestinal dysbiosis, characterized by altered intestinal permeability that can result in endotoxemia, systemic inflammation and NAFLD. Different phenolic plant extracts have been reported to exert beneficial effects in experimental models of metabolic syndrome. In the present study a well-characterized extract from *Hibiscus sabdariffa* has been evaluated in diet-induced obesity in mice, to investigate its impact on the liver inflammatory status and intestinal epithelial function.

**Methods:** Male C57BL/6J were distributed into seven groups: control, control-treated, obese, obese Hibiscus-treated (1, 10 and 25 mg/kg/day) and obese metformin-treated (250 mg/kg/day) for 6 weeks. Control and control-treated mice were fed with normal chow diet, whereas obese mice received a high-fat diet. Animal weight and food consumption were periodically measured. At the end of the experiment, the liver inflammatory status was evaluated, as well as different markers of intestinal epithelial barrier function, by RT-qPCR.

**Results:** The administration of the *H. sabdariffa* extract resulted in a reduction of body weight gain, associated with reduced fat deposition. The extract significantly ameliorated the altered expression of key adipogenic genes in the inflamed liver from obese mice, like PPARs, the protein kinases JNK1 and JNK2, the receptor for leptin, as well as inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) and TLR4. The markers of altered intestinal permeability (MUC-3 and ZO-1) were also improved in mice treated with the extract.

**Discussion/Conclusion:** *H. sabdariffa* showed an anti-inflammatory activity in the liver of obese mice, maybe related to an improvement in the intestinal epithelial barrier function.

**TITLE: COMPUTATIONAL T-CELL RECEPTOR REPERTOIRE ANALYSIS FROM HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING DATA.**

**Authors:** Maria S. Benitez-Cantos<sup>1</sup>, Michela Verbeni<sup>1</sup>, Anais Redruello<sup>2</sup>, Angel Carazo<sup>2</sup>, Carlos Cano<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Computer Sciences and Artificial Intelligence, School of Information Technology and Telecommunications Engineering, University of Granada, 18014 Granada, Spain.

<sup>2</sup> Genomic Research Service, San Cecilio University Hospital, Biohealth Research Institute of Granada (IBS.GRANADA), 18012 Granada, Spain

**Abstract:** T-cell receptor (TCR) genomic locus undergoes a somatic recombination process during T-cell development, where the combination of V, D and J segments, along with nucleotide additions and/or deletions, creates the complementarity-determining region 3 (CDR3). This results in a set of structurally diverse immune receptors (or clonotypes) in an individual, known as TCR repertoire, which enables the recognition of a wide variety of antigens. TCR repertoire analyses benefit from high-throughput sequencing technologies, but a well-designed amplification method for this highly diverse locus is key. In this study we evaluate the performance of a novel TCR $\beta$  amplification method based on multiplex solid-phase PCR and the Ion Torrent sequencing technology. Blood, liver, visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue samples from 8 individuals were analyzed, obtaining high yield of reads even in tissue samples, where lymphocyte genetic material is scarce. After quality filter and error correction steps, 46241 distinct clonotypes were identified with a read-per-clonotype ratio of 100,66. This allowed the characterization of TCR $\beta$  repertoires in an individual, namely the number and frequency of clonotypes, V and J segment usage, CDR3 length distribution, diversity metrics and overlap among blood and tissue repertoires. We found that blood repertoires are wider and more diverse than those of tissue. Of the 65 TRBV segments, TRBV20-1 is the most frequent in 7 of the 8 blood samples analyzed. Little overlap among TCR $\beta$  repertoires of the same individual was observed, suggesting a spatial compartmentalization of lymphocyte populations. A sequencing bias was identified that we aim to reduce in future work by refining the error correction step in our analysis. TCR repertoire sequencing requires the development of robust bioinformatic pipelines for a correct interpretation of the data that allows further understanding of adaptive immunity responses by T-cells.

**TÍTULO: NUEVOS RETOS, NUEVAS OPORTUNIDADES: MICROELIMINACIÓN DE HEPATITIS C EN EL ÁREA DE MEDICINA INTERNA DE UN HOSPITAL DE ESPECIALIDADES**

**Autores.** Ana Fuentes<sup>1</sup>, Jose Luis García-Fogeda<sup>2</sup>, Adolfo de Salazar<sup>1</sup>, María Lucía Tornero<sup>2</sup>, Fernando García<sup>1</sup>, Pilar Giner<sup>2</sup>, Federico García<sup>1</sup>.

*Servicio de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio. Instituto de Investigación Ibs Granada<sup>1</sup>.*

*Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario San Cecilio.*

**Introducción:** En ausencia de un programa específico de eliminación de la hepatitis C, las iniciativas de micro-eliminación a nivel local son esenciales. En nuestro trabajo hemos establecido un programa de micro-eliminación en los pacientes atendidos en el área de Medicina Interna de nuestro hospital

**Métodos:** Durante el periodo Febrero a Mayo de 2019 hemos realizado serología de VHC a todos los pacientes que ingresaron en el área de Medicina Interna de nuestro hospital. En los anti-VHC positivos se realizó diagnóstico en un solo paso, y se derivaron a enfermedades infecciosas/digestivo para evaluación para tratamiento.

**Resultados:** Hemos analizado los datos de 441 pacientes, el 51,7% hombres, con una mediana de edad de 80 años (IQR 69-87), siendo el 52 % hombres. La distribución por rangos de edad fue: 15 pacientes <40años; 17 pacientes de 40-49; 28 pacientes entre 50-59; 52 pacientes entre 60-69 ; 105 pacientes entre 70-79; y 224 con >80 años. La seroprevalencia de hepatitis C global fue del 2,9%, y por rangos de edades del 5,8% (n=1) entre 40-49; 50-59, 7,4% (n=2); 2,9% (n=3) entre 70-79, y 3,1% en los pacientes con >= 80 años. La prevalencia de infección activa fue del 1,8% (n=13), concentrándose en los rangos de edades de 50-59 (n=1; 3,6%), 70-79 (n=2; 1,9%), y sobretodo en los pacientes con >= 80 años (n=5; 2,2%). Por sexo, la seroprevalencia en hombres fue del 2,2% y en mujeres del 3,7%.

De los 13 pacientes con antiVHC positivo, 8 eran virémicos y sólo 4 fueron nuevos diagnósticos; 4 pacientes no han sido candidatos para tratamiento (por ser pacientes pluripatológicos, con demencia y dependientes para actividades de vida cotidiana), 2 han iniciado tratamiento con Maviret, y los 2 restantes están pendientes de revisión. De los 5 pacientes que aclararon el ARN, en 2 de ellos se había hecho tratamiento previo.

**Conclusiones:** El acceso al hospital es una buena oportunidad para el diagnóstico de la infección activa por VHC. Las estrategias de cribado deberían considerar el ingreso de pacientes en los hospitales para conseguir la microeliminación. En nuestra serie, la infección por VHC es muy prevalente en población con más de 80 años.

**TÍTULO: DIAGNÓSTICO DESCENTRALIZADO INTEGRADO DE LA HEPATITIS C**

**Autores.** Ana Fuentes<sup>1</sup>, Adolfo de Salazar<sup>1</sup>, Fernando Garcia<sup>1</sup>, Esther Serrano-Conde<sup>1</sup>, Manuel Ruiz<sup>2</sup>, Manuel Ruiz-Maldonado<sup>2</sup>, Jorge Valencia<sup>3</sup>, Jesus Troya<sup>4</sup>, Guillermo Cuevas<sup>4</sup>, Pablo Ryan<sup>4</sup>, Federico García<sup>1</sup>.

*Servicio de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio. Instituto de Investigación ibs Granada<sup>1</sup>.*

*Servicio Provincial de Drogodependencia, Granada<sup>2</sup>*

*Unidad Movil de reducción de daños del SERMAS<sup>3</sup>*

*Servicio de Medicina interna. Hospital Universitario Infanta Leonor. Madrid<sup>4</sup>.*

**Introducción y objetivo:** Los principales reservorios de la hepatitis C en España son poblaciones de difícil acceso al sistema sanitario, en los que los circuitos asistenciales son extremadamente complicados y requieren numerosas visitas. Para conseguir la eliminación de la hepatitis C se necesita acceder a estos pacientes y mejorar los circuitos de diagnóstico. En nuestro trabajo hemos pilotado el uso de Dried Blood Spots (DBS) en la población que acude a centros de adicciones, comedores sociales y casas de acogida.

**Material y métodos:** Nuestro estudio se ha llevado a cabo en dos fases. En primer lugar, hemos evaluado la correlación de nuestra metodología en DBS para la detección de anticuerpos anti-VHC (Architect, Abbott) y de carga viral de VHC (Cobas 6800, Roche). En segundo lugar, hemos analizado muestras de pacientes que atienden regularmente el Centro de Atención de Adicciones (CTA) de la zona norte de Granada COIS Norte y pacientes que atienden la ONG Calor Café de Granada. Los DBS eran enviados directamente a nuestro laboratorio, y los resultados se remitían también directamente a los médicos responsables. Además del número de nuevos diagnósticos, hemos cuantificado el número de pacientes que no han acudido a través del circuito convencional de atención primaria.

**Resultados:** Para la fase de validación analizamos DBS de 27 pacientes seropositivos. Encontramos una correlación del 96,3% para la detección de anticuerpos y del 100% para la detección de viremia. En términos cuantitativos, los valores de viremia fueron significativamente inferiores en DBS que en plasma (Carga viral: 78069 vs 723103. Log carga viral: 4,89 vs 5,85). En la fase de análisis hemos recogido DBS de 97 pacientes. 84 pertenecientes a pacientes de CPD y 13 de comedores sociales y casas de acogida. En todos se ha realizado detección de anti-VHC y de viremia.

La prevalencia de anti-VHC en los pacientes de CPD ha sido del 18% y la de viremia del 15%. El 43% han acudido a atención primaria para completar el circuito asistencial habitual. Solo 6 pacientes (33,3%) han sido derivados a Atención Especializada, todos ellos han acudido a la cita y 5 han iniciado tratamiento (3 pacientes con Maviret y 2 con Epclusa). La prevalencia de anti-VHC y de infección activa por VHC en los pacientes de la ONG ha sido del 4%

**Conclusiones:** El diagnóstico de infección por virus de la hepatitis C en DBS permite identificar pacientes con infección activa. Aunque cuantitativamente los valores de viremia han sido inferiores en DBS, y la sensibilidad es inferior que en plasma, esta metodología permite diagnosticar pacientes que por sus características no acuden a centros de atención primaria. Se necesitan medidas adicionales para avanzar en la microeliminación.

**TÍTULO: ALERTAS COMPARTIDAS: UN PASO MÁS PARA ASEGURAR EL ÉXITO DEL DX1P DE LA HEPATITIS C.**

**Autores.** Ana Fuentes 1,2, Adolfo de Salazar1,2, Fernando García1,2, Elena Ruiz-Escalano3, Francisca Luz Sousa3, Federico García1,2.

*1Unidad de Gestión de Microbiología Clínica. Hospital Universitario San Cecilio. Granada*

*2Instituto de investigación Biosanitaria ibs.GRANADA.*

*3Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo. Hospital Universitario San Cecilio. Granada.*

**Introducción:** Aunque en atención primaria el número de pacientes que quedan por diagnosticar sea cada vez menor, para conseguir la micro-eliminación de la hepatitis C hacen falta estrategias innovadoras y de adaptación local. En nuestro estudio hemos iniciado una estrategia de comunicación de resultados y de citación directa de los pacientes desde atención hospitalizada.

**Material y métodos:** Estudio piloto, prospectivo, en el que los pacientes diagnosticados de infección activa de hepatitis C mediante diagnóstico en un solo paso en el Servicio de Microbiología en el periodo Enero-Septiembre de 2019, son citados directamente desde atención hospitalizada para valoración de tratamiento. Se analiza la tasa de derivación, el tiempo desde el diagnóstico hasta la primera visita, el nº de pacientes que han iniciado tratamiento, y el tiempo hasta el inicio de tratamiento.

**Resultados:** En el periodo de estudio se han diagnosticado en nuestro centro, 33 nuevos diagnósticos de infección activa por VHC remitidos desde atención primaria. La mediana de edad de los pacientes fue de 59 años, el 67% eran hombres, las medianas de Ag core fueron de 3184 fmol/L [1112,04-6154,41], la distribución por genotipos fue 21,2% 1A, 42,4% 1B, 9,1% 2, 6,1% 3, 9,1% 3A sin resistencias asociadas a NS3 NS5a y 12,1% sin genotipo (uno de ellos debido a que la carga viral era muy baja) la mediana del grado de fibrosis fue de 8,3 kpa. El 94% de los pacientes citados con fecha de Septiembre acudieron. De estos, se valoró iniciar tratamiento en 81,5% (11% (3 ptes) se decidió no actuar por tratarse de personas mayores pluripatológicas y dependientes para la realización de actividades de la vida cotidiana, 7,5% (2Pte) no se trató porque es necesario que previamente abandone el consumo de alcohol. El tiempo desde el diagnóstico hasta la primera visita fue de 13 días [7,5-19 días] antes del periodo de verano y de 25,5 días con fecha hasta Septiembre [20,5-37,25 días]. Los pacientes iniciaron tratamiento el mismo día de la 1era visita, con Sofosbuvir/Velpatasvir 12 semanas (n=6), o Glecaprevir/Pibrentasvir 8/12 semanas (n=15).

**Conclusiones:** En nuestro estudio piloto, la estrategia de citación de los pacientes directamente desde Atención Hospitalaria ha resultado en una elevada tasa de inicio de tratamiento.

**TITLE: SYNTHESIS OF REAGENTS FOR CHEMNAT TECHNOLOGY**

**Authors:** Francisco Javier López-Delgado<sup>1,3</sup>, Juan José Guardia-Monteaguado<sup>1</sup>, Rosario María Sánchez-Martín<sup>2,3</sup> and Juan José Díaz-Mochón<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> DestiNA Genomica S.L., Parque Tecnológico Ciencias de la Salud (PTS), Av. de la Innovación 1, Edificio BIC, 18100, Armilla, Granada, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071, Granada, Spain

<sup>3</sup> Genyo. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer/ University of Granada/ Andalusian Regional Government, Av. de la Ilustración, 114, 18016, Granada, Spain.

**Abstract:** Nucleic Acid Testing are technologies used to detect nucleic acids and their variants for diagnosis. Among the molecular technologies commonly used for nucleic acid testing (NAT), the DNA analysis by dynamic chemistry is one of the most recent and promising technologies. In this context, we have developed ChemNAT technology for the detection of nucleic acids and their point mutations based on the use of dynamic chemistry. The high reliability of this technology is based on the selective hybridization harnesses Watson-Crick base pairing to template a dynamic reaction between on a strand of DGL probes (sequences of PNA in which a secondary amine is incorporated instead of a nucleotide) and the target nucleic acid that creates a chemical pocket that allows the reaction of dynamic chemistry, and the selective incorporation of a SMART nucleobase (aldehyde-modified nucleobase). Then the reading base is a thermodynamic process controlled by the selection of the nucleic acid opposite the chemical pocket that avoids the incorporation of an erroneous base.

ChemNAT technology offers the possibility of synthesizing DGL probes and SMARTs nucleobases, à la carte, marked as necessary to be able to read the result on the selected platform. The aim of this communication is to introduce the chemical strategies designed for the synthesis of: (i) the SMARTs bases, specifically SMART-C labelled with biotin, and (ii) the DGL probes, going from the synthesis of the building blocks to the use of these building blocks for the synthesis of DGL probes applying solid phase synthesis protocols.

**TÍTULO: LA CALPROTECTINA REGULA LA DIFERENCIACIÓN DE ORGANOIDES DE EPITELIO INTESTINAL DERATÓN. IMPLICACIÓN DEL METABOLISMO DEL ZINC**

**Autores.** Gámez-Belmonte R<sup>1</sup>, González-Pérez R<sup>1,2</sup>, Chazin W<sup>3</sup>, Sánchez de Medina F<sup>1,2,4</sup>, Martínez-Augustin O<sup>2,4,5,6</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología. Universidad de Granada

<sup>2</sup>CIBERehd

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Chemistry, Center for Structural Biology, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA.

<sup>4</sup>Ibs. Granada

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 2. Universidad de Granada

<sup>6</sup>Instituto de nutrición y tecnología de los Alimentos José Mataix. Universidad de Granada

**Resumen:** La calprotectina (CP) es un heterodímero compuesto por dos proteínas S100A8 y S100A9, producido macrófagos y neutrófilos, que se utiliza ampliamente como marcador de inflamación intestinal. Además, está presente en leche materna. El papel de la CP el intestino no está bien definido. Estudios de nuestro grupo de investigación han observado que puede tener un efecto beneficioso en la colitis experimental. Además, diversos estudios indican una función antibacteriana mediante la unión de Zn, haciéndolo menos disponible para las bacterias. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el papel de la CP sobre la expresión génica del epitelio intestinal. Con tal fin, se sobreexpresaron y purificaron las subunidades nativas de CP, S100A8 y S100A9, en células roseta Escherichia. coli BL21, además de CP mutada en su sitio de unión a Zn, para la misma. La CP nativa y mutada se adicionó al medio de cultivo de organoides de yeyuno de ratón. Se obtuvieron muestras de RNA que fueron analizadas mediante RNAseq y RT-PCR. El estudio de los datos de RNAseq y los posteriores RT-PCRs indicaron que la CP nativa alteró la expresión de genes relacionados con el transporte y el almacenamiento de Zn, incrementando el transportador de Zn al interior del enterocito (Slc39a4) e inhibiendo tanto las proteínas almacenadoras de Zn (Mt1 y Mt2) como el transportador de Zn desde el enterocito al torrente circulatorio (Slc30a2). La unión a Zn de la calprotectina inhibió la expresión de genes marcadores de células de Paneth (defensinas y fosfolipasas a2g), mientras que indujo los de células caliciformes (mucinas), indicando un papel importante de la calprotectina. Cuando se utilizó la CP mutada en su lugar de unión a Zn, se revirtieron los efectos observados. Por otra parte, la CP también ejerció efectos independientes del secuestro de Zn ya que el incremento de la expresión de glucosa-6-fosfatasa (G6pc) no se mantuvo cuando se estimularon los organoides con CP mutada. En conclusión, nuestros resultados muestran que la calprotectina puede tener efectos sobre la maduración de células de intestino induciendo la diferenciación hacia de células caliciformes e inhibiendo la de células de Paneth. Estos efectos son dependientes de su capacidad de unión a Zinc. Efectos independientes de su unión a Zn han sido también observados en este estudio.

**TITLE: THE IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF THE PROBIOTIC *LACTOBACILLUS REUTERI* INIA P572 CONTRIBUTE TO ITS INTESTINAL ANTIINFLAMMATORY EFFECTS IN DSS-COLITIS IN MICE**

**Authors:** Molina-Tijeras JA<sup>1</sup>, Diez-Echave P<sup>1</sup>, Garrido-Mesa J<sup>1</sup>, Vezza T<sup>1</sup>, Rodríguez-Nogales A<sup>1</sup>, Algieri F<sup>1</sup>, Utrilla MP<sup>1</sup>, Rodríguez E<sup>2</sup>, Langa S<sup>2</sup>, Arques JL<sup>2</sup>, Rodríguez-Cabezas ME<sup>1</sup>, Gálvez J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, CIBER-EHD, ibs.GRANADA, CIBM, University of Granada, Granada, Spain.

<sup>2</sup>Department of Food Technology, INIA, Madrid, Spain.

**Introduction:** Several studies have proposed that probiotics can be considered a safe treatment for Inflammatory Bowel Disease (IBD). Different mechanisms have been reported to be involved, including their immunomodulatory properties. The aim of the study was to evaluate the effect of *Lactobacillus reuteri* INIA P572 in the DSS model of mice colitis, exploring its ability to modulate the immune response.

**Methods:** Male C57BL/6 were induced colitis by dissolving 3% DSS in the drinking water for 5 days. Treatment with *L. reuteri* INIA P572 ( $5 \times 10^8$  CFU/mice/day) started 14 days before colitis induction and continued until the sacrifice of the mice 24 days later. Non-colitic and non-treated colitic groups were included as reference. Inflammatory status evolution was daily evaluated by a disease activity index (DAI). At the end point of the experiment, the expression of inflammatory markers in the colon was analyzed by qPCR, and the leukocyte populations from colonic lamina propria were studied by multiparametric flow-cytometry.

**Results:** The administration of *L. reuteri* INIA P572 showed an intestinal antiinflammatory activity as there was a significant reduction in DAI values. Immunomodulatory effects were also evidenced by the ameliorated expression of inflammatory markers, such as IL-6, MCP-1, I-CAM, iNOS and MMP-9. When immune cell infiltration in colonic lamina propria was evaluated, the probiotic-treated group showed decreased leukocyte recruitment, with reduced numbers of neutrophils, macrophages and CD4<sup>+</sup> T cells.

**Discussion/Conclusion:** *L. reuteri* INIA P572 showed intestinal anti-inflammatory effect in the DSS model of mouse colitis. The immunomodulatory activity exerted by this probiotic encourages performing further studies to evaluate its therapeutic potential for the management of human IBD.

**TÍTULO: LA DELECIÓN GÉNICA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES NR3C1 PRODUCE UN FENOTIPO PROINFLAMATORIO EN ORGANOIDES INTESTINALES MURINOS**

**Autores:** María Arredondo<sup>a</sup>, Carlos J. Aranda<sup>b</sup>, Olga Martínez Augustin<sup>b</sup>, Fermín Sánchez de Medina<sup>a</sup>

*Departamento de <sup>a</sup>Farmacología y Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular 2, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Facultad de Farmacia, Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA. Universidad de Granada*

**Resumen:** Los glucocorticoides (GC) ejercen acciones tanto beneficiosas como perjudiciales en el intestino. Estas acciones abarcan no sólo las derivadas de los GC endógenos de origen adrenal, sino también las de los GC sintetizados localmente y, por supuesto, las de los GC exógenos. Los GC se utilizan comúnmente como fármacos antiinflamatorios e inmunomoduladores en el manejo de las exacerbaciones de la enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo, existe una proporción sustancial de pacientes que presentan fracaso primario o secundario. Es posible que las limitaciones de los GC en este contexto se deban a sus efectos perjudiciales sobre el epitelio intestinal. Con el fin de explorar esta hipótesis nuestro grupo generó una línea de ratones con delección genética inducible del receptor de GC, NR3C1, en el epitelio intestinal (ratones NR3C1<sup>ΔIEC</sup>). Se generaron organoides de yeyuno de ratones NR3C1<sup>ΔIEC</sup> y WT y se estudió la respuesta proinflamatoria in vitro. La delección génica fue inducida in vitro con tamoxifeno (al cual fueron expuestos también los organoides WT), y fue prácticamente total según el análisis por RT-qPCR. La estimulación de los organoides con TNF (10 ng/mL) en presencia de suero bovino fetal (FBS, 5% v/v) dio lugar a un incremento marcado en la expresión de las citoquinas Cxcl1 y Ccl2 en los organoides NR3C1<sup>ΔIEC</sup>, frente a una respuesta mucho más modesta en los WT. La adición de LPS (1 µg/mL) + FBS + TNF dio lugar a la inducción de la expresión de los péptidos antimicrobianos defensina alfa 1 y Reg3γ, así como del Tff3, pero en este caso la respuesta se observó únicamente en los organoides WT. La ausencia del receptor de GC se vio asociada a una mayor de expresión de genes relacionados con proliferación celular, como Myc o ciclina D1. Se observó asimismo una mayor concentración de corticosterona en el medio de cultivo de organoides NR3C1<sup>ΔIEC</sup>. En definitiva, la ausencia del receptor de GC se traduce en un fenotipo epitelial proinflamatorio, pero con menor expresión de péptidos antimicrobianos. La mayor concentración de corticosterona en organoides NR3C1<sup>ΔIEC</sup> sugiere un mecanismo de retroalimentación negativa de la producción de GC endógenos.

**TITLE: DETECTION OF NUCLEIC ACID WITH DGL BASED ON THE SERINE AMINO ACID**

**Authors.** Juan J. Guardia Monteagudo<sup>1</sup>, Francisco J. López Delgado<sup>1</sup>, Juan J. Díaz Mochón<sup>1,2,3</sup>

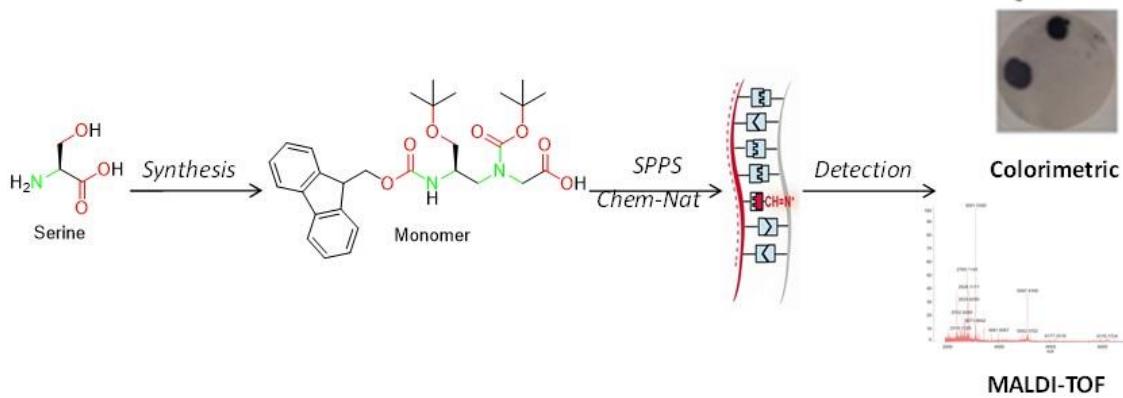
<sup>1</sup>DestiNA Genómica S.L., PTS, Avenida Innovación 1, Edificio BIC 18016, Granada

<sup>2</sup>Centro GENYO, PTS, Avenida Ilustración 114, 18016, Granada

<sup>3</sup>Departamento Químico Orgánica y Farmacéutica, Campus Cartuja s/n, 18001, Granada

**Abstract.** All organisms have nucleic acid. These control the synthesis of their proteins, providing the information that determines their specificity and biological characteristics, since they contain the necessary instructions to carry out the vital processes and are responsible for all the basic functions in the organism, as well as the hereditary transmission. Depending on the chemical nature of their monomers, they can be classified as DNA or RNA<sup>1a</sup>. DNA is present in tumor cells and analysis of its mutations can help better diagnosis and treatment<sup>1b</sup>.

The detection of the target nucleic acid, DNA in our case, is performed with a PNA (*Peptide Nucleic Acid*), that has the complementary sequence, this molecule is DGL. The characteristics of the PNA make them the best synthetic mimetics of oligonucleotides<sup>2</sup>. The probe has a position without the nitrogenous base, abasic position, forming a *chemical pocket* where the Dynamic Chemistry Reaction on which Chem-NAT technology is based will take place<sup>3</sup>.



To improve the properties of PNAs, we present the synthesis of a new DGL in which the abasic position is based on a new monomer with a N-(2-aminoethyl) serine structure, as well as its incorporation into the DGL probe by synthesis in solid phase (SPPS) and its validation by detection of the target DNA using colorimetric platform and MALDI-ToF.

## References

- 1) a) C. K. Mathews, K. E. van Holde, D. R. Appling, S. J. Anthony-Cahill, *Biochemistry*, **2013**, 4<sup>ed</sup> Pearson. b) E. Crowley, F. Di Nicolantonio, F. Loupakis, A. Bardelli. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, 10, 472.

- 2) a) P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt. *Science*, **1991**, 254, 1497. b) M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, S. Freire, S. Kim, R. Berg, D. Driver, B. Norden, P. Nielsen. *Nature*, **1993**, 365, 566. c) P. Nielsen, *Peptide Nucleic Acid*, **2002**, 1<sup>ed</sup> *Humana Press*.
- 3) F. Bowler, J. Díaz-Mochón, M. D. Swift, M. Bradley. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1809-1812. b) Diaz-Mochon, J.; Bradley, M., **2008**, WO Patent WO2009/037473.

**TITLE: CHARACTERIZATION OF EXOSOMES AND THEIR PROGENITOR CELLS BY CYTOMETRY AND QUANTITATIVE PCR**

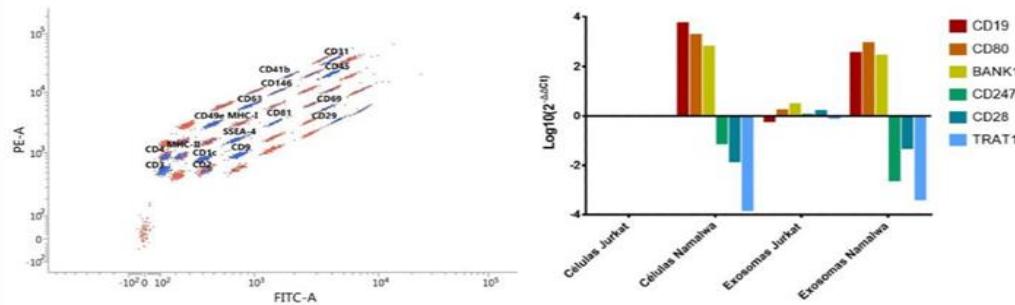
**Authors:** Díaz-Cuéllar, J.<sup>1</sup>; Molina-Castro, Y.<sup>1</sup>; Álvarez-Cubero, M.J.<sup>1,2</sup>; Martínez, L.J.<sup>1</sup>; Santiago, O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GENYO. Centro Pfizer – Universidad de Granada – Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica; jose.diaz@genyo.es ; olivia.santiago@genyo.es

*2 Department of Biochemistry and Molecular Biology III and Immunology, University of Granada;*

**Abstract:** Exosomes are a type of extracellular vesicles (EVs) produced by most eukaryotic cells present in a large percentage of biofluids having a key role in intercellular communication; both in physiological and pathological conditions. This is mainly due to its ability to transport proteins, lipids, nucleic acids and other biomolecules that can affect the function and destiny of its receptor cells. This biomolecule profile is usually specific and is related to the pathophysiological state of the progenitor cell, in addition, they are involved in different processes of immune development. Consequently, they have great potential as a prognostic and diagnosis biomarker of a large number of diseases. Despite this, the exosomes present great limitations, mainly due to their small size (50-100 nm), so there is no uniform agreement as to the most appropriate techniques for their analysis.

The goal of this study is mainly the development of an isolation methodology based on ultracentrifugations in two lymphoblastic cell lines (Namalwa and Jurkat). As well as a methodology of comparative characterization using both conventional and imaging flow cytometry techniques; as expression analysis (qPCR). On the one hand, we can confirm that exosomes isolation by ultracentrifugation allows us to obtain these nanovesicles in a efficient and standardized way. Moreover, on the other hand, flow cytometry has allowed us to characterize specific markers of exosomes (CD9, CD63 and CD81) apart from markers of the progenitor cell in both cell types (Fig. 1A). Finally, using qPCR, mRNA expression of CD19, CD80, BANK1, CD247, CD28 and TRAT1 genes has been described along with the endogenous MTR gene (Fig. 1B)



A

B

**Figure 1: Characterization of A) surface markers by flow cytometry and B) mRNA expression levels by qPCR**

Following the results of our study we have been able to verify how ultracentrifugation is a viable and effective method for the isolation of exosomes, without producing changes in its content. The results obtained through our study validate that there is a high correlation between the active markers in the progenitor cells with those expressed in their exosomes. The content of the Namalwa and Jurkat exosomes partly represent the genetic content of their progenitor cells and they express on their surface markers related to metastatic processes in which they are involved, which allows to characterize exosomes of each line differentially. Thanks to the combination of both techniques we can characterize the origin of the isolated exosomes, analyzing the expression profile of markers in the surface or the expression of their genes.

**TITLE: EFFECT OF A *MORUS ALBA* LEAF EXTRACT IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF OBESITY: IMPACT ON LIVER STEATOSIS AND INFLAMMATION.**

**Authors:** Ruiz-Malagón AJ<sup>1</sup>, Molina-Tijeras JA<sup>1</sup>, Diez-Echave P<sup>1</sup>, Hidalgo-García L<sup>1</sup>, Vezza T<sup>1</sup>, Rodríguez-Sojo MJ<sup>1</sup>, Rodríguez-Cabezas ME<sup>1</sup>, Lozano-Pérez A<sup>2</sup>, Cenis JL<sup>2</sup>, Gálvez J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*CIBER-EHD. ibs.GRANADA, CIBM, Universidad de Granada, Granada, España.*

<sup>2</sup>*Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), Murcia, España.*

**Abstract:** In obesity there is a chronic low-grade inflammation caused by an increase in intestinal permeability and serum lipopolysaccharide levels. It leads to activation of Kupffer cells and hepatic TLR-4 causing inflammation and non-alcoholic fatty liver disease. Phenolic compounds present in fruit and vegetables have been shown to ameliorate the subclinical inflammatory status in obesity. The aim of this study was to evaluate the effect of a polyphenolic extract from *Morus alba* leaves in an experimental model of obesity, focusing on changes in intestinal permeability and liver disorders. Male C57BL/6 mice were divided in groups (n=10): control, obese and obese daily treated with the mulberry leaf extract (10 mg/kg, p.o.). Control mice were fed with a standard diet, whereas obese mice received a high-fat diet. The treatment was followed for 6 weeks, and animal body weight and food intake were controlled regularly. After sacrifice, liver samples were taken for histological evaluation and to assess the expression of pro-inflammatory mediators. Moreover, the expression of markers of intestinal epithelial barrier were analyzed. Obese mice treated with the extract showed a decrease in weight gain in comparison with untreated obese mice. The expression of hepatic cytokines, such as IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, and TLR-4 was downregulated by the treatment. The loss of intestinal barrier integrity was reversed by the treatment, which elevated the expression of MUC-3. In addition, treated mice showed less lipid accumulation in the liver, assessed in the histological sections, than the non-treated obese mice. The mulberry leaf extract exerted beneficial effects against obesity by ameliorating the liver inflammation and fat accumulation. These effects were associated with an improvement of the intestinal barrier function and a downregulation of liver inflammation. Therefore, the mulberry extract could be developed for ameliorating liver-associated damage in obesity.

**TÍTULO: EFECTO INMUNOMODULADOR DEL PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS PARACASEI* INIA P272 EN COLITIS INDUCIDA POR DSS: IMPACTO SOBRE POBLACIONES DE CÉLULAS INMUNE.**

**Autores:** Rodríguez Sojo MJ<sup>1</sup>, Diez-Echave P<sup>1</sup>, Garrido-Mesa J<sup>1</sup>, Vezza T<sup>1</sup>, Rodríguez-Nogales A<sup>1</sup>, Algieri F<sup>1</sup>, Utrilla MP<sup>1</sup>, Rodríguez E<sup>2</sup>, Langa S<sup>2</sup>, Arques JL<sup>2</sup>, Rodríguez-Cabezas ME<sup>1</sup>, Gálvez J<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, CIBER-EHD, ibs. Granada, CIBM, Universidad de Granada, Granada, España.

<sup>2</sup>Departamento de Tecnología de los alimentos, INIA, Madrid, España.

**Introducción:** Los probióticos pueden ejercer efectos beneficiosos en la enfermedad inflamatoria intestinal a través de diferentes mecanismos, incluyendo propiedades inmunomoduladoras. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del probiótico *Lactobacillus paracasei* INIA P272 en el modelo de colitis inducida por DSS en ratón, explorando su impacto en células inmunitarias con actividad sobre el intestino.

**Métodos:** Ratones machos C57BL/6 fueron tratados con *L. paracasei* INIA P272 ( $5 \times 10^8$  UFC/ratón·día) durante 23 días. En el día 14 fue inducida la colitis mediante la administración de DSS (3% disuelto en agua durante 5 días); un grupo colítico no tratados y otro no colítico fueron utilizados como controles. El progresode la inflamación intestinal fue evaluado diariamente mediante el índice de actividad de la enfermedad (DAI). En el día 24, los ratones fueron sacrificados y el estado inflamatorio intestinal fue evaluado. Los marcadores de inflamación del tejido fueron evaluado mediante RT-qPCR, y las poblaciones de leucocitos procedentes de la lámina propia fue analizada mediante citometría de flujo.

**Resultados:** El tratamiento con *L. paracasei* INIA P272 produce actividad antiinflamatoria, como se evidencia en el curso del experimento por unos valores reducidos de DAI. Los efectos inmunomoduladores fueron también evidenciados con la mejora de la expresión de citoquinas y quimiocinas inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 y I-CAM y las enzimas iNOS y MMP-9, involucradas en la respuesta inflamatoria y la remodelación del tejido inflamado. La evaluación de la infiltración de células inmunes en la lámina propia reveló que el grupo tratado con el probiótico mostró una reducción en el número de neutrófilos, mientras que la producción de IL-10 FoxP3+ Tregs fue alta.

**Discusión/Conclusión:** *L. paracasei* INIA P272 presentó efectos antiinflamatorios intestinales, observándose a una menor susceptibilidad a la colitis inducida por DSS. Estos efectos se pueden deber a la actividad inmunomoduladora atribuida al probiótico, lo que podría ser de gran interés para el desarrollo de futuros tratamientos de IBD con probióticos.

**TÍTULO: CORTISOL EN CABELLO: PREDICTOR DE DEPRESIÓN POSPARTO Y BIOMARCADOR DE ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO-ADRENAL.**

**Autores.** González-Pérez R. Departamento de Farmacología, CIBERehd, Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España. [raquel.gonzalez@ciberehd.org](mailto:raquel.gonzalez@ciberehd.org)

**Introducción:** En la práctica clínica la actividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal se evalúa frecuentemente mediante el análisis de los niveles de cortisol en fluidos corporales como la saliva, la sangre y la orina. Sin embargo, estos niveles varían con el ritmo circadiano, estrés agudo y secreción pulsátil, representando solo un momento concreto o una exposición a cortisol a corto plazo. El análisis de cortisol en pelo es una técnica que permite medir el cortisol acumulado de forma retrospectiva desde meses hasta años. Asumiendo una tasa de crecimiento promedio de 1 cm/mes, un segmento de pelo de 3 cm contiene el cortisol que se ha depositado durante aproximadamente los últimos 3 meses.

**Objetivos:** El principal objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto del método para la determinación del cortisol en cabello con el fin de validar su utilidad clínica como predictor de depresión postparto y biomarcador de activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal en pacientes autoinmunes. Estos trabajos son fruto de la colaboración con el grupo de investigación Pnísula (CTS-581).

**Resultados:** Análisis de cortisol en pelo como predictor de depresión postparto. La depresión postparto afecta a un gran número de mujeres con consecuencias perjudiciales. La falta de evidencia de predictores de naturaleza biológica nos ha llevado a plantear el objetivo de este estudio: analizar variables sociodemográficas, obstétricas y psicológicas junto a los niveles de cortisol en el pelo durante embarazo y postparto en mujeres con o sin síntomas de depresión postparto. Los resultados muestran diferencias significativas entre los grupos en los niveles de cortisol en pelo en el primer y tercer trimestre de embarazo, y como los niveles de cortisol en pelo pueden predecir el 21.7% de la varianza de los síntomas de depresión posparto. Análisis de cortisol en pelo para evaluar la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal en pacientes autoinmunes. Numerosos estudios demuestran que pacientes con enfermedades autoinmunes presentan hipoactividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, sin embargo, los resultados descritos son controvertidos. El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la actividad del eje HPA en mujeres con enfermedad autoinmune en comparación con mujeres sanas analizando los niveles de cortisol en saliva a lo largo del día y el cortisol en pelo de los tres meses anteriores. Los resultados demuestran que el área bajo la curva de los niveles de cortisol durante el día es mayor para pacientes con enfermedad autoinmune y que estas presentan niveles más altos de cortisol en pelo, y por tanto, una mayor actividad del eje HPA a corto y largo plazo.

**TITLE: DESIGN OF NANOSYSTEMS CONJUGATED WITH ANTIBODY FRAGMENTS TO TREAT THE NEUROLOGICAL STAGE OF AFRICAN TRYPANOSOMIASIS**

**Authors.** Matilde Ortiz-González<sup>(1,2,3)</sup>, Guadalupe García-Medina<sup>(1,2)</sup>, Miguel Soriano<sup>(1,3)</sup>, Andrej Covac<sup>(4)</sup>, José A. García-Salcedo<sup>(1,2)</sup>.

(1)Pfizer-University of Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), Granada, Spain

(2)Infectious Diseases Unit. Biosanitary Research Institute ibs.GRANADA, University Hospitals of Granada / University of Granada, Granada, Spain

(3) Center for Intensive Mediterranean Agrosystems and Agri-food Biotechnology (CIAIMBITAL). University of Almeria, Almeria, Spain.

(4) Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava . Slovakia

**Abstract:** Sleeping sickness, or African trypanosomiasis, is a serious health problem with an added socio-economic impact in sub-Saharan Africa, due to direct infection in both humans and their domestic livestock. There is no vaccine available against African trypanosomes and the main reason is the ability of the parasite to change the major surface glycoprotein (VSG) avoiding antibody-mediated responses. The current drugs used to treat African trypanosomiasis are effective, but all of them have limitations, ranging from problems with poor efficacy and acute toxicity to drug resistance. Clearly, novel, safe, and affordable treatments are needed.

Searching for new strategies to treat African trypanosomiasis we developed a drug delivery system to treat the acute phase of the disease: a drug transporter consisting in polymeric nanoparticles conjugated with a single-domain antibody derived from camel heavy-chain antibodies (termed nanobody NbAn33)<sup>1-2</sup>, that specifically recognizes conserved cryptic epitopes on the parasite surface<sup>3</sup>. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that the nanodevice reduced the curative dose of pentamidine about 100 fold, and most significantly, overcome drug resistance as a result of mutations in the surface transporter that mediate drug uptake.

However, the effectiveness of this nanocarrier in the encephalitic stage of the disease has not been evaluated. Transcytosis is the process by which the epithelial cells of the blood-brain barrier transport macromolecules across the interior of a cell and expel them on the other side. Thus, transcytosis provides the means for brain delivery of drugs across the blood-brain barrier. Receptors of transferring and LDL represent the majority of the receptors present in endothelial cell of the blood-brain barrier. In this sense, we have modified NbAn33 fusing a peptide corresponding to the ligand of LDL receptor to the amino terminal end of the nanobody. Our results showed an increase in the penetrance through the BHE of the modified Nb33\_LDL in comparison with the Nb33 alone.

**References**

1. Arias, J.L., et al. Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis. *J Control Release* **197**, 190-198 (2015).

2. Unciti-Broceta, J.D., *et al.* Specific Cell Targeting Therapy Bypasses Drug Resistance Mechanisms in African Trypanosomiasis. *PLoS Pathog* **11**, e1004942 (2015).
3. Stijlemans, B., *et al.* Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem* **279**, 1256-1261 (2004).

**TITULO: BROTE DE TOXINFECCIÓN ALIMENTARIA POR NOROVIRUS GII  
POSIBLEMENTE RELACIONADO CON ESTABLECIMIENTO ALIMENTARIO**

**Autores.** Almagro López D, Cárdenas Fernández D, Almagro López C, Orts Laza MA, Almagro Nievas D.

*Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Hospital Universitario Clínico, Distrito Granada Metropolitano*

**Resumen:**

**Antecedentes:** El domingo 16 de junio de 2019, a las 20h llama el centro coordinador de EPES para comunicar la sospecha de una TIA comunitaria, informada por una médico de guardia del Hospital materno infantil de Granada. Se trata de una familia de dos hermanos enfermos y que lo relacionaron con una comunidad de vecinos. Se establecieron tres hipótesis de un brote de TIAs en una comida de comunidad de vecinos, bar en un municipio o restaurante chino y de posible etiología viral.

**Objetivo:** Describir el brote de TIA alimentaria dado en una familia cinco miembros de los que han enfermedad tres al mismo tiempo e identificar el posible origen del brote y factores contribuyentes al mismo.

**Diseño y emplazamiento:** estudio de transversal en el ámbito familiar y con alguna comida realizada en un establecimiento público.

**Población:** Total de miembros de la familia son cinco.

**Intervenciones:** Se investigó la relación entre la enfermedad y distintas variables independientes: características personales, de lugar y tiempo. Se elaboró una encuesta epidemiológica con las variables descritas y se pasaron on line con el programa Drive de Google. Se realizó un estudio descriptivo transversal. Se realizó coprocultivo a los pacientes en el hospital. Se realizó inspección del establecimiento más sospechoso y estudio de manipuladores.

**Resultados:** El número de encuestas realizadas fueron 5 y el número de afectados fue de 3 (60%). Los síntomas más importantes fueron diarrea y vómitos. La evolución de los enfermos fue hacia la curación en 48 horas. La curva epidémica refleja un comienzo y final de exposición común. El establecimiento investigado reflejó malas condiciones higiénicas que se subsanaron. El estudio de 2 manipuladores de los 3 presentes fueron negativos. La muestras de heces de enfermos que se tomó fueron positivas para Norovirus genogrupo II.

**Conclusiones:** Desde el punto de vista epidemiológico, clínica, evolución de los enfermos, curva epidémica y determinación antigenica de virus en heces indican que se trata de una toxinfección alimentaria con desconocimiento de posible alimento vehículo de la enfermedad y de etiología confirmada por Norovirus genogrupo II.

**TÍTULO: INFLAMASOMAS COMO BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS DE SEVERIDAD EN EL PROCESO INFLAMATORIO DE LA ENFERMEDAD PERIIMPLANTARIA**

**Autores.** Montalvo-acosta S.<sup>1-3</sup>; Martin-Morales N<sup>2-3</sup> Galindo-Moreno P<sup>1-3</sup>; Padial-Molina M<sup>1-3</sup>; O'Valle F<sup>2-3-4</sup>.

<sup>1</sup> Dpto. cirugía oral y estomatología Facultad de odontología. Universidad de Granada

<sup>2</sup> Dpto. Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Granada

<sup>3</sup> Centro de investigación biomédica CIBM.

<sup>4</sup> Instituto Biosanitario (ibis.GRANADA)

**Resumen.** La periimplantitis es definida como una condición patológica asociada a placa bacteriana que ocurre en los tejidos blandos alrededor del implante. Clínicamente se observan los signos típicos de la inflamación y radiográficamente hay pérdida progresiva del hueso. Los Inflamasomas son un complejo multiproteico que forman parte del sistema inmunitario innato, su función es la activación de la caspasa-1 que a su vez convierte la pro IL-1 $\beta$  en su forma madura (IL-1 $\beta$ ) para estimular la producción de otros mediadores proinflamatorios y la muerte celular por piroptosis.

**Hipótesis:** Las lesiones producidas en los tejidos de soporte del implante dental pueden estar inducidas por la IL-1 $\beta$  que es secretada por las células una vez que se activa el complejo multiproteico inflamasoma como respuesta del sistema innato de defensa.

**Objetivos:** valorar los Inflamasomas NLRP-3 y AIM-2 como posibles biomarcadores en la enfermedad periimplantaria mediante métodos morfológicos.

**Material y métodos:** se evaluaron 33 muestras de pacientes con periimplantitis fueron teñidas con H-E y pentacrómico de Movat. Los Inflamasomas NLRP-3 y AIM-2 y la extensión e intensidad de la expresión de caspasa-1, IL-1 $\beta$ , en células del infiltrado inflamatorio y células del epitelio gingival fueron evaluados mediante análisis inmunohistoquímicos con anticuerpos policlonales mediante kit de micropolímeros conjugado con peroxidasa y revelado con diaminobencidina.

**Resultados:** Existe una alta significación estadística en la expresión del inflamasoma AIM-2 y caspasa-1 en la lámina propia y epitelio mucoso, así como correlación estadística entre la expresión de los diferentes anticuerpos estudiados. La significación estadística entre la extensión del infiltrado inflamatorio y la expresión de caspasa-1, IL-1 $\beta$ , los Inflamasomas NLRP-3 y AIM-2 fue marginal.

**Conclusiones:** Se detecta por primera vez expresión inmunohistoquímica de los Inflamasomas AIM-2 y NLRP-3 en las células inflamatorias en la periimplantitis. El empleo de los Inflamasomas como biomarcadores morfológicos podrían ser una herramienta futura para establecer la intensidad del proceso inflamatorio.

**Palabras clave:** Inflamasomas; NLRP-3; AIM-2; caspasa-1, IL-1 $\beta$ ; Periimplantitis.

**TÍTULO: ANÁLISIS DE RESISTENCIAS DE FALLOS A SOFOSBUVIR/VELPATASVIR/VOXILAPREVIR EN VIDA REAL**

**Autores.** Adolfo De Salazar 1, Ana Fuentes 1, Fernando García 1, Dolores Merino 2, Magdalena Lara 3, María Rodríguez Pardo 4, Juan Ignacio Arenas 5, Blanca Figueruela 6, Rosario Palacios 7, Elisa Fuertes 8, Federico García

<sup>1</sup>Hospital Universitario San Cecilio. Instituto de Investigación Ibs, Granada, <sup>2</sup>Hospital Infanta Elena, Huelva, <sup>3</sup>Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, <sup>4</sup>Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, <sup>5</sup>Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, <sup>6</sup>Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla, <sup>7</sup>Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, <sup>8</sup>Hospital de Poniente, El Ejido

**Introducción:** Desde la comercialización de Vosevi® (Sofosbuvir, Velpatasvir y Voxilaprevir), las guías de tratamiento de VHC lo recomiendan como combinación de elección para el rescate de pacientes que han fallado a tratamiento con AADs. Aunque las tasas de SVR son elevadas, es interesante conocer como es el fracaso a esta pauta de rescate. Presentamos las características clínicas y virológicas de nuestra serie de pacientes que en vida real no se han conseguido rescatar empleando Vosevi®.

**Pacientes y métodos:** Estudio observacional en el que se recogen los pacientes que se han remitido al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio, para estudio de resistencias tras haber fallado a un régimen basado en Vosevi®. Se recogieron los datos demográficos (sexo, edad), clínicos (cirrosis, tratamientos previos, co-infección por VIH), y virológicos (carga viral, genotipo y resistencias en NS5A, NS3 y NS5B) y de tratamiento previos de estos pacientes.

**Resultados:** Presentamos los resultados de 7 pacientes con fracaso virológico a Vosevi®, todos ellos varones, con una mediana de edad de 55 años y mediana de carga viral en el fallo de 5,57 log<sub>10</sub> copias/ml. El 83% eran cirróticos y dos de ellos presentaban co-infección con VIH en el momento del estudio. Cuatro pacientes estaban infectados por genotipo 3a, dos por genotipo 1b y uno por genotipo 1a. En el fallo a Vosevi, el 86% (6/7) de los pacientes presentaron RAS en NS5A, tres de ellos con dobles mutantes (31M + 58P, 62L + Y93H y A30K +Y93H), y el 43% (3/7) presentaban RASs en NS3 (V551I + Q80K + S122G; Q168K y Q168R). Todos habían fallado a regímenes basados en NS5A antes del rescate con Vosevi.

**Conclusiones:** Los pacientes que han fallado a Vosevi® muestran virus con un gran compromiso para los fármacos disponibles, lo que hace que las opciones de rescate de estos pacientes sean muy difíciles. Para conseguir la micro-eliminación se deben favorecer medidas encaminadas a evitar este tipo de fracasos.

**TÍTULO. INFLUENCIA DE P53 EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES POR PARP-1 EN EL CÁNCER COLORRECTAL**

**Autores.** José David Puentes Pardo, Sandra Ríos Arrabal, Jorge Casado, Julia Escudero Feliú, María García Costela, Sara Moreno San Juán, Josefa León.

*Unidad Técnico Experimental, Hospital Universitario San Cecilio de Granada, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibis.GRANADA).*

**Resumen:** La poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) es una proteína que participa activamente en la vía de reparación del ADN, aunque también está involucrado en otros procesos moleculares y celulares. PARP-1 se encuentra sobreexpresada en varios cáncer, entre ellos el cáncer colorrectal (CRC), en el que se ha descrito como un mediador clave del en las primeras etapas del desarrollo tumoral. Además, altos niveles de expresión de PARP-1 se han relacionado con el tamaño del tumor y la resistencia a la quimioterapia. Sin embargo, los ensayos clínicos con inhibidores de PARP-1 de última generación no han dado los resultados esperados. El estado de p53 (salvaje o mutado) puede influir en el efecto de la terapia con inhibidores de la PARP-1. Estas dos vías se han relacionado, a su vez, con el proceso de diferenciación de células madre cancerosas (CMCs), aunque en el CCR esto no ha sido estudiado aún. En este trabajo se ha analizado la expresión de PARP-1 y varios marcadores de CMCs, así como las mutaciones del gen p53 en una cohorte de pacientes con CCR. También se ha analizado la influencia de la sobreexpresión de PARP-1 en la subpoblación de CMCs en un modelo *in vitro* de CCR con diferente estatus del gen p53. En todos los pacientes, y en aquellos con tumores con p53 salvaje se observa una relación entre la expresión de PARP-1 y el grado de diferenciación del tumor. Además, unos niveles de expresión altos de PARP-1 se correlacionan con una mayor supervivencia general y con una mayor supervivencia libre de enfermedad de pacientes con tumores con p53 mutado, pero no se observa relación entre la expresión de PARP y la supervivencia en tumores con p53 salvaje. La regresión de COX para el riesgo de muerte muestra que la edad es un factor independiente para la supervivencia en pacientes con CCR con y sin mutaciones en p53, y que, PARP-1 lo es también para pacientes que si presentan p53 mutado. Asimismo, en los pacientes que poseen tumores con p53 salvaje altos niveles de expresión de PARP-1 se correlacionan con altos niveles para marcadores de CMCs. En conclusión, el nivel de expresión de PARP-1 se encuentra relacionado con el grado de diferenciación del tumor en los pacientes de CCR con p53 salvaje, y una mayor supervivencia en aquellos con tumores con mutaciones en p53. Además, en estos pacientes, PARP-1 puede usarse como un factor pronostico independiente de la enfermedad. Estos resultados muestran como el estado de p53 puede influir en el éxito de las terapias actuales que emplean inhibidores de PARP-1, y en la necesidad de realizar tratamientos en base a las características genómicas y moleculares del tumor de cada paciente.

**TÍTULO: AGOMELATINA COMO NUEVA ESTRATEGIA DE TRATAMIENTO FRENTE AL CÁNCER COLORRECTAL**

**Autores.** Sara Moreno San Juan, Jorge Casado, Sandra Ríos Arrabal, María García Costela, Julia Escudero Feliú, José David Puentes Pardo, Josefa León.

*Unidad Técnico Experimental, Hospital Universitario San Cecilio de Granada, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibis.GRANADA).*

**Resumen:** El antimetabolito 5-fluorouracilo (5-FU) es el pilar de la terapia contra el cáncer colorrectal (CCR). Sin embargo, la resistencia intrínseca y adquirida sigue siendo un importante revés para su eficacia clínica. A nivel molecular, la respuesta celular al tratamiento con 5-FU depende de p53, siendo menos efectivo cuando el tumor presenta mutaciones en el gen p53.

En este trabajo se ha evaluado la utilidad de la agomelatina, un agonista melatoninérgico que también actúa como antagonista de los receptores HT2c de la serotonina, como tratamiento alternativo para el CCR en modelos *in vitro* e *in vivo*.

*In vitro*, se han utilizado dos líneas celulares con diferente estatus de p53: HCT-116 (p53 salvaje) y HCT-116 p53 -/- (p53 null) en las que tras el tratamiento con agomelatina o melatonina se ha estudiado la viabilidad y el ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación, los niveles de radicales libres y la expresión de genes del reloj circadiano.

*In vivo*, se han utilizado ratones desnudos a los que se han inoculado subcutáneamente 2.5x10<sup>6</sup> células HCT-116 y HCT-116 p53-/-, en los flancos derecho e izquierdo respectivamente. Se han incluido 4 grupos de estudio (8 animales en cada uno): control, tratados con melatonina (5 mg/kg), con agomelatina (5 mg/kg) y con 5-FU (50 mg/kg) que se administraron intraperitonealmente tres veces por semana.

En las células HCT-116 se observa un efecto inhibidor por la melatonina mayor que en HCT-116 p53 -/. En el caso de la agomelatina, el efecto inhibidor también es mayor en la línea celular HCT-116, aunque en ambas líneas el efecto es significativamente mayor que el obtenido tras el tratamiento con melatonina. Ninguno de estos compuestos actúa a través de sus receptores. La melatonina induce una acumulación en fase G1 del ciclo y un descenso en fase G2/M, aunque no apoptosis en ambas líneas celulares. Sin embargo, la agomelatina induce una acumulación en fase G2/M, un descenso en fase G1 y apoptosis dependiente de caspasas en ambos. En cuanto a la actividad fosfatasa alcalina la melatonina no induce cambios, mientras que la agomelatina induce un aumento de su actividad, en la línea celular HCT-116. Ambos tratamientos desencadenan cambios en la expresión de genes del reloj circadiano, aunque solo la agomelatina origina cambios en el estado redox celular.

En el modelo *in vivo*, la melatonina y el 5-FU únicamente redujeron el tamaño tumoral en los tumores inducidos por HCT-116. En este caso, la agomelatina fue 2 veces más potente que la melatonina y 10 veces más potente que el 5-FU. Los tumores inducidos por HCT-116p53-/- solo redujeron su tamaño tras el tratamiento con agomelatina aunque el efecto fue menor que en el caso de HCT-116.

En conclusión, la agomelatina es efectiva frente al tratamiento del CCR en nuestros modelos. Su efecto depende del estado, mutado o no mutado de p53, si bien, y al contrario que la melatonina o el 5-fluorouracilo, también es capaz de inhibir el crecimiento en el caso de que p53 se encuentre mutado.

**TITLE: NARROW-LEAFED LUPIN (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* L.) SEED  $\beta$ -CONGLUTIN PROTEINS INDUCE G0/G1 ARREST AND APOPTOSIS IN HUMAN COLORECTAL CANCER CELLS**

**Authors:** M. García-Costela<sup>1\*</sup>, J. Escudero-Feliu<sup>1\*</sup>, S. Ríos-Arrabal<sup>1</sup>, S. Moreno San Juan<sup>1</sup>, JD. Puentes Pardo<sup>1</sup>, J. León<sup>2</sup>, and J.C. Jimenez-Lopez<sup>3,4\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Technical-Experimental Unit of the Biomedical Research Institute of Granada (IBS.Granada), Granada E-18012 Spain.*

<sup>2</sup>*Clinical Management Unit of Digestive System; University Hospital San Cecilio; Biomedical Research Institute of Granada (IBS.Granada), Granada E-18012 Spain*

<sup>3</sup>*Dept. Biochemistry, Cell & Molecular Biology of Plants; Estación Experimental del Zaidín; Spanish National Research Council (CSIC), Granada E-18008, Spain*

<sup>4</sup>*The UWA Institute of Agriculture and School of Agriculture and Environment; The University of Western Australia, Perth 6009 WA, Australia*

\*Co-authors: both authors have contributed equally in the development of this paper.

\*\*Author for correspondence: josecarlos.jimenez@eez.csic.es

**Keywords:** autophagy, colorectal cancer, molecular nutraceutics, P53 gene, apoptosis.

**Abstract:** Lupins seed proteins seem to be promising as innovative source of functional food with positive health aspects: prevention of cardiovascular disease and reduction of glucose and cholesterol blood levels [1].

Interestingly, *Lupinus angustifolius* (narrow-leaved lupin, NLL) seeds are a valuable source of proteins for human consumption with multiple nutraceutical properties [1]. Among these proteins, research attention has been focused the  $\beta$ -conglutin family, which is the most abundant [2].

Recently, the potential anti-diabetic [3,4], antioxidant and anti-inflammatory activities of  $\beta$ -conglutins 1,3 and 6 has been demonstrated [5], as well as the decrease in the production of pro-inflammatory cytokines and the inhibition of chemotaxis and cell adhesion capacity [5].

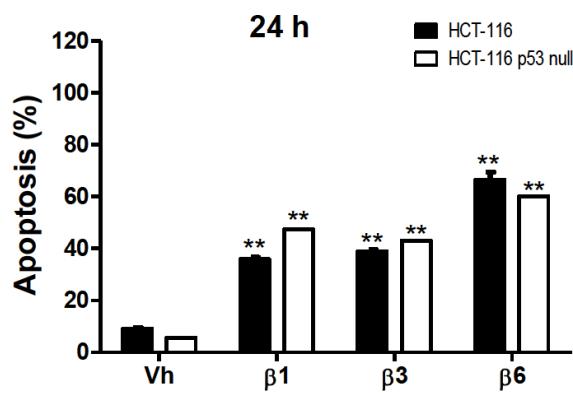
In this study, we purified NLL recombinant  $\beta$ -conglutins (r $\beta$ 1, r $\beta$ 3, and r $\beta$ 6) using affinity-chromatography and evaluated their effects on colorectal cancer (CRC) cell lines HCT-116 (p53 wild-type) and HCT-116 p53 null (p53 inactive).

The results showed that  $\beta$ -conglutins are capable of inhibiting the growth of CRC cells. In all cases, the effect is observed at a very low concentration. In HCT-116 cell line, the IC<sub>50</sub> values are 0.8, 5.8 and 30.1 $\mu$ g/ml for  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 and  $\beta$ 6, respectively. Moreover, for HCT-116 p53 null line, the IC<sub>50</sub> values are 3.0, 3.4 and 51.8 $\mu$ g/ml for  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 and  $\beta$ 6, respectively. Thereby, in both cell lines  $\beta$ -conglutin proteins effect is higher in the case of  $\beta$ 1, followed by  $\beta$ 3 and  $\beta$ 6.

Additionally, these conglutins decrease cell proliferation by inducing cell cycle arrest, independently of p53. Specifically,  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 induce accumulation in G0/G1 phase, while  $\beta$ 6 induces, in addition, accumulation in G2/M phase. In all cases, very few cells were found in S phase. Finally, this treatment considerably increases the apoptosis independently of p53 (Figure 1).

In summary,  $\beta$ 1,  $\beta$ 3, and  $\beta$ 6 conglutin proteins from NLL seeds affect the viability in CRC cells at very low concentration, inducing apoptosis and decreasing cell proliferation by cell cycle arrest. Our results suggest that NLL  $\beta$ -conglutin proteins may be natural chemotherapeutic agents with potential uses for treatment of human CRC.

Figure 1.  $\beta$ -conglutins induce cell death by apoptosis after 24h. Mean  $\pm$  standard



deviation of three separate experiments (Vh: control). \*\* P < 0.001 vs Vh.

**Acknowledgment:** Supported by European Research Program MARIE CURIE (FP7-PEOPLE-2011-IOF), Project ref.: PIOF-GA-2011-301550; by the Spanish Government (MINECO), project ref.: RYC-2014-16536 (Research Program Ramon y Cajal), and project ref.: BFU2016-77243-P; and by CSIC – Intramural project, Ref: 201540E065.

#### References:

- [1] C. Delgado-Andrade, R. Olías, J.C. Jimenez-Lopez, A. Clemente. Arbor 2016, 192, a313- .
- [2] R.C. Foley, J.C. Jimenez-Lopez, L.G. Kamphuis, J.K. Hane, S. Melser, Singh K.B. BMC Plant Biology 2015, 15, 106.
- [3] E. Lima-Cabello, V. Alche, R.C. Foley, S. Andrikopoulos, G. Morahan, K.B. Singh, J.D. Alche, J.C.

**TITLE: TNF- $\alpha$  AND IFN- $\gamma$  INDUCE AN ANTIINFLAMMATORY PHENOTYPE IN INTESTINAL MESENCHYMAL STROMAL CELLS**

**Authors:** Hidalgo-García L<sup>1</sup>, Rodríguez-Cabezas ME<sup>1</sup>, Tijeras, JA<sup>1</sup>, Vezza T<sup>1</sup>, Diez-Echave P<sup>1</sup>, Ruiz-Malagón AJ<sup>1</sup>, Huertas F<sup>2</sup>, Becerra-Massare P<sup>3</sup>, Galvez J<sup>1</sup>, Anderson P<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>*Department of Pharmacology, CIBER-EHD, ibs.GRANADA, CIBM, University of Granada, Spain.*

<sup>2</sup>*Division of Colon & Rectal Surgery, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Granada, Spain.*

<sup>3</sup>*UGC Pathological Anatomy, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Granada, Spain.*

<sup>4</sup>*UGC de Laboratorios Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.*

**Introduction:** Nowadays, there is increasing evidence that exosomes secreted by mesenchymal stromal cells are one of the main mediators of their therapeutic effects. However, their immunomodulatory properties as well as the content of their exosomes differ under different incubation conditions. Moreover, although their role is better characterized in cancer, less progress has been made in autoimmune diseases such as IBD. Thus, the aim of the study is to evaluate the effect of different stimuli in the expression of immune mediators secreted by intestinal mesenchymal cells (IMCs) as well as to better characterize the exosomes they secrete.

**Methods:** IMCs were isolated with an enzymatic cocktail from resections of intestinal human samples. After that, they were cultured and at passage 3-5 their phenotype was checked by FACs. IMCs were cultured until passage 7 and 70-80% confluency. At this point they were treated with different stimuli: (1) LPS (10 ng/mL); (2) poly I:C (1  $\mu$ g/mL); and (3)TNF- $\alpha$  (3 ng/mL) and IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) during 1 h and 24 h. IMCs without stimulation were used as negative control. After the treatment, the medium was replaced with new free serum medium and 24-48 h later, the supernatant was collected. The expression of immune mediators was analyzed by RT-qPCR, and polarization towards MSC1 and MSC2 phenotypes was assessed.

**Results:** Cells isolated from the intestinal resections showed a fibroblastic like shape and a mesenchymal phenotype (CD90+, CD73+, CD105+ and CD45-). With regards to immune mediators expression, 1 h and 24 h of stimulation with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  showed the most promising results – the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) was significantly increased when comparing it with the negative control. Moreover, these combination did not show to induce the expression of proinflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8. Conversely, LPS (1h and 24 h) and poly I:C (1 h) did not induced the expression of IDO and the expression of IL-8 was induced after 1 hour stimulation of LPS. In the case of 24 h poly I:C, the results obtained were similar to these reported for TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , unless to a lesser extent.

**Discussion / Conclusion:** Independently of the stimulation time, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  can polarize IMCs towards an anti-inflammatory MSC2 phenotype, as well as 24 h stimulation with poly I:C. It is very likely, this immunomodulatory properties can also be exerted by the exosomes released by this cells which could drive to the development of a new therapy for IBD.

## PROGRAMA

**8.30 h**

**Acto Inaugural**

**8.45 h**

**Presentación de Programas de Investigación de Medicina Personalizada y Medicina Predictiva.**

**Jose Antonio López Escámez.** Director científico del ibs.GRANADA

**9:15 - 10:15**

**IC PerMed y la convocatoria de ERA-NET Net in Personalized Medicine en 2020**

**Mauricio García Franco.** Acciones complementarias de programación conjunta internacional. Instituto de Salud Carlos III.

**10:15 - 10:30**

**Descanso**

**10:30 - 12:00**

**Mesa Medicina de Precisión (Parte 1)**

**Moderadores:**

- Julio Gálvez Peralta. Coordinador del Área de Medicina de Precisión ibs.GRANADA
- José Antonio López Escámez. Director Científico ibs.GRANADA

**1- Microbiota intestinal: nueva diana en el tratamiento de las complicaciones cardiovasculares del lupus eritematoso sistémico.**

Ponente: Rosario Jiménez Moleón, Profesora Titular de Universidad, Grupo Farmacología Cardiovascular MP-02.

**2- Influencia del patrón de alimentación en el lupus eritematoso sistémico.**

Ponente: Blanca Rueda Medina. Profesora Titular de Universidad. Grupo Bases Fisiopatología y Terapéutica Médica MP-07

**3- Receptores sigma-1: una nueva diana farmacológica para el tratamiento del dolor.**

Ponente: Enrique Cobos del Moral, Profesor Titular de Universidad, Grupo Neurofarmacología del Dolor MP-09

**4- Emerging Opportunities for Person-centered Precision Medicine in Complex Medical Illnesses.**

Ponente: Coral del Val Muñoz, Profesora Titular de Universidad, Grupo Bioinformática Translacional MP-10.

**5- Expresión génica en Enfermedades Autoinmunes.**

Ponente: Enrique Raya Álvarez. Profesor Titular de Universidad, Grupo Reumatología MP-11.

**6- Bases genéticas de la enfermedad de Meniere.**

Ponente: Álvaro Gallego-Martínez, Investigador Postdoctoral Grupo Otología y Otoneurología MP-12.

12:00 – 12:30

**Descanso**

12:30 – 14:00

**Mesa Medicina de Precisión (Parte 2)**

**Moderadores:**

- Manuel Muñoz Torres: Coordinador del Área de Medicina de Precisión ibs.GRANADA
- Josefa León: Investigadora Nicolas Monardes, Grupo Enfermedades Hepáticas y Cáncer Colorrectal MP-15.

**7- Microeliminación de hepatitis C.**

Ponente: Ana Fuentes Lopez, Residente 3 en UGC Microbiología Clínica.

**8- Factores asociados al desarrollo de metástasis tras el tratamiento neoadyuvante en cáncer de recto.**

Ponente: Josefa León López, Investigadora Nicolás Monardes, Grupo Enfermedades Hepáticas y Cáncer Colorrectal MP-15.

**9- Inmunomodulación intestinal.**

Ponente: Fermín Sánchez de Medina López-Huertas, Catedrático de Universidad, Grupo Inmunomodulación intestinal MP-16.

**10- De la cronodisrupción a la sarcopenia.**

Ponente: Darío Acuña Castroviejo, Catedrático de Universidad, Grupo Comunicación Intercelular MP-17.

**11- Avances en el conocimiento de los factores determinantes de programación de la salud y la enfermedad.**

Ponente: Cristina Campoy Folgoso, Profesora Titular de Universidad, Grupo Nutrición y Metabolismo Infancia MP-19.

**12 - Biología ósea y enfermedad vascular.**

Ponente: Beatriz García Fontana. Investigadora Postdoctoral. CIBER Fragilidad y Envejecimiento. Grupo Biomarcadores Enfermedades Metabólicas y Óseas MP-20.

**13 - Implicaciones de la microbiota y la epigenética en enfermedades crónicas no transmisibles.**

Ponente: Carolina Gómez Llorente, Profesora Titular de Universidad, Grupo Bioquímica de la Nutrición MP-22.

14:00 h

**Clausura**