



III SIMPOSIO DE
T E R A P I A S
AVANZADAS
TECNOLOGIAS
B I O M É D I C A S

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

16 DICIEMBRE 2022

SALÓN DE ACTOS

Patrocina:



Organizado por:



Fundación para la Investigación Biosanitaria
de Andalucía Oriental - Alejandro Otero
Consejería de Salud y Consumo



INFORMACIÓN GENERAL

El ibs.GRANADA organiza el **III SIMPOSIO DE TERAPIAS AVANZADAS Y TECNOLOGÍAS BIOMÉDICAS**. Tendrá lugar el **viernes 16 de diciembre de 2022** en el Salón de Actos la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

OBJETIVOS

El **objetivo** de este simposio es presentar las principales líneas de investigación llevadas a cabo en el área de las Terapias Avanzadas y las Tecnologías Biomédicas por grupos del ibs.GRANADA y grupos afines a estas áreas de conocimiento. El simposio supone una oportunidad para que investigadores y profesionales sanitarios puedan interactuar y establecer nuevas líneas de colaboración y sinergias en el campo de las Terapias Avanzadas y las Tecnologías Biomédicas. Este simposio es además una oportunidad para difundir estos trabajos y proyectos al resto de profesionales sanitarios, así como al público en general.

INSCRIPCIONES

Para inscribirse es necesario rellenar el formulario online de inscripción en: <https://www.ibsgranada.es/inscripcion-al-iii-simposio-de-terapias-avanzadas-y-tecnologias-biosanitarias-ibs-granada/>.

El plazo límite para realizar la inscripción es el 15 de diciembre de 2022.

COMITÉ ORGANIZADOR

Fernando Campos Sánchez. Prof. Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada. TEC03-Ingeniería Tisular.

Jesús Chato Astrain. Prof. Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada. TEC03-Ingeniería Tisular.

COMITÉ CIENTÍFICO

Miguel Alaminos Mingorance
María del Mar Pérez Gómez
Ingrid Johanna Garzón Bello
Ana María Ionescu
Víctor Sebastián Carriel Araya
Razvan Guinea
Juan de la Cruz Cardona Pérez
Miguel Ángel Martín Piedra
Óscar Darío García García
Javier Ruiz López
Francisco Carrillo Pérez
María Natividad Tejada Casado
David Sánchez Porras
Cristina Blanco Elices
Olimpia Ortiz Arrabal
Paula Ávila Fernández

PROGRAMA

8:30-9:00 Reunión de coordinación de los investigadores principales del Área de Terapias Avanzadas y Tecnologías Biomédicas

9:00-9:20 Inauguración del Simposio

- **Dra. Aurora Valenzuela Garach.** Decana de la Facultad de Medicina. Universidad de Granada
- **Dr. Indalecio Sánchez-Montesinos García.** Delegado territorial de la consejería de Salud y Consumo de la Junta de Andalucía
- **Dra. María Ángeles García Rescalvo.** Directora Gerente del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.
- **Dr. Manuel Enrique Reyes Nadal.** Director Gerente del Hospital Universitario Clínico San Cecilio.
- **Dra. María José Sánchez Pérez.** Directora Científica de ibs.GRANADA.
- **Dr. Fernando Campos Sánchez.** Organizador del III Simposio de Terapias Avanzadas y Tecnologías Biomédicas

9:20-10:00h Conferencia Invitada: BIOCLEFT: Tejidos artificiales para el tratamiento de pacientes pediátricos con fisura palatina

Dr. Ricardo Fernández Valadés.

Investigador del grupo TEC03-Ingeniería Tisular de ibs.GRANADA. Jefe de servicio de Cirugía Pediátrica. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

10:00-11:00h Mesa 1: Terapias avanzadas: ingeniería tisular, terapia celular y terapia génica

- **Evaluación preclínica de aloinjertos nerviosos acelulares generados por un nuevo método de descellularización quimio enzimático.**

Dr. Óscar Darío García-García. Investigador del grupo TEC03 – Ingeniería Tisular del ibs.GRANADA.

- **De lo nano a lo macro: aprovechamiento de los fenómenos nanoscópicos para diseñar y construir materiales activos.**

Dr. Laura Rodríguez Arco. Investigadora del grupo TEC05-Física de Interfases y Sistemas Coloidales del ibs.GRANADA

- **Aplicaciones del aprendizaje de máquina: Sistemas de apoyo al diagnóstico del cáncer y caracterización óptica de biomateriales.**

Dr. Luis Javier Herrera Maldonado. Investigador del grupo TEC09-Óptica de Biomateriales y Tejidos del ibs.GRANADA

11:00-11:40h **Café y pósteres**

11:40- 13:00h **Mesa 2: Dispositivos diagnósticos y biomédicos**

- **Livercolor: algoritmo de cuantificación de esteatosis hepática utilizando machine learning y procesamiento de imágenes.**

Dra. Jennifer Triguero Cabrera. Investigadora del grupo TEC13-Cirugía Avanzada del ibs.GRANADA

- **Diagnóstico diferencial de infecciones respiratorias agudas mediante una plataforma autónoma portátil de sensores de grafeno**

Dr. Francisco Jesús Gámiz Pérez. Investigador del grupo TEC04-Nanoelectrónica del ibs.GRANADA

- **Desarrollo de ensayos diagnósticos basados en anticuerpos de dominio único frente a nuevos biomarcadores tumorales**

Dra. Rosario María Sánchez Martín. TECe18-Nanochembio

- **Biofabricación de modelos tumorales: más cerca de un tratamiento personalizado**

Dra. Gema Jiménez González. TEC16-Terapias Avanzadas: Diferenciación, Regeneración y Cáncer

13:00-14:40 **Mesa 3: Salud y rehabilitación**

- **Farmacogenética de las terapias biológicas en Artritis reumatoide: proyectos destacados.**

Dra. Noelia Márquez Pete. Investigadora del grupo TEC02-Seguimiento Farmacoterapéutico Hospitalario del ibs.GRANADA

- **Expresión de *Musashi-1* en la reparación y regeneración ósea**

Dr. Pedro Manuel Hernández Cortes. Investigador del grupo TECe21-Repación, Regeneración y Sustitución Ósea del ibs.GRANADA

- **Aplicación de las nuevas tecnologías en el ámbito de la rehabilitación**

Dra. María Patrocinio Ariza Vega y Dra. Rocío Pozuelo Calvo. Investigadora del grupo

TECe20-Rehabilita-T: Avances e innovación en rehabilitación y promoción de la salud del *ibs.GRANADA*

- **Importancia de la medición de la función barrera cutánea en enfermedades inflamatorias de la piel**

Dra. Trinidad Montero Vílchez y Dr. Salvador Arias Santiago. Investigadores del grupo TECe19-Dermatología Clínica y Traslacional del *ibs.GRANADA*

- **Avances en enfermedad renal hereditaria**

Dra. María del Mar del Águila. Investigadora del grupo TEC14-Reproducción Humana y Enfermedades Hereditarias y Complejas del *ibs.GRANADA*

14:40 h Cierre de la jornada y conclusiones finales

ABSTRACTS PRESENTADOS EN FORMATO PÓSTER

ABSTRACTS PRESENTED AS POSTERS

EFFECT OF NOVEL POLYMERIC PARTICLES DOXYCYCLINE AND DEXAMETHASONE BASED ON MICROTENSILE BOND STRENGTH OF RESIN-DENTIN INTERFACES

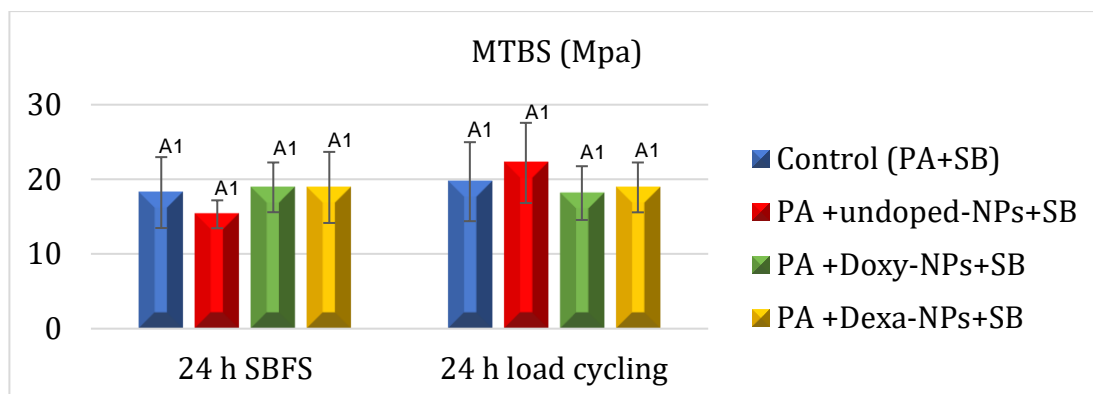
Fátima S. Aguilera^{1,2}; Enrique Fernández-Romero¹; Juan Francisco González-Fernández^{1*}; Alejandro J. Sánchez-Lagos^{1*}; Marco Bonilla-Izquierdo^{1*}; Manuel Toledano^{1,2}; Raquel Osorio^{1,2}.

¹ Universidad de Granada, Facultad de Odontología; ² Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs.GRANADA, Spain.
 * Estudiante de Grado.

Objective: To investigate the effect of novel polymeric nanoparticles (NPs) doped with doxycycline (Doxy) and dexamethasone (Dex) on microtensile bond strength (MTBS) of resin- sound dentin interfaces after mechanical loading.

Material and Methods: Flat dentin surfaces from sound molars were randomly assigned to 4 experimental groups based on the NPS that were applied: 1) Control, 2) Undoped-NPS, 3) Doxy-NPs and 4) Dexa-NPs. An etch-and-rinse adhesive system (Single Bond -SB-) was then applied and resin composite build-ups (6 mm) were performed incrementally. Specimens were divided in two subgroups: a) sectioned into beams, after 24 h storage in simulated body fluid solution (SBFS) and b) load cycled with sine waveform (225 N, 259,200 cycles, 3 Hz) during 24h. Each beam was tested in tension in an Instron machine at 0.5 mm/min. MTBS data were analyzed by two-way ANOVA and SNK multiple comparisons tests ($P < 0.05$).

Results: The mean values and standard deviation of MTBS obtained for the experimental groups are shown in the Figure.



Abbreviations: MTBS: microtensile bond strength to dentin; SD: standard deviations; MPa: Megapascals; SBFS: simulated body fluid solution; PA: Phosphoric Acid; SB: Single Bond adhesive system; NPs: nanoparticles; Doxy: Doxycycline; Dexa: Dexamethasone.

Same letter indicates no significant differences between treatment groups within the same storage method. Same number indicates no significant differences between the storage method (24h SBFS or 24h load cycling) in the same treatment group ($p > 0.05$).

Conclusions

No damaging effect on MTBS, at 24 h of analysis, was observed when Doxy and Dex-NPS were applied; although there are no statistically significant differences, bond strength tends to increase after mechanical cycling.

Acknowledgements

This work was funded by Grant PID2020-114694RB-I00 funded by MCIN/AEI 10.13039/501100011033.

DEVELOPMENT OF SCLERO-CORNEAL LIMBI BIOARTIFICIAL SUBSTITUTES FOR USE IN TISSUE ENGINEERING

Paula Ávila-Fernández¹, Adela Murillo-Rodríguez¹, Carmen Gonzalez-Gallardo^{2,3}, David Sánchez-Porras^{1,2}, Ingrid Garzón^{1,2}, Cristina Blanco-Elices^{1,2}, Olimpia Ortiz-Arrabal^{1,2}, Óscar Darío García-García^{1,2}, Jesús Chato-Astrain^{1,2}, Miguel Alaminos^{1,2}, Fernando Campos^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; ³ Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain; ⁴ Department of Cellular Biology, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain

The sclero-corneal limbus is a specialized anatomical area in which corneal stem cells reside. Severe damage of this area associated to limbal deficiency is a therapeutical challenge for which novel treatments should be developed. The complex three-dimensional configuration of the scleral limbus is very difficult to reproduce in the laboratory using standard tissue engineering methods, and novel biofabrication methods are in need [1]. In the present work, we generated a substitute of the scleral limbus by decellularizing the native limbus using different protocols.

First, we obtained several sclero-corneal rings. Then, these rings containing the limbus were subjected to two different decellularization protocols. Protocol P1 was based on the use of 1.5M NaCl and 0.1% SDS detergent. Protocol P2 combined SDS, Triton X-100, SDC and several nucleases [2]. In both cases, an initial treatment with distilled water was applied. Evaluation of the efficiency of the decellularization method was carried out by DNA quantification, whereas the extracellular matrix preservation was assessed by histological and histochemical analyses.

Results showed that P1 and P2 were able to significantly reduce the amount of residual DNA in the decellularized tissues, although only P2 achieved DNA content values in accordance with standardized criteria for decellularized tissues (< 50ng/mg dry weight). Both protocols preserved the histological structure of the scleral limbus, as well as the most important extracellular matrix components of the limbus, including collagen fibers and proteoglycans.

These results suggest that, for the correct decellularization of the scleral limbus, a multi-step decellularization protocol combining chemical and enzymatic methods is preferable. The combination of decellularization agents used in P2 achieved the best results in terms of decellularization efficiency, and should therefore be selected. The adequate preservation of extracellular matrix components suggests that these decellularized limbi could be good candidates for recellularization and further use in regenerative medicine.

Supported Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI20/0317 and ICI21/00010 (NANOULCOR). Supported by grant CSyF PI-0086-2020 from Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain and grant B-CTS-504-UGR20 (Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the “Una manera de hacer Europa” program.

[1] Sánchez-Porras D, et al. Pharmaceutics. 2021;13:1718

[2] Chato-Astrain J, et al. Tissue Eng. Regen. Med. 2020;14:789–806

VALOR DE LA GAMMAGRAFÍA ÓSEA TRAS 3 DOSIS DE $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN

Daniela Bianca Patrut¹, Teodoro Rudolphi Solero^{1,2}, Tomader Amrani¹, Juan Márquez Fernández³, Alberto Delgado García¹, Salomé Sanz Viedma¹.

¹ Servicio de Medicina Nuclear, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga; ² Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs.Granada, Granada; ³ Servicio de Medicina General y Urgencias, Hospital Quirónsalud Málaga, Málaga.

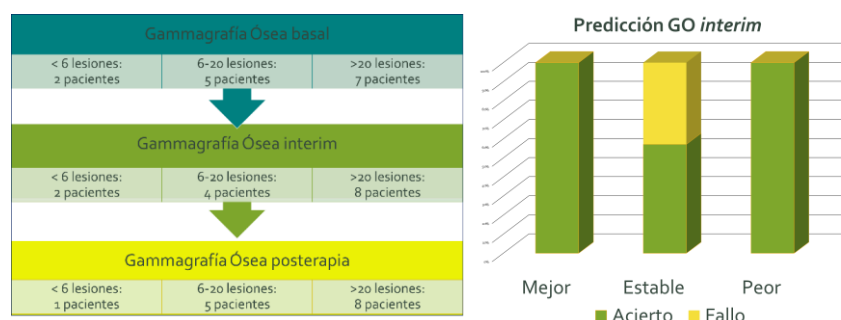
Introducción: El $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ es un tratamiento indicado en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración con metástasis óseas. Su administración es mensual hasta 6 dosis y su objetivo paliar el dolor y aumentar la supervivencia. Actualmente no existen marcadores específicos para establecer criterios en la monitorización y evolución de estos pacientes.

Objetivo: Evaluar los resultados de la gammagrafía ósea (GO) tras administración de la 3ª dosis de $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ y compararlas con los resultados de la GO postratamiento y con la variación de variables bioquímicas.

Material y métodos: Se trataron 35 pacientes (2016–2022), de los que se incluyeron aquellos con GO pretratamiento, tras la 3ª dosis (*interim*) y posterapia. Los resultados fueron revisados por 2 médicos nucleares y clasificados en 3 grupos: <6, 6–20, >20 lesiones, considerando como criterios de progresión los establecidos en Prostate Cancer Working Group 3.

Resultados: Catorce pacientes fueron incluidos en el estudio con una edad media de 72,1 años (47–89). El 92,8% recibieron previamente al menos otra línea de terapia antes de $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$. En la GO basal 2 pacientes presentaron <6 lesiones, 5 entre 6-20, y 7 >20 lesiones. Tras la GO *interim*, los pacientes se clasificaron en 3 categorías: estabilidad (7 pacientes), respuesta (2) y progresión (5). La GO posterapia fue equivalente a la GO *interim* en un 66.6% de los casos y se mostró progresión tras la 3ª dosis en un 35% de los casos. La supervivencia media tras la última dosis fue de 6,15 meses. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia según el número de lesiones. Se observó un incremento del PSA en un 85,7% de los pacientes, así como una disminución de la FA en la misma proporción. En el 78,5% de los pacientes, la GO *interim* predijo el resultado de la GO posterapia con un 100% de aciertos en caso de progresión o respuesta. El error diagnóstico de 21,5% fue en pacientes estables en la GO *interim* que finalmente progresaron.

Conclusión: La GO podría ser útil en la monitorización del tratamiento con $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$, sin embargo, es necesario ampliar la muestra del estudio. La predicción del comportamiento de las lesiones podría ser útil para progresar a los pacientes a líneas de tratamiento ulteriores



ANALYSIS OF FIBRILLAR COMPONENTS OF BIOENGINEERED HUMAN CORNEAS GENERATED BY TISSUE ENGINEERING

Cristina Blanco-Elices^{1,2}, Olimpia Ortiz-Arrabal^{1,2}, Carmen Gonzalez-Gallardo^{2,3}, Paula Ávila-Fernández¹, Fernando Campos^{1,2}, Fabiola Bermejo-Casares¹, Paloma de la Cueva¹, Miguel Alaminos^{1,2}, Antonio Campos^{1,2}, Ingrid Garzón^{1,2}, Miguel-Ángel Martín-Piedra^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; ³ Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain; ⁴ Department of Cellular Biology, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain.

Cornea transplantation is the gold-standard treatment for severe corneal diseases, with quite good successful rate. However, the shortage of corneal donors, and other complications associated to cornea transplant make necessary the search for novel alternatives to this procedure. In this regard, the recent development of tissue engineering methods allows the possibility of generating novel bioengineered human corneas by tissue engineering, which could represent an alternative treatment for these diseases (1).

However, recent reports suggest that *ex vivo* culture could be associated to a pathological process of fiber remodeling in the bioartificial tissue, with the formation of fibrillar components that are not typical of the human cornea, such as reticular or elastic fibers. The objective of this work is to determine the biomimicry of bioartificial corneas generated with fibrin-agarose biomaterials and human cornea cells as compared to human native corneas.

Primary cell cultures of human corneal epithelial cells and human corneal keratocytes were obtained, and three-dimensional bioengineered human corneas were generated using fibrin-agarose hydrogels as scaffolds. These cornea substitutes were kept in culture for up to 4 weeks, and the air-liquid culture method was used to favor epithelial stratification and differentiation (2). Histological analyses of the bioengineered corneas were performed using hematoxylin-eosin (HE), Verhoeff and Gomori techniques using the human native cornea as a control.

Histological characterization of the bioengineered corneas revealed the adequate development of the epithelial and connective layers. The epithelial layer consisted of a well-stratified epithelium with more than 5 cell strata showing adequate signs of differentiation resembling the native cornea epithelium. When the corneal stroma was analyzed, we found that both the control and the artificial corneas were devoid of elastic and reticular fibers as determined by Verhoeff and Gomori histochemical methods, respectively, showing a negative expression in all the samples and controls groups. These results suggest that these bioartificial corneas could be biomimetic regarding the native cornea and the biofabrication process was not associated to any significant alterations of the fibrillar components of these bioartificial corneas.

Supported Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI20/0317 and ICI21/00010 (NANOULCOR). Supported by grant CSyF PI-0086-2020 from Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain and grant B-CTS-504-UGR20 (Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the “Una manera de hacer Europa” program.

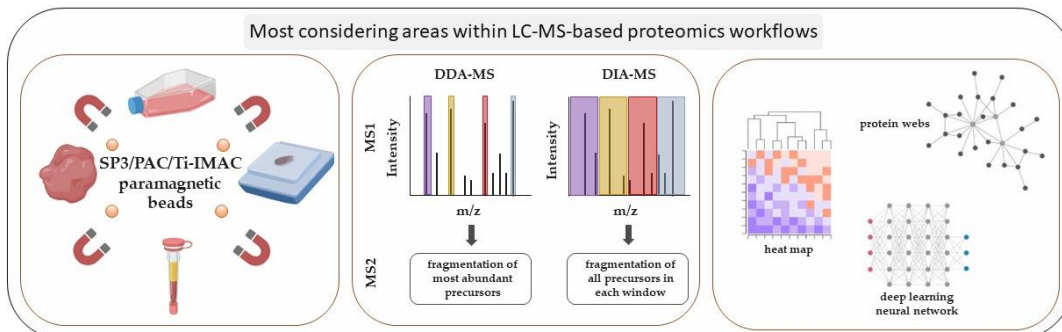
1. Rico-Sánchez L, Garzón I, González-Andrades M, Ruíz-García A, Punzano M, Lizana-Moreno A, et al. Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019 Dec;13(12):2142–54.
2. Gosselin EA, Torregrosa T, Ghezzi CE, Mendelsohn AC, Gomes R, Funderburgh JL, Kaplan DL. Multi-layered silk film coculture system for human corneal epithelial and stromal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Jan;12(1):285-295.

MASS SPECTROMETRY-BASED PROTEOMICS WORKFLOWS IN CANCER RESEARCH: THE RELEVANCE OF CHOOSING THE RIGHT STEPS

Paula Carrillo Rodriguez ^{1,2}, Frode Selheim ^{1*} and Maria Hernandez-Valladares ^{1,3,4}

¹ Proteomics Unit of University o Bergen (PROBE),Universiy of Bergen, Jonas Lies vei 91, 5009 Bergen, Norway. paulacrdgz@gmail.com; frode.selheim@uib.no; ² Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain; ³ Department of Physical Chemistry, University of Granada, Avenida de la Fuente Nueva S/N, 18071 Granada, Spain; mariahv@ugr.es; ⁴ Instituto de Investigación Biosanitari, ibs.GRANADA, Granada, Spain.

The qualitative and quantitative description of proteome changes that condition cancer development can be achieved by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). LC-MS-based proteomics strategies are carried out according to predesigned workflows that comprise of several steps such as sample selection, sample processing including labelling, MS acquisition methods, statistical treatment and bioinformatics to understand the biological meaning of the findings and set predictive classifiers. As the choice of best options might not be straightforward, we will herein review and assess past and current proteomics approaches for the discovery of new cancer biomarkers. While some aspects of the workflows might be subjected to sample type and size, we recommend, based on our experience and on others, the use of bead-based sample preparation protocols followed by data-independent acquisition (DIA) with label-free quantification methodologies or data-dependent acquisition (DDA) with tandem mass tags (TMT) quantification for broad proteome and phosphoproteome characterizations. Moreover, we will review major bioinformatics tools to interpret and visualize proteomics results and suggest most popular machine learning techniques for the selection of predictive biomarkers. Our optimized workflows approximate proteomics strategies to clinical diagnosis and prognosis of cancer cases.



NON-SMALL-CELL LUNG CANCER SUBTYPES CLASSIFICATION USING MULTI-OMICS AND MULTI-SCALE DATA AND MACHINE LEARNING MODELS

Francisco Carrillo-Perez^{1,2,4}, Juan Carlos Morales¹, Daniel Castillo-Secilla³, Olivier Gevaert², Ignacio Rojas¹, Luis Javier Herrera^{1,4}

¹ Department of Computer Architecture and Technology, University of Granada, C.I.T.I.C., Periodista Rafael Gómez Montero, 2, 18170 Granada, Spain; ² Stanford Center for Biomedical Informatics Research (BMIR), Department of Medicine, Stanford University, 1265 Welch Rd, Stanford, CA 94305, USA; ³ Fujitsu Technology Solutions S.A, CoE Data Intelligence, Camino del Cerro de los Gamos, 1, Pozuelo de Alarcón, 28224 Madrid, Spain; ⁴ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, E18011 Granada, Spain.

Introduction: An accurate differentiation between the various subtypes of non-small-cell lung cancer is crucial to provide an effective treatment and improve the patient prognosis. In recent years machine learning models paired with the available biological data have been used for the detection of the disease. Nevertheless, in most cases the problem has been approached as a single modality classification problem, not using the multi-omics and multi-scale nature of cancer data. Thus, in this work we explore the improvements that can be obtained by fusing the information provided by multiple machine learning models and biological modalities.

Material and Methods: We use five different sources of biological information (RNA-Seq, miRNA-Seq, Whole Slide Imaging, Copy Number Variation data and DNA Methylation), and trained state-of-the-art machine learning models per modality. Then, the probabilities returned by the models were fused using a novel late fusion approach, optimizing a weight matrix using stochastic gradient descent.

Results: We tested the improvements that can be obtained by increasingly fusing the modalities and observed that increasing the number of modalities also enhanced the classification performance. We finally trained a classification model using all modalities (and resilient to missing modalities) that obtained an AUC of 0.993 ± 0.004 , an AUPRC of 0.980 ± 0.016 , and an F1-Score of 96.81 ± 1.07 . These results outperformed those obtained by single-modality classifiers and improve or equal the results presented in literature for the same problem.

Conclusions: The obtained results show that fusing multi-omics and multi-scale cancer data can provided an improved performance over single-modality classifiers, specifically for the creation of clinical decision support systems in personalized medicine.

Acknowledgements: This work was supported by the Spanish Ministry of Sciences, Innovation and Universities under Projects RTI-2018-101674-B-I00, PID2021-128317OB-I00, and the projects from Junta de Andalucía P20-00163 and P20-00200.

4-HYDROXYBENZOIC ACID SUPPLEMENTATION PARTIALLY RESTORES THE COQ₁₀ LEVELS IN MODELS WITH MUTATION IN COQ2 AND UBIAD1.

Julia Corral-Sarasa², Sergio López-Herrador¹, Pilar González-García^{1,2}, Catarina M. Quinzif³, M. Elena Díaz-Casado^{1,2}, Luis C. López^{1,2},

¹Departamento de Fisiología, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain; ²Ibs.Granada, Spain; ³Department of Neurology, Columbia University Medical Center, USA.

COQ2 and UBIAD1 are two enzymes with prenyltransferase domains that participate in the mitochondrial or extra-mitochondrial synthesis of CoQ, respectively. Both enzymes use 4-hydroxybenzoic acid (4-HB) as substrate for their reactions. Interestingly, the supplementation with 4-HB in skin fibroblasts from a patient with a mutation in COQ2 increased CoQ₁₀ levels, suggesting that the substrate for COQ2 can stimulate the residual activity of the mutated enzyme. However, this approach has been tested in only one type of mutation, and, therefore, it is unknown whether it may work for different types of mutations in COQ2. Moreover, this therapeutic approach could also work to restore the synthesis of CoQ₁₀ in mutations in UBIAD1.

Here, we show that 4-HB supplementation partially restores CoQ₁₀ levels in skin fibroblasts from patients with different mutations in COQ2 (Y297C, R1197H/N228S and A109N). As a result, mitochondrial respiration and ATP/ADP ratio are partially normalized and cell viability is increased under galactose medium. In the *Ubiad1* zebrafish model (*bar^{S487}*), 4-HB supplementation also increases the levels of CoQ₁₀ but survival does not increase and the expression of the antioxidant enzymes (SOD and GPx) were not affected by the treatment. Since *Ubiad1* is also involved in vitamin K2 synthesis, the supplementation with its precursor, menadione, increases the survival of *bar^{S487}* animals, although the percentage of the mutant phenotype is not modified.

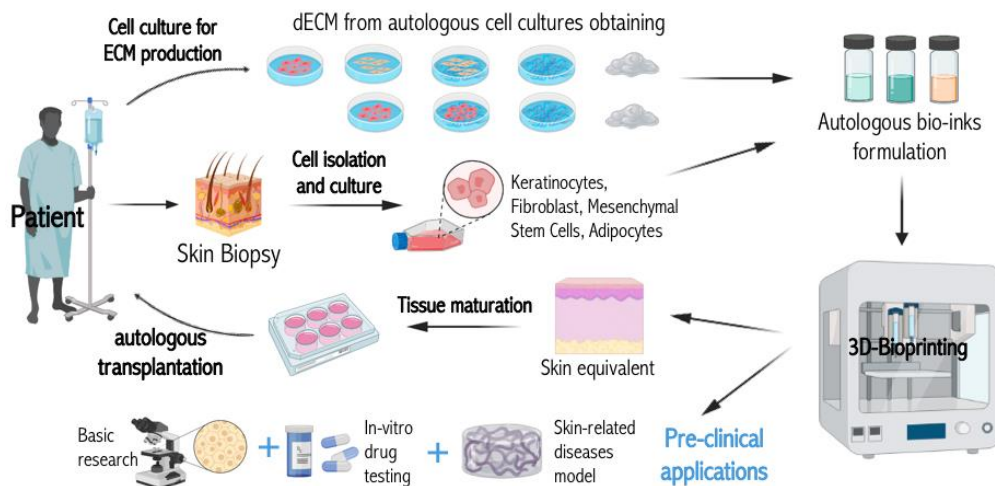
Altogether, these results support the use of 4-HB to stimulate CoQ₁₀ biosynthesis in defective prenyltransferases. However, this promising therapy must be tested in a mammalian model COQ2 deficiency to evaluate its potential translation into the clinic.

USE OF AUTOLOGOUS PATIENT-DERIVED CELL CULTURE dECM AS BIOMIMETIC MATERIAL FOR TISSUE ENGINEERING

Julia López de Andrés^{1,2,3}, Ana Voltres Martínez^{1,2,3}, Laura de Lara-Peña^{1,2,3}, Jesús Ruiz-Espigares^{1,2,3}, Elena López Ruiz^{1,2,3,4,5}, Gema Jiménez^{1,2,3,5,6*} and Juan Antonio Marchal^{1,2,3,5,6*}

¹ Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain; ² Excellence Research Unit "Modeling Nature" (MNat), University of Granada, Spain; ³ BioFab i3D- Biofabrication and 3D (bio)printing Laboratory, University of Granada, Spain; ⁴ Department of Health Sciences, University of Jaen, Jaen, Spain; ⁵ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Hospitales Universitarios de Granada-Universidad de Granada, 18100 Granada, Spain; ⁶ Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain.

The high incidence of patients with chronic skin lesions and major burn injuries requires the development of new strategies based on tissue engineering to produce functional skin grafts, either to replace tissue lost in skin lesions or to generate human skin models for research. However, currently available skin substitutes present different limitations, such as high costs, abnormal skin microstructure, and graft failure or, in the case of autografting, the availability of healthy donor tissue in patients suffering a major injury is restricted. Because control over the spatial disposition of the cells is very limited in these models, the patterns do not reproduce the real characteristics of the native tissue. Advances in 3D bioprinting technologies have allowed the production of substitutes with a controlled architecture, as well as the automation of the process. Among all the possible biomaterials used in tissue engineering, the use of decellularized extracellular matrix (dECM) derived from primary cultures obtained from patients has emerged as a source of ECM that allows recapitulating all the components of the native tissue, including growth factors and other communication molecules essential for adequate tissue homeostasis. In this project we have developed different dECM-based bioinks obtained from mesenchymal stem cells (MSCs), fibroblasts (FBs), and MSCs differentiated to skin cell lineages, isolated from patient samples, to generate biomimetic models that closely resemble native contexts.



BIOPRINTED ORGANOIDS AS MODELS FOR CANCER RESEARCH

de Lara-Peña L¹⁻⁴, López de Andrés J¹⁻⁴, Griñán-Lisón C¹⁻⁵, Zafra MP¹⁻⁴, Ruiz-Espigares J¹⁻⁴, Tristán-Manzano M⁵, Justicia-Lirio P⁵, Martín F⁵, Jiménez G^{1-4*} and Marchal JA^{1-4*}

¹Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, 18100 Granada, Spain; ²Biosanitary Investigation Institute (Ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada University of Granada, 18100 Granada, Spain; ³Excellence Research Unit "Modelling Nature" (Mnat), University of Granada, Granada, Spain; ⁴Department of Human Anatomy and Embriology, Faculty of Medicine, University of Granada, 18016 Granada; ⁵Genomic Medicine Department, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer University of Granada (Andalusian Regional Government) (GENYO), 18016 Granada, Spain.

Pancreatic cancer (PC) represents the seventh leading cause of cancer death worldwide and its incidence is increasing every year. Survival in this type of tumor is less than 5% due to lack of early diagnosis, rapid disease progression, high rate of metastasis and treatment failure. In PC, the stroma constitutes more than 90% of the tumor mass and is composed of many different elements. This highlights the need to create new 3D in vitro models incorporating the tumoral microenvironment (TME), as tumor progression and response to treatments depend to a large extent on it. These models may help us to understand and overcome the resistance of PC to several therapeutic strategies. The advances in 3D Bioprinting have been a major breakthrough in the generation of new complex 3D tumor models, as it allow the coculture of different cell populations, including ECM and other biomolecules and biochemical signals through the use of bioinks. This makes it possible to mimic characteristics of native tumors: development and metastasis, and treatment outcomes. In addition, organoids are good personalized medicine platforms, useful in pharmacotyping studies because they show parallel sensitivity and resistances in patients. Some treatments strategies, as CAR-T therapy, find many challenges to be effective in solid tumors. Because PC organoids can mimic the native tissue, they can facilitate the identification of novel antigens which could serve as targets for CAR-T therapy and also can help us to better understand resistance to it.

ASSOCIATIONS OF TRUNK FLEXORS MUSCLE ENDURANCE STRENGTH WITH MENTAL HEALTH IN PATIENTS WITH NON-SPECIFIC CHRONIC LOW BACK PAIN: THE BACKFIT PROJECT.

Donoso, B¹., Tsiarleston, G²., Gil-Gutiérrez, YM^{3,4}., Castellote-Caballero, Y⁵., Delgado-Fernández², M., Mesa^{3,4}, A., Sanles, D⁴, Segura-Jiménez, V^{3,4,6,7}.

¹Department of Psychology, Faculty of Education Sciences and Psychology, University of Córdoba, ²Department of Physical Education and Sports, Faculty of Sport Sciences, University of Granada, ³UGC Neurotraumatología y Rehabilitación, Hospital Universitario Virgen de las Nieves of Granada, ⁴ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, ⁵Department of Health Sciences, University of Jaén, ⁶GALENO research group, Department of Physical Education, Faculty of Education Sciences, University of Cádiz, ⁷Instituto de Investigación e Innovación Biomédica de Cádiz (INIBICA)

Background: Patients with non-specific chronic low back pain (NSCLBP) usually present lower levels of physical activity than their age-matched counterparts. Furthermore, NSCLBP causes psychological deterioration and patients' loss of health-related quality of life.

Objective: To explore the possible associations of the endurance strength of the trunk flexor muscles with depression, anxiety, and pain catastrophizing in patients with NSCLBP.

Methods: A total of 106 patients who met the inclusion criteria were enrolled in this cross-sectional study. Inclusion criteria were: be previously diagnosed with NSCLBP by a healthcare professional, able to read and understand the informed consent, able to walk and move without external aid, able to communicate without problems and be between 18-65 years old. The recruitment took place at the Physical Medicine and Rehabilitation Service from *Virgen de las Nieves*, University Hospital in Granada (Spain). Trunk flexor muscles endurance strength was assessed with the Prone Bridge test. Longer time performing the test (seconds) indicated greater muscle performance. Additionally, participants filled out the Beck Depression Inventory-II, the State-Trait Anxiety Inventory, and Pain Catastrophizing Scale to assess depression, anxiety, and pain catastrophic thoughts, respectively. Greater scoring in questionnaires indicated worse psychological health.

Results: Linear regression analyses showed that higher endurance strength was associated with lower depression ($B=-0.060$; 95% confidence interval (CI)=-0.112, -0.009; $\beta=-0.224$, $p=0.021$), anxiety ($B=-0.065$; 95% CI =-0.120, -0.009; $\beta=-0.223$, $p=0.02$) and pain catastrophizing ($B=-0.073$; 95% CI=-0.128, -0.018; $\beta=-0.252$, $p=0.010$).

Conclusion: These findings suggest that greater endurance strength of the trunk flexor musculature was inversely associated with depression, anxiety, and pain catastrophizing. Future exercise interventions might determine if improving trunk muscle strength might be beneficial for mental health in patients with NSCLBP.

GOTAS DE EMULSIÓN DE PICKERING PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

A. Escribano-Huesca¹, C. Gila-Vílchez^{1,2}, A. León-Cecilla^{1,2}, G. R. Iglesias¹, M. T. López-López^{1,2}, L. Rodríguez-Arco^{1,2}.

¹Departamento de Física Aplicada, Universidad de Granada, Granada, España; ²Instituto de Investigación Biosanitaria ibs. GRANADA, Granada, España.

El diseño y construcción de gotas acuosas y microestructuras basadas en estas ha experimentado un notable progreso en las últimas décadas, ya que representa una prometedora vía de acceso a toda una nueva generación de materiales funcionales con aplicaciones en ingeniería tisular, terapias con células madre, biología reproductiva y terapia génica [1]. En particular, el uso de técnicas de microfluídica permite obtener gotas de un modo sencillo y barato, con altos índices de monodispersión y rendimiento [2]. Especialmente atractivas son la versatilidad y el elevado poder de encapsulación de estas gotas, capaces de confinar en su interior desde genes y células madre hasta fármacos y nanopartículas. Esto abre la posibilidad de crear espacios micrométricos controlables, dentro de los cuales se llevarían a cabo reacciones tales como catálisis enzimática, detección de analitos, cultivos celulares, formación de organoides o de nichos para células madre, etcétera [3]. Resulta particularmente interesante el empleo de gotas que, además de incorporar estas propiedades, sean sensibles a estímulos externos, como por ejemplo campos de fuerzas externas. En concreto, las gotas de emulsión de Pickering (i.e., estabilizadas por partículas sólidas que se adsorben en la interfase agua/aceite) permiten una selección de las nanopartículas que estabilizan la emulsión en función del tipo de respuesta que deseemos obtener de las gotas (electromagnética, térmica, sensibles al pH...). Además, estas gotas son más robustas que las estabilizadas por surfactantes [4]. En este trabajo, se prepararon gotas de emulsión de Pickering magnéticas (GEPM) agua en aceite estabilizadas por nanopartículas de magnetita, capaces de responder a campos magnéticos. Nuestro objetivo era utilizar tales gotas como micro-reactores que confinaran reacciones químicas a la vez que, valiéndonos de su sensibilidad a campos magnéticos, pudiéramos controlar su orientación y ordenamiento espacial de forma remota, así como inducir su calentamiento. En primer lugar, se evaluó la respuesta de las GEPM a estímulos magnéticos. Demostramos que era posible controlar la organización espacial de las GEPM mediante el uso de sellos magnéticos [5] en forma de cadenas alineadas con el campo externo. Dichas cadenas podían rotar bajo la aplicación de campos magnéticos rotativos. Por otra parte, pudimos generar calentamiento por inducción, llegando a alcanzar temperaturas de hasta 55°C mediante la aplicación de campos magnéticos alternos. Con objeto de estudiar su comportamiento como micro-reactores, se encapsuló glucosa-oxidasa (GOx) en el interior de las GEPM, haciendo uso de un precursor de gel basado en alginato de sodio como fase interna de las gotas para transferirlas desde el aceite a un medio acuoso externo donde generar una reacción enzimática basada en la descomposición de glucosa por la GOx, que libera peróxido de hidrógeno que es, a su vez, reducido por peroxidasa de rábano (PHR). El avance de esta reacción fue cuantificado en muestras que contenían GEPM y en muestras sin ellas. Finalmente, se prepararon gotas de emulsión con nanopartículas de sílice y con albúmina de suero bovino, siendo ambos sistemas métodos de encapsulación alternativos a las GEPM. El uso conjunto de estos últimos tipos de gotas no magnéticas y las GEPM nos permitiría aumentar considerablemente el alcance de las potenciales aplicaciones de estos sistemas.

1. Downs F.G., *et al. Nat. Chem.* 12, 363–371 (2020). 2. Feng, H., *et al. Electrophoresis* 40, 1580–1590 (2019). 3. Nazari, H., *et al. Biosensors* 12, 20 (2022). 4. Liu, Z., *et al. Adv. Mat.* 32, 2002932 (2020). 5. Yang, Z., *et al. Nat. Com.* 8, 1564 (2017).

LIGHT SCATTERING OF 3D-PRINTING DENTAL RESTORATIVE POLYMER-BASED MATERIALS: PRELIMINARY RESULTS

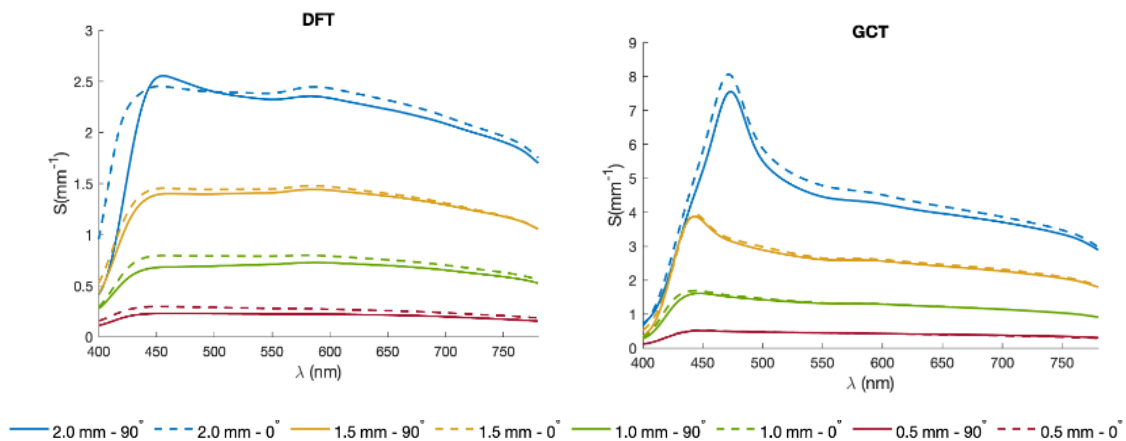
Espinar C.^{1,2,3} Tejada-Casado M.^{1,2}, Ruiz-López J.^{1,2}, Carrillo-Pérez F.^{2,4}, Cardona JC.^{1,2}, Ionescu AM.^{1,2}, Ghinea R.^{1,2}, Herrera LJ.^{2,4}, Pérez M.M.^{1,2}

¹ Biomaterials Optics Group, Department of Optics, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs, GRANADA, Granada, Spain; ³ Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Coleg ⁴ Department of Computer Architecture and Technology, University of Granada, C.I.T.I.C., Granada, Spain.

Objective: The main aim of this study was to apply the Kubelka-Munk model to evaluate the light scattering of 3D-printed dental restorative polymer-based materials.

Material and Methods: Specimens of 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0mm thick (n=3) of Freeprint® Temp (DETAX GmbH, Germany) and of GCT- GC TempPrint (GC Corporation, Tokyo, Japan) were manufactured using a DLP printer (Asiga Max UV 385) with a 62microns pixel resolution and 0° and 90° printing angle. Spectral reflectance was measured on white and black background using a spectroradiometer PR-670, CIE D65 illuminant and the CIE 45°/0° geometry. Light scattering coefficient (S) was calculated using Kubelka–Munk’s equations.

Results and Conclusions: Figure shows mean values of scattering coefficient (S) of thicknesses 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mm and the angle printed orientation of 0° and 90°:



The spectral scattering values of the 3D-printing significantly vary among thicknesses and among both types of 3D-printing dental resins analyzed. Understanding the optical behavior of 3D-printing dental restorative materials is essential to optimize their clinical performance.

Acknowledgements: The authors acknowledge funding support from the Junta de Andalucía, Spain: P20-00220.

EFICACIA DE LA APLICACIÓN TÓPICA DE CORTICOIDES EN LA REMINERALIZACIÓN DEL TEJIDO PULPAR. UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

Enrique Fernández-Romero¹, Michelle Pérez-Segura¹, Raquel Toledano¹, Anisa Amar-Zetouni¹, Manuel Toledano¹, Marta Vallecillo-Rivas¹.

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

Objetivos: El propósito de esta revisión sistemática fue comprobar la eficacia de la aplicación tópica de corticoides en la remineralización de los tejidos pulpaes para preservar su vitalidad y su función.

Fuentes, Selección de Estudios y Extracción de Datos: Se realizó una búsqueda exhaustiva de la literatura, tanto electrónica como manual, en *PubMed*, *MEDLINE*, *Embase*, *Scopus* y *Web of Science* para identificar estudios experimentales en los que se aplicó un corticoide en los tejidos dentales. Un total de 13 estudios fueron seleccionados para la extracción de datos. Se elaboró un diagrama de flujo, se confeccionaron tablas para extracción de variables principales y se evaluó la calidad metodológica y el riesgo de sesgo de los estudios incluidos mediante la guía RoBDEMAT. Tras la aplicación de corticoides se ha podido comprobar su poder remineralizante al ser aplicado bajo una dosis adecuada, ya que a dosis elevadas puede producir un efecto tóxico antagonista y reducir la osteogénesis/odontogénesis.

Conclusiones: El empleo de pruebas de laboratorio como la PCR para medir biomarcadores como la fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN), sialofosfoproteína (DSPP) o, por otro lado, tinciones como Rojo Alizarina para comprobar la formación de depósitos cálcicos, ha podido demostrar el gran poder remineralizante que presentan los corticoides aplicados a una dosis adecuada. Por consiguiente, sería interesante introducir un sistema en el material restaurador que libere progresivamente el corticoide y, de esta forma, evite la toxicidad que puede producir éste a altas concentraciones.

Significación Clínica: Actualmente existen diversos tratamientos para preservar la vitalidad y la función de la pulpa dental, entre ellos, la aplicación tópica de corticoides en tratamientos restauradores. El empleo, a bajas dosis, de corticoides como la dexametasona, la fluocinolona, betametasona y la prednisona sobre la pulpa dental ha demostrado favorecer la proliferación de las células de la pulpa dental (DPC), induciendo por tanto a la remineralización.

Agradecimientos: Este estudio está financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional [Proyecto PID2020-114694RB-I00].

EFFECTOS DEL BISFENOL S, BISFENOL F Y BISFENOL AF SOBRE LA SÍNTESIS DE FOSFATASA ALCALINA Y LA MINERALIZACIÓN DE OSTEOBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

Enrique García Recio*, Elvira de Luna Bertos*, Víctor Costela Ruiz*, Concepción Ruiz*

*: Grupo de Investigación TEC17-BIOTEJSALUD ibs.GRANADA

Los análogos del bisfenol A (BPA) han sido ideados para sustituir al BPA en la elaboración de productos de uso y consumo humano ante la prohibición y/o limitación de su uso, debido a que esta molécula posee actividad disruptiva endocrina y ejerce un efecto nocivo sobre la salud humana, incluida la salud ósea. El objetivo de este estudio es determinar el efecto de tres análogos del BPA sobre la síntesis de fosfatasa alcalina y la mineralización en osteoblastos humanos.

A partir de muestras de hueso de voluntarios sanos, se establecieron líneas de osteoblastos humanos por primo-cultivo. Estas células fueron cultivadas en presencia de BPF, BPS y BPAF a las dosis de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M durante 24 horas, para posteriormente analizar los niveles de fosfatasa alcalina mediante una técnica espectrofotométrica. El efecto sobre la mineralización se estudió siguiendo el método de la alizarina roja; para ello, las células se cultivaron en medio osteogénico que contenía las distintas dosis de los análogos del BPA. La formación de nódulos de calcio se analizó por espectrofotometría a los 7, 14 y 21 días. Como grupo control se emplearon células no tratadas.

El tratamiento con BPF y BPS a las dosis más elevadas ensayadas (10^{-5} y 10^{-6} M) mostró un descenso significativo en la síntesis de fosfatasa alcalina, enzima que actúa aumentando la concentración de calcio y fósforo a nivel de la matriz ósea. De igual modo, se inhibió la mineralización a los 21 días a las tres dosis ensayadas y de manera dosis dependiente, por disminución de la formación de nódulos de calcio. Sin embargo, el tratamiento con BPAF no produjo cambios significativos sobre los dos parámetros estudiados. A la vista de estos resultados sugerimos que BPS y BPF, al igual que el BPA, pueden tener una repercusión directa sobre la mineralización ósea, por lo que su presencia en el organismo podría estar relacionada con una mayor incidencia de lesiones y/o patologías óseas como la fragilidad ósea o la osteoporosis.

HISTOLOGICAL ASSESSMENT OF A NEW DECELLULARIZATION METHOD FOR PERIPHERAL NERVES. AN *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDY

Óscar Darío García-García^{1,2}, Marwa El Soury³, Jesús Chato-Astrain^{1,2}, David Sánchez-Porras^{1,2}, Paula Ávila-Fernández^{1,2}, Stefano Raimondo³, Giovanna Gambarotta³, Miguel Alaminos^{1,2}, Fernando Campos^{1,2}, Antonio Campos^{1,2}, Víctor Carriel^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; ³ Department of Clinical and Biological Sciences and Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), University of Torino, Orbassano, Italy.

Decellularized tissues could be useful in the treatment of complex organs such as peripheral nerve (PN), whose structure is difficult to reproduce using current biofabrication techniques. The goal of this study was to evaluate *in vitro* the efficiency of a novel chemical-enzymatic decellularization method (CE) for PN in comparison with the classical Sondell (SD) method, and to evaluate the *in vivo* regeneration potential of these PN.

Rat sciatic nerves were collected and decellularized using the novel CE protocol based on the detergents Triton X-100, SDS, SDC and an enzymatic digestion in DNase and RNase and the classical SD protocol consisting in two cycles of Triton X-100 and SDC (1). The *in vitro* characterization was carried out using histological, ultrastructural and DNA quantification analyses. Subsequently, CE and SD decellularized PN allografts were used to repair a 10-mm gap injury in the animal model. After 15 weeks of the surgery, the regeneration profile was evaluated using functional, histological and histomorphometrical tests.

Histologically, our results showed that CE was associated to more adequate preservation of the stromal pattern of decellularized PN, as compared with SD. Furthermore, DAPI staining showed residual nuclear material in SD compared to CE ($p < 0.05$). Besides, TEM and SEM ultrastructural analyses showed that CE presented a higher preservation of the collagen pattern than SD and an efficient removal of the myelin content in both acellular substitutes. The *in vivo* assessment revealed a better degree of sensory and functional recovery (motor and sensory) in CE respect to SD and comparable but not superior to the AUTO group. These results were in line with the histological analysis showing a more abundant remyelination pattern (MCOLL), Schwann cells (S-100) and mature axons (neurofilament) in CE and AUTO respect to SD. Additionally, histomorphometrical analysis showed that CE had significantly superior results ($p < 0.05$) in density and fiber total number to the classic SD group, being comparable to AUTO group ($p > 0.05$). However, the new axon and fiber generated did not acquire the pre-injury diameter as expected.

This study revealed a more efficient decellularization obtained with the novel CE method that resulted in a superior functional, histological and histomorphometrical *in vivo* regeneration profile than the classical SD method, being comparable but not superior to the gold standard AUTO group. Finally, further investigations are still needed to evaluate the efficacy of this new neural substitute in longer nerve gap repair.

Supported by Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI20-0318, FIS PI17-0393 and FIS PI14-1343. Supported by grant P18-RT-5059 from PAIDI 2020, Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía, España. Supported by grant A-CTS-498-UGR18 from Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades. Cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the “Una manera de hacer Europa” program.

1. Sondell M., Lundborg G. and Kanje M. (1998). Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction Brain Res. 795(1-2):44-54

NANOPARTICLES DOPED WITH DEXAMETHASONE AND DOXYCYCLINE: A HISTOMORPHOLOGICAL ANALYSIS OF THE HYBRID LAYER THROUGH TRICHOME MASSON'S STAINING

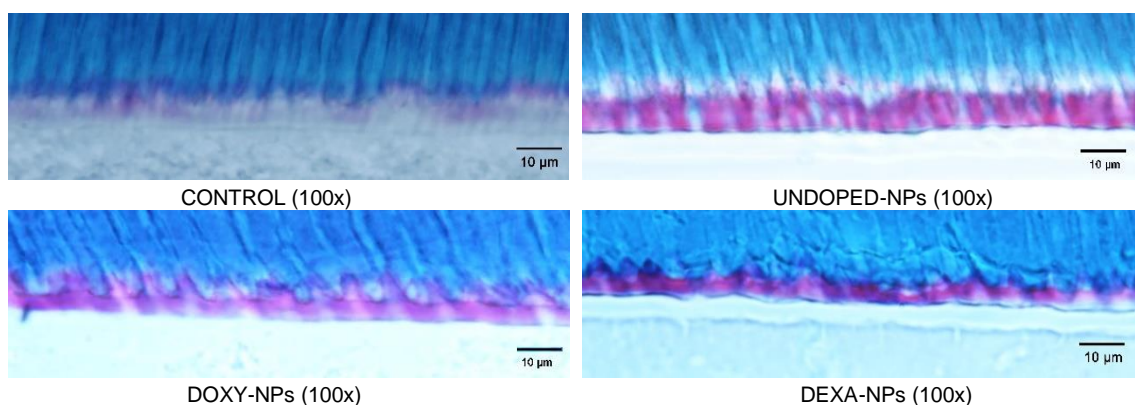
Macarena Garrido^{1*}, Enrique Fernández-Romero¹, Fátima S. Aguilera¹, Juan Francisco González-Fernández^{1*}, Manuel Toledano^{1,2}.

¹ Universidad de Granada, Facultad de Odontología; ² Instituto de Investigación Biosanitaria. Granada. * Estudiante de Grado.

Objective: To assess the hybrid layer histomorphology after using novel polymeric nanoparticles (NPs) doped with doxycycline (Doxy) and dexamethasone (Dex) after 24h of storage through trichrome Masson's staining.

Material and Methods: Previous to adhesive application three experimental polymeric nanoparticles were applied, a control group was added: Control (a), Undoped-NPs (b), Doxy-NPs (c) and Dexa-NPs (d). An etch-and-rinse adhesive system (Single Bond -SB-) was then applied and resin composite build-ups were performed incrementally. After 24h of PBS storage, resin-dentin bonded slabs of each group were used for the histomorphological evaluations. The medial aspect of each resin-dentin bonded slab was fixed in a glass holder with a photocuring adhesive and ground with SiC papers of increasing fine grits up to 4000 grits in a polisher until its thickness was approximately 10 µm. Slices were stained with Masson's trichrome for differentiation of resin and non-resin encapsulation of the exposed collagen. This dye has a high affinity for cationic elements of normally mineralized type I collagen, resulting in staining collagen green, and when demineralized, resulting in different coloration, generally red. Collagen coated with adhesive stains orange and pure adhesive appears beige. Slides with adherent stained sections were dehydrated through ascending ethanol and xylene. The sections were cover slipped and examined by light microscopy at different magnifications.

Results: Representative images are shown below.



Conclusions: Unprotected collagen is observed for all the groups. Specimens did not show remineralization, probably, due to the short time of storage (24h). However, hybrid layer is thicker in those groups where NPs were used, which can, potentially, be remineralized.

Acknowledgment: This work was funded by Grant PID2020-114694RB-I00 funded by MCIN/AEI 10.13039/501100011033.

MODELO EXPERIMENTAL DE INJERTO ÓSEO VASCULARIZADO EN RATA

Adoración Garzón Alfaro^{1,2}, Enrique Jiménez Herrero¹, Natividad Martín Morales^{2,3}, Pablo Galindo Moreno^{2,4}, Francisco O'Valle^{2,3}, Pedro Hernández Cortés^{1,2,5}

¹ Unidad de Cirugía de Mano y Miembro Superior del Servicio COT del Hospital Universitario Clínico San Cecilio. Granada; ² Instituto Biosanitario de Granada; ³ Departamento de Anatomía Patológica. Universidad de Granada; ⁴ Departamento de Odontología. Cirugía Oral e Implantología. Universidad de Granada; ⁵ Departamento de Cirugía y sus Especialidades. Universidad de Granada.

Se entiende por defecto óseo crítico como aquel que no “curará” de forma espontánea en toda la vida del animal que lo padece, y el tamaño no es el único factor condicionante. Los grandes defectos óseos en el humano se deben principalmente a traumatismos de alta energía, el desbridamiento de infecciones osteoarticulares, la resección de tumores musculoesqueléticos y la osteólisis periimplantes ortopédicos.

Muchos tratamientos han sido propuestos para la reconstrucción, pero en la práctica el autoinjerto óseo libre es el “gold standart”. Sin embargo, es insuficiente en defectos de gran tamaño y sobre lechos con malas condiciones biológicas (isquemia, infección). En estas circunstancias, se ha propuesto entre otras alternativas el injerto óseo vascularizado.

La biología de la incorporación de injertos óseos vascularizados es completamente diferente a la de los autoinjertos libres y aloinjertos. El estudio a nivel celular y molecular de los injertos vascularizados es una valiosa vía para progresar en la ciencia de la reparación y reconstrucción ósea.

Se presenta un modelo experimental de injerto óseo vascularizado en rata basado en la rama tibial de la arteria poplítea, que nos parece fácil y reproducible, para el estudio de la biología de la reconstrucción ósea.

Es preciso un modelo adecuado para estudiar la biología de la curación de los trasplantes óseos vascularizados. En animales grandes como el perro se han descrito diferentes modelos satisfactorios, pero no es frecuente su realización en rata. Mizumoto y cols, describieron un modelo sobre la pata trasera de la rata, que nosotros hemos modificado para evitar la necesidad de anastomosis vascular microquirúrgica y aumentar la probabilidad de la perfusión ósea y sin comprometer la vascularización de la extremidad. Aunque parezca poco “fisiológico”, porque se anula la “rodilla” y la pata trasera se fija en extensión, el animal puede realizar apoyo inmediato. Además, como no se actúa sobre los nervios periféricos, no hemos visto lesiones de automutilación

1. Khan SN, et al. The biology of bone grafting. J Am Acad Orthop Surg. 2005.
2. Nauth A, et al. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? J Orthop Trauma. 2018.
3. Mizumoto S, et al. Experimental study of vascularized tibiofibula graft in inbred rats: a preliminary report. J Reconstr Microsurg. 1986.
4. Shigetomi M, et al. Experimental study on vascularized bone allografts for reconstruction of massive bone defects. Microsurgery. 1994.
5. Tamai S. Experimental vascularized bone transplantations. Microsurgery. 1995.

DESIGN OF A MODULAR CLEANROOM FOR THE GENERATION OF BIOARTIFICIAL HUMAN TISSUES AS ADVANCED THERAPIES MEDICINAL PRODUCTS

Ingrid Garzón^{1,2}, Miguel Ángel Martín-Piedra^{1,2}, Óscar Darío García-García^{1,2}, Jesús Chato-Astrain^{1,2}, Cristina Blanco-Elices^{1,2}, Paula Ávila-Fernández¹, David Sánchez-Porras^{1,2}, Ricardo Fernández-Valadés^{1,2,3}, Víctor Carriel^{1,2}, Antonio Campos^{1,2}, Miguel Alaminos^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs.GRANADA, Granada, Spain; ³ Division of Pediatric Surgery, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

Tissue engineering allows the treatment of severe human diseases using bioartificial tissues able to reproduce the histological structure of native human tissues. Although numerous models of bioengineered human skin have been developed to the date, the current regulatory frame makes necessary that bioartificial skin be generated in a GMP facility or cleanroom fulfilling all requirements of advanced therapies medicinal products (ATMP) (1). However, GMP facilities are not available at most hospitals and institutions, and their creation and maintaining are complex and costly. Here, we describe a modular GMP facility that can be easily transported to specific locations requiring this type of laboratories for temporal use.

We have designed a self-contained, modular GMP facility containing all the required areas of this type of premises. The environment should be controlled inside the facility, and the whole system should allow easy mobility or reconfiguration. The system should be totally self-sufficient and autonomous.

Our results show that this type of facilities can be designed to be totally autonomous. A first room has been designed to contain several rooms inside the self-supporting structure. The first rooms correspond to areas of issuing and reception areas, as well as preparation room. These rooms connect with SARS allowing direct communication with the inner clean rooms. Then, we designed an entrance room including changing areas and semiclean rooms. These areas are connected with a clean aisle giving rise to three production laboratories containing benches, centrifuges, incubators and culture hoods. All the system is ventilated using specific filters allowing the air quality required for A, B and C areas.

This modular cleanroom is autonomous, but contains all the required areas for the generation of ATMP for clinical use. Modular cleanrooms provide many advantages to the pharmaceutical industry in terms of mobility, easy construction and reduction of the costs required for a classical GMP facility. This compact cleanroom could allow the generation of bioartificial substitutes of the human skin fulfilling all requirements of the Spanish Medicines Agency.

Supported by grants PE-0395-2019 and PI-0442-2019 from Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain. Supported by grant B-CTS-450-UGR20 (Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the “Una manera de hacer Europa” program.

1. Rico-Sánchez L, et al. Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea. J Tissue Eng Regen Med. 2019 Dec;13(12):2142-2154

INFLUENCIA DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS EN LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE HIDROGELES MAGNÉTICOS DE ALGINATO

Mariusz Barczak¹, Cristina Gila-Vilchez^{2,3}, Miguel Alaminos^{3,4}, Modesto T. Lopez-Lopez^{2,3}

¹ Department of Theoretical Chemistry, Institute of Chemical Sciences, Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University, 20031, Lublin, Polonia; ² Universidad de Granada, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, 18071, Granada, España; ³ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, España; ⁴ Universidad de Granada, Departamento de Histología, Grupo de Ingeniería Tisular, Granada, España.

A la hora de sintetizar hidrogeles magnéticos con aplicaciones biomédicas, la correcta funcionalización de las partículas magnéticas es de vital importancia [1]. Aun así, en los trabajos de investigación más representativos sobre hidrogeles magnéticos, las partículas magnéticas suelen usarse tal y como se reciben, es decir, sin ninguna funcionalización. Sin embargo, la superficie de las mismas se puede utilizar para crear interacciones con los hidrogeladores [2], que a su vez pueden afectar a las propiedades finales de los hidrogeles resultantes e incluso proporcionar una mejor biocompatibilidad. Además, las partículas magnéticas con una superficie química adecuada pueden conjugar fármacos, proteínas, enzimas o anticuerpos, lo cual se requiere en numerosas aplicaciones biomédicas.

En este trabajo [3] se determinó el papel que juega la funcionalización de la superficie de partículas de hierro en las propiedades finales de hidrogeles magnéticos de alginato. Para ello, se tomaron como punto de partida partículas de hierro micrométricas recubiertas por una capa de sílice. Estas partículas control se funcionalizaron posteriormente con diferentes grupos funcionales que incluían hidroxilo, amina, glicidoxi, fenilo y tiocianato. Las distintas funcionalizaciones contribuyeron a la aparición de diversas interacciones químicas con la matriz polimérica del hidrogel, afectando a sus propiedades mecánicas y biocompatibilidad.

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

[1] A. B. Bonhome-Espinosa *et al.* 2017 *Soft Matter* 13(16), 2928–2941.

[2] E. Tanasa *et al.* 2019 *Nanomaterials* 9(10), 1384.

[3] M. Barczak *et al.* 2020 *Carbohydrate Polymers* 247, 116747.

EFECTO DEL HIDROXITIRO SOL PRESENTE EN EL ACEITE DE OLIVA SOBRE FIBROBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO EN UN AMBIENTE INFLAMADO

Anabel González-Acedo¹, Lucía Melguizo Rodríguez¹, Javier Ramos-Torrecillas¹, Rebeca Illescas-Montes¹, Concepción Ruiz¹, Olga García-Martínez¹

1. TEC17-BIOTEJSALUD, Departamento de Enfermería, Universidad de Granada.

Introducción: La inflamación es la primera fase del proceso de cicatrización cuya principal función es la de neutralizar cualquier agente tóxico y restablecer la homeostasis de los tejidos. El proceso de cicatrización puede verse favorecido por diversos agentes naturales, como el hidroxitiro sol (htyr), principal compuesto antiinflamatorio del aceite de oliva.

Objetivo: determinar el efecto del htyr sobre distintos parámetros de fibroblastos en cultivo, en un modelo de herida inflamada *in vitro*.

Metodología: La línea de fibroblastos CCD-1064Sk fue cultivada en presencia de IL-1 β , IL-6 y TNF- α durante 24h, para crear un ambiente inflamatorio y, posteriormente, tratada con htyr a las concentraciones de 10⁻⁵M y 10⁻⁶M. La capacidad proliferativa se determinó mediante MTT y la migración celular mediante la técnica del scratch a las 4, 8, 12 y 24h del tratamiento, incluyendo en todos los casos células no tratadas como grupo control.

Resultados: los ensayos demostraron un incremento significativo de la capacidad proliferativa de los fibroblastos tras la aplicación de htyr en todas las dosis estudiadas. Estos resultados fueron acompañados de un incremento de la migración celular, que fue significativo a las 24 horas de tratamiento (Fig. 1).

Conclusión: Nuestros datos sugieren que el htyr es capaz de promover el crecimiento y migración de los fibroblastos incluso en un ambiente inflamado, lo que lo convierte en un compuesto bioactivo alternativo en el cuidado y tratamiento de las heridas.

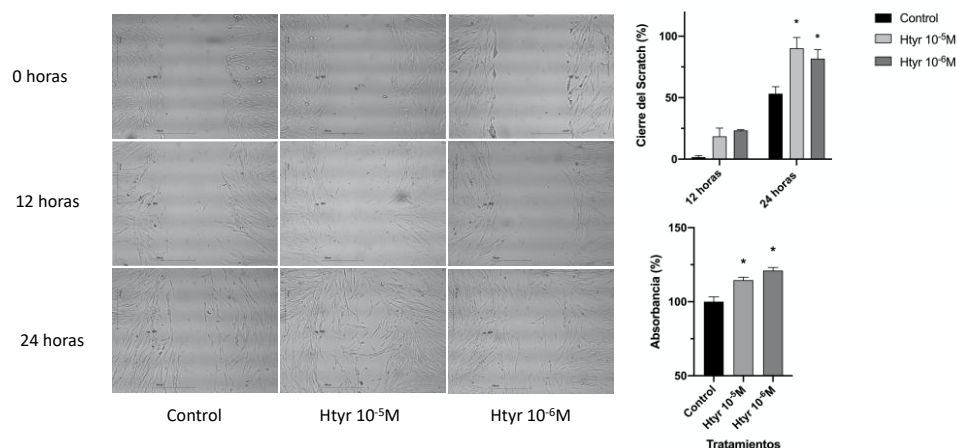


Figura 1. Resultados de los ensayos de proliferación y migración celular tras los tratamientos con htyr a las dosis 10⁻⁵M y 10⁻⁶M.

POLYMERIC NANOPARTICLES DOPED WITH DOXYCYCLINE AND DEXAMETHASONE: A NANOLEAKAGE ASSESMENT OF RESIN-DENTIN INTERFACES USING CONFOCAL LASER MICROSCOPY

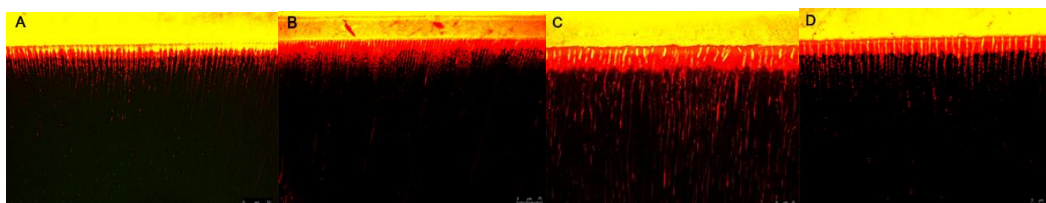
Juan Francisco González-Fernández^{1, *}, Marco Bonilla-Izquierdo^{1, *}, Pedro Solís-Cruz^{1, *}, Fátima S. Aguilera¹, Enrique Fernández-Romero¹, Manuel Toledano^{1,2}.

¹ Universidad de Granada, Facultad de Odontología; ² Instituto de Investigación Biosanitaria. Granada. * Estudiante de Grado.

Objective: To analyze the nanoleakage of resin-dentin sound interfaces after using novel polymeric nanoparticles (NPs) doped with doxycycline (Doxy) and dexamethasone (Dex) on confocal laser microscopy (CLSM) after 24h of storage.

Material and Methods: Previous to adhesive application three experimental polymeric nanoparticles were applied, a control group was added: Control (A), Undoped-NPS (B), Doxy-NPs (C) and Dexa-NPs (D). An etch-and-rinse adhesive system (Single Bond -SB-) was then applied and resin composite build-ups were performed incrementally, bond resin was doped with 0.05 wt% rhodamine-B. Teeth were stored in PBS for 24 h. The pulpal chamber of the specimens was filled with 1 wt% aqueous/ethanol fluorescein for 3 h. Specimens were copiously rinsed with water and treated in an ultrasonic water bath for 2 min. The specimens were cut in resin-dentin slabs and polished using ascending grit SiC abrasive papers on a water-cooled polishing device. A final ultrasonic cleaning (5 min) concluded the specimen preparation. Analysis of bonded interfaces were performed by dye-assisted confocal microscopy evaluation, using a confocal laser scanning microscope equipped with x60 lenses. As resins were doped with rhodamine, resin diffusion and hybrid layer morphology were executed using rhodamine excitation laser. Rhodamine emits red in color. Fluoresceine emits green/yellow. Optical images were randomly captured from each resin-dentin interface, and micrographs representing the most common features of nanoleakage observed along the bonded interfaces were selected.

Results: The images obtained are shown below.



Conclusions: Permeability occurred, more evidently, in specimens in which nanoparticles were not infiltrated. Dentin remineralization, as such, at the bottom of the hybrid layer, was not observed in the study groups, probably due to the short time of analysis (24 h). Nevertheless, after microscopy analysis, calcium deposition was apparently facilitated in samples where nanoparticles were applied, as porosity and nanoleakage were less observed.

Acknowledgment: This work was funded by Grant PID2020-114694RB-I00 funded by MCIN/AEI 10.13039/501100011033.

CHARACTERIZATION AND THERAPY IN A MODEL OF FATAL MITOCHONDRIAL ENCEPHALOPATHY: THE ROLE OF THE NEUROINFLAMMATORY RESPONSE AND THE Q-JUNCTION

Pilar González-García¹, M. Elena Díaz-Casado¹, Agustín Hidalgo-Gutiérrez¹, Laura Jiménez-Sánchez², Eliana Barriocanal-Casado¹ and Luis C. López¹

¹Departamento de Fisiología, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain; ²Ibs.Granada, Spain

Defects in Coenzyme Q (CoQ) metabolism have been associated to primary mitochondrial disorders, neurodegenerative diseases and metabolic conditions. The consequences of CoQ deficiency have not been fully addressed, and the therapeutic approaches remain challenging. Here, we carried out multi-omics, molecular and morphologic analyses and demonstrate that CoQ deficiency induces reactive gliosis, which mediates a neuroinflammatory response, both leading to a fatal encephalopathic phenotype in the *Coq9*^{R239X} mouse model. Also, CoQ deficiency profoundly alters the Q-junction, which lead to a major remodelling of the mitochondrial proteome and metabolism in the kidneys, and to a lesser extent in the brain. Importantly, the treatment with either vanillic acid (VA) or β -resorcylic acid (β -RA), two analogs of the natural precursor for CoQ biosynthesis, partially restores CoQ metabolism, particularly in the kidneys, and induce a profound normalization of the mitochondrial proteome and metabolism, ultimately leading to the reduction of gliosis, neuroinflammation and spongiosis and, consequently, rescuing the phenotype. Altogether, these results add key mechanistic insights about defects in CoQ metabolism, and identify potential disease biomarkers. Furthermore, our findings are not only important for the use of analogs of the CoQ biosynthetic precursor in the treatment of mitochondrial encephalopathies associated with CoQ deficiency but also for the therapeutic use of those compounds in more common neurodegenerative and metabolic diseases that occur with secondary CoQ deficiency.

MULTI-OMIC STRATEGIES FOR MALE INFERTILITY RESEARCH

Sara González-Muñoz^{1,2}, Andrea Guzmán-Jiménez^{1,2}, Miriam Cerván-Martín^{1,2}, M. Carmen Gonzalvo^{2,3}, Ana Clavero^{2,3}, José A. Castilla^{2,3,4}, Lara Bossini-Castillo^{1,2}, Rogelio J. Palomino-Morales^{2,5}, F. David Carmona^{1,2}

¹ Departamento de Genética e Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Granada, Spain. ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. ³ Unidad de Reproducción, UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Granada, Spain. ⁴ CEIFER Biobanco – NextClinics, Granada, Spain. ⁵ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada, Granada, Spain.

Infertility represents a growing socio-economic concern that affects around 50 million couples worldwide, being around half of the cases related with a male factor. Male infertility can be due to either obstructive or non-obstructive causes of the post-testicular tract. A severe spermatogenic failure (SPGF) might cause non-obstructive male infertility by reducing the number of spermatozoa in the ejaculate. Some patients of SPGF can father a biological child by testicular sperm extraction (TESE) from a testis biopsy and subsequent intracytoplasmic sperm injection (ICSI). However, a successful outcome of TESE highly depends on the degree of histological abnormalities in the testis, which are determined by a histological pathology analysis of the testis sample. Consequently, some patients of SPGF undergo unnecessary surgeries because of the lack of effective non-invasive markers of TESE outcome.

There are several known genetic causes of SPGF, including karyotype anomalies, such as Klinefelter syndrome, microdeletions in azoospermia factor (AZF) regions in the Y-chromosome, and point mutations in key genes for testis development and function. However, in only 20% of infertile men due to SPGF a genetic cause can be established, being the infertility of the remaining cases defined as idiopathic (unexplained). Growing evidence suggests that part of this idiopathic form of SPGF may represent a complex disease, in which both environmental and genetic factors contribute to its predisposition. In this sense, common variants in the genome, especially single nucleotide polymorphisms (SNPs), are likely to affect the complex molecular network that controls the spermatogenic process, thus potentially contributing to the pathological mechanisms underlying male infertility. In the last decades, the development of the so-called multi-omic or systems biology approaches such as the genome-wide association studies (GWASs) in the genomics field and the single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) in transcriptomics field, has allowed a considerable progress in the research of a wide variety of complex diseases. With regards to male infertility, only a few genes associated with SPGF have been identified to date through the GWAS strategy, though most of these genetic associations have not been replicated in independent populations nor have the histological patterns been analyzed. Moreover, the knowledge about the transcriptome characteristics of the testis and the ejaculate of infertile men due to SPGF is very limited, as only a few cells and biopsies of SPGF patients have been characterized.

Taking all the above into consideration, one of the main goals of our group is to address the study of male infertility due to SPGF by integrating genomic and transcriptomic data for the different subclinical entities of SPGF. We aim to identify 1) the molecular determinants of this condition, 2) the affected cell types, and 3) the specific stages of spermatogenesis in which the differentiation of germ cells is compromised. Our published and preliminary results support that the knowledge generated with these approaches could help to establish the bases for the development of accurate diagnostic markers of this form of male infertility and prognostic markers for the probability of success in TESE.

TEX15 GENETIC VARIANTS INCREASE THE SUSCEPTIBILITY TO DEVELOP SEVERE NON-OBSTRUCTIVE OLIGOZOOSPERMIA

Andrea Guzmán-Jiménez^{1,2,*}, Sara González-Muñoz^{1,2,*}, Miriam Cerván-Martín^{1,2}, Rocío Rivera-Egea^{3,4}, Nicolás Garrido^{4,5}, Saturnino Luján⁵, Samuel Santos-Ribeiro^{6,7}, IVIRMA Group⁸, Lisbon Clinical Group⁸, José A. Castilla^{2,9,10}, M. Carmen Gonzalvo^{2,9}, Ana Clavero^{2,9}, F. Javier Vicente^{2,11}, Vicente Maldonado¹², Javier Villegas-Salmerón¹, Miguel Burgos¹, Rafael Jiménez¹, Maria Graça Pinto¹³, Isabel Pereira¹⁴, Joaquim Nunes¹⁴, Josvany Sánchez-Curbelo¹⁵, Olga López-Rodrigo¹⁵, Iris Pereira-Caetano¹⁶, Patricia Isabel Marques^{17,18}, Filipa Carvalho^{17,19}, Alberto Barros^{17,19}, Lluís Bassas¹⁵, Susana Seixas^{17,18}, João Gonçalves^{16,20}, Alexandra M. Lopes^{17,22}, Sara Larriba²¹, Rogelio J. Palomino-Morales^{2,23}, F. David Carmona^{1,2,¶}, Lara Bossini-Castillo^{1,2,¶}.

¹ Departamento de Genética e Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; ³ Andrology Laboratory and Sperm Bank, IVIRMA Valencia, Valencia, Spain; ⁴ IVI Foundation, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain; ⁵ Servicio de Urología, Hospital Universitari i Politecnico La Fe e Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain; ⁶ IVI-RMA Lisbon, Lisbon, Portugal; ⁷ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal; ⁸ See "Group authors lists"; ⁹ Unidad de Reproducción, UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ¹⁰ CEIFER Biobanco—NextClinics, Granada, Spain; ¹¹ UGC de Urología, HU Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ¹² UGC de Obstetricia y Ginecología, Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Spain; ¹³ Centro de Medicina Reproductiva, Maternidade Alfredo da Costa, Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, Lisboa, Portugal; ¹⁴ Departamento de Obstetricia, Ginecologia e Medicina da Reprodução, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Norte, Lisboa, Portugal; ¹⁵ Laboratory of Seminology and Embryology, Andrology Service-Fundació Puigvert, Barcelona, Spain; ¹⁶ Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal; ¹⁷ i3S—Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal; ¹⁸ Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal; ¹⁹ Serviço de Genética, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal; ²⁰ ToxOmics—Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, Nova Medical School, Lisbon, Portugal; ²¹ Human Molecular Genetics Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ²² CGPP-IBMC – Centro de Genética Preditiva e Preventiva, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal; ²³ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada, Granada, Spain; * These authors share first authorship. ¶ These authors share last authorship.

Infertility is a growing health concern affecting more than 50 million couples of childbearing age, with the male factor contributing in approximately 50% of cases. Severe spermatogenic failure (SPGF) represents the most severe expression of this condition as it can lead to extreme abnormalities in the seminal sperm count, such as severe oligozoospermia (SO) or non-obstructive azoospermia (NOA). Most cases of SPGF have an unknown aetiology and there is growing evidence that supports that this condition represents a complex trait where the accumulation of common risk variants increases the genetic predisposition of certain individuals to undergo pathogenic conditions in the testis. In this study, we aimed to evaluate whether common genetic variation in *TEX15*, which is one of the main regulators of spermatogenesis, is involved in the susceptibility to develop idiopathic SPGF.

We designed a case-control genetic association study comprising a total of 727 SPGF cases (including 527 NOA and 200 SO) and 1,058 unaffected men from the Iberian Peninsula. Following a tagging strategy, three tag single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the *TEX15* locus (rs1362912, rs323342, and rs323346) were selected for genotyping using TaqMan probes. Subsequent statistical association tests and *in silico* analyses, to analyse the putative functional implications of the studied variants, were performed.

The allelic and genotype distributions of *TEX15*-rs1362912 showed statistically significant differences between a group of Iberian men affected by SO and both the group of fertile controls (OR=1.90, P=7.47E-03; P=1.14E-02) and the group of NOA patients (OR=1.83, P=1.23E-02; P=4.33E-02). The analysis of the functional annotations in the human genome revealed that the pathogenic effect of the SO-associated *TEX15* variants might involve subtle changes in the binding affinity of spermatogenesis-related transcription factors to the regulatory regions of *TEX15*.

Determining the genetic causes that lead to a specific type of male infertility is fundamental to provide the most suitable clinical management strategies to those patients who wish to conceive biological children, as well as for identifying gametes carrying pathogenic variants in order to increase fertilisation success rates.

HIPONEUROTIZACIONES SELECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ESPASTICIDAD POSTICTUS

Patricia Hurtado Olmo^{1,2}, Ángela González Santos², Marta Gámez Muñoz¹, Laura del Olmo Iruela³, Lurdes Zuñiga Gómez³, Pedro Hernández Cortés^{1,2,4}

¹ Unidad de Cirugía de Mano y Miembro Superior del Servicio COT del Hospital Universitario Clínico San Cecilio. Granada; ² Instituto Biosanitario de Granada; ³ Servicio de Rehabilitación del Hospital Universitario Clínico San Cecilio. Granada; ⁴ Departamento de Cirugía y sus Especialidades. Universidad de Granada.

Recientemente, se ha introducido una nueva filosofía en el tratamiento quirúrgico del miembro superior espástico, que en vez de enfocarse hacia las manifestaciones secundarias en músculo, tendón y articulación, incide sobre la causa primaria de la espasticidad: “el nervio”, y se han propuesto procedimientos de hiponeurotización o neurectomías supraselectivas de los músculos espásticos.

Objetivo. Presentar una de las técnicas quirúrgicas que empleamos para rehabilitar a los pacientes con secuelas de ictus en el miembro superior en el contexto del ensayo clínico: Cirugía vs Toxina Botulínica en la calidad de vida del paciente con Ictus. Ensayo Aleatorizado. PI20/01574

Caso Clínico.

Paciente de 54 a de edad, con antecedentes de ictus isquémico y secuela de hemiplegía espástica izquierda, que presenta deformidad en flexión del codo, pronación, extensión de muñeca, flexión de los dedos y pulgar alojado en la palma, con interferencia en la función e higiene de la mano. Tras bloqueo anestésico ecoguiado del nervio mediano por encima del codo se observa la extensión pasiva de los dedos, pero no las articulaciones metacarpofalángicas (por espasticidad de la musculatura intrínseca dependiente del nervio cubital. Tras un segundo bloqueo anestésico, ahora del nervio cubital, se consigue la extensión ACTIVA de toda la cadena digital.

El tratamiento que se realiza es: 1. Deformidad en flexión del codo: Hiponeurotización (neurectomía selectiva de $\frac{3}{4}$ de los filetes nerviosos que entran al músculo) del Nervio Musculocutáneo en el brazo para el bíceps y el braquial anterior. 2. Deformidad en extensión de muñeca: Hiponeurotización de la rama motora para Extensor Carpi Radialis Longus. 3. Deformidad en flexión de los dedos: Neurectomía selectiva de la rama motora del nervio cubital para la musculatura intrínseca de la mano. Todos las neurectomías se realizan bajo control de neuroestimulación intraoperatoria para comprobar que queda actividad muscular suficiente tras la neurectomía.

Resultado. Las hiponeurotizaciones selectivas y supraselectivas disminuyen de forma efectiva la espasticidad de los músculos tratados, sin comprometer la función de los mismos. En ocasiones, es suficiente para equilibrar agonistas y antagonistas y obtener mejoras funcionales. La recidiva de la espasticidad (fenómeno de Adopción de Brunelli) y alteraciones sensitivas son los mayores riesgos.

1. Brunelli G, Brunelli F. Partial selective denervation in spastic palsies (hyponeurotization). Microsurgery. 1983.
2. Leclercq C. Selective Neurectomy for the Spastic Upper Extremity. Hand Clin. 2018
3. Leclercq C, et al. Hyperselective neurectomy for the treatment of upper limb spasticity in adults and children: a prospective study. J Hand Surg Eur Vol. 2021.

EMPLEO DE QUITOSANO EN LA FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA FINES TERAPÉUTICOS

Marta Ibáñez-Vergara¹, Juan Rodríguez¹, Marisol Zurita¹, Ana Medina¹, José L Arias^{1,2,3}

¹ Departamento de Farmacia y tecnología farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18011 Granada, España; ² Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIMB), Universidad de Granada, 18016 Granada, España; ³ Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Universidad de Granada, 18012 Granada, España.

Las aplicaciones de quitosano (CS) son muy amplias y abarcan desde la preparación de implantes y lentes oculares a cicatrización de heridas e ingeniería tisular¹. Se trata de un polisacárido que reúne características fisicoquímicas que lo hacen idóneo para su uso en el área sanitaria, concretamente, para el empleo como transportador de agentes terapéuticos. Sus propiedades postulan su potencial utilidad como alternativa al polietilenglicol (PEG) en la síntesis de nanopartículas (NP) de largo tiempo de circulación (*stealth* NPs). La presente revisión bibliográfica pretende constatar la actual situación de esta aplicación prometedora en nanotecnología farmacéutica.

En la búsqueda bibliográfica se ha empleado como base de datos PubMed y, como palabras clave *chitosan; nanoparticles; drug delivery; pharmaceuticals*. Respecto a criterios de selección, se escogieron artículos publicados en los últimos 15 años relacionados con estudios *in vitro*, obteniéndose 1769 resultados, de los cuales fueron seleccionados finalmente 39 artículos.

El CS es un biopolímero que ha demostrado aportar estabilidad al coloide en cuyo diseño es utilizado. Esto se debe a que forma una cubierta positivamente cargada e hidrófila que disminuye el proceso de opsonización previo a la fagocitosis por el sistema fagocítico mononuclear (SFM)². Así mismo, este recubrimiento favorece interacciones con las células diana y aporta biocompatibilidad a la NP³. Gracias a las propiedades de la cubierta que forma, permite la unión a mucoproteínas cargadas negativamente, incrementando la acumulación en el lugar diana del agente terapéutico que transporta. También proporciona la capacidad de liberar fármacos desencadenado por el pH de la célula diana dada su solubilidad a pH ácido⁴. Esta característica ha sido aprovechada en el tratamiento del cáncer, teniendo en cuenta que lisosomas, intersticio tumoral y células tumorales presentan un pH ácido. Con todo esto, es empleado como sustituto de interés del PEG a la hora de funcionalizar dichas NPs.

Lo expuesto demuestra que el CS es una alternativa prometedora en la funcionalización de NPs con fines terapéuticos al mejorar su estabilidad *in vitro* evitando la agregación de estas⁵ e *in vivo*, retrasando su reconocimiento por el SFM, además de favorecer la acumulación del agente terapéutico en el lugar de acción⁶ y aportar biocompatibilidad a la NP.

Agradecimientos: Instituto de Salud Carlos III (PI19/01478) (FEDER), Programa Operativo FEDER de Andalucía 2014-2020 (Junta de Andalucía, I+D+i A1-FQM-341-UGR18); y el Programa de Ayudas a proyectos I+D+i destinadas a Universidades y Entidades Públicas de Investigación (Junta de Andalucía, PY20_00346).

1. Rizeq, B.R., Younes, N.N., Rasool, K. y cols 2019. Int J Mol Sci. 20(22):5776.
2. Fernández-Álvarez, F., Caro, C., García-García, G. y cols. 2021. J. Mater. Chem. B 9, 4963–4980.
3. Vásquez Marcano, R.G.D.J., Tominaga, T.T., Khalil, N.M. y cols. 2018. Carbohydr. Polym. 202, 345–354.
4. Fernández-Álvarez, F., García-García, G., Arias, J.L., 2021. Pharmaceutics 13, 1232.
5. Laurent, S., Forge, D., Port, M. y cols. 2010. Chem. Rev. 110(4):2574–2574.
6. Arias, J.L. 2011. Mini Rev Med Chem. 11(1):1–17.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INTERNALIZACIÓN CELULAR DE NANOPARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS EN TERAPIAS DE FOTOTERMIA

G.R.Iglesias*, P.Lupiañez, M.Lázaro, P.J. Garcia-Vargas, F. Oltolina, C. Jiménez-Lopez, M. P. Carrasco Jiménez

Departamento de Física Aplicada e Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA. NanoMag Laboratory Edificio I+D Josefina Castro Avenida de Madrid, nº 19, 18071. Granada, España. iglesias@ugr.es

Las nanopartículas magnéticas biomiméticas (BMNP) consisten en una innovadora herramienta para tratar de manera eficaz el cáncer, ya que se comportan como agentes de calentamiento bajo la irradiación láser (NIR), técnica denominada fototermia [1, 2]. Sin embargo, aún no está claro si, para que la terapia sea eficiente, las BMNP deben ser totalmente internalizadas por las células.

En este trabajo, se han simulado tres situaciones diferentes de captación celular de BMNPs (BMNPs intracelulares, BMNPs extracelulares y BMNPs intra + extracelulares) y se estudió la viabilidad celular de hepatoblastoma humano (HepG2) con suspensiones de BMNPs después de aplicar fototermia.

Como resultado, se observó que las células HepG2 que contienen sólo BMNPs intracelulares muestran un 26% de viabilidad celular tras el tratamiento de fototermia, mientras que las que contienen sólo BMNPs extracelulares (a idéntica concentración) muestran un 93% de viabilidad celular. Cuando se aumenta la cantidad de Fe (concentración de BMNP = 2,5 mg/mL, para los Grupos 3 y 4), la viabilidad de las células HepG2 después de la exposición al láser disminuye al 10 % para el Grupo 3 y al 29 % para el Grupo 4.

Estos resultados sugieren que la internalización celular de nanopartículas es un factor muy importante a tener en cuenta en tratamientos de fototermia. A mayor captación celular de BMNP, mayor será el efecto buscado.

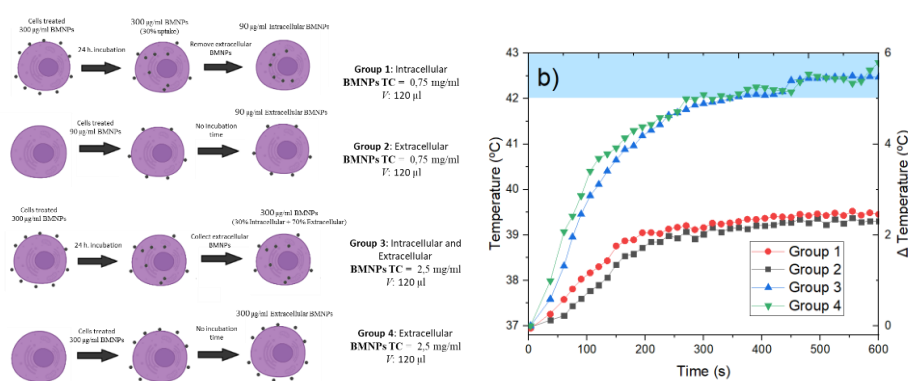


Figura 1. (Izquierda) Diferentes situaciones/grupos de captación celular con BMNP. (Derecha) Aumento de temperatura en los diferentes grupos tratados con fototermia.

Agradecimientos: Junta de Andalucía and Ministerio de Economía y Competitividad, Programa FEDER 2014-2020. B-BIO-432-UGR20, B-CTS-216-UGR20, A-FQM-492-UGR20. Proyectos de I + D + I, del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación P20_00346, P20-00233. MINECO EC2019-005930-P, Instituto de Salud Carlos III (PI20-01658) e Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, España

[1] Y. Jabalera, A. Sola-Leyva, M.P Carrasco-Jiménez, G.R Iglesias, C. Jimenez-Lopez. *Pharmaceutics*, **13** (2021), 625.

[2] Y. Jabalera, S. Casares Atienza, A. Fernández-Vivas, A. Peigneux, A. I. Azuaga Fortes, and C. Jimenez-Lopez. *Cryst. Growth Des.*, **19** (2019), 1064–1071.

MODULACIÓN FENOTÍPICA DE ALFA-ACTINA Y FIBRONECTINA EN FIBROBLASTOS HUMANOS TRATADOS CON FITOQUÍMICOS DE LA GRANADA

Rebeca Illescas Montes¹, Anabel González Acedo², Lucía Melguizo-Rodríguez¹, Olga García Martínez¹, Concepción Ruiz¹, Javier Ramos Torrecillas¹

¹ Grupo TEC17-Biotejsalud. Instituto de Investigación Ibs.Granada; ² Grupo Biosanitario (BIO277). Departamento de Enfermería. Universidad de Granada.

Palabras clave: Alfa-Actina, Ácido Elágico, Fenotipo, Fibroblastos, Punicalagina.

Introducción: La alfa-actina y la fibronectina son proteínas con un rol importante en el fibroblasto implicado en el proceso de cicatrización. Su expresión está relacionada con la migración celular, la capacidad contráctil, así como la síntesis, remodelación y reparación de la matriz extracelular (ME). Por su parte, el ácido elágico y la punicalagina, fitoquímicos elagitaninos de la granada (*punica granatum*), están tomando gran relevancia científica en procesos de regeneración tisular, dadas sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas y antitumorales.

Objetivo: Determinar el perfil antigénico de alfa-actina y fibronectina en fibroblastos humanos tratados con ácido elágico y punicalagina.

Metodología: La línea de fibroblastos de piel humana CCD1064Sk fue tratada con ácido elágico y punicalagina a las dosis de 10^{-6} y 10^{-7} M, tomando como control células cultivadas bajo las mismas condiciones, pero sin tratamiento con los fitoquímicos. La expresión antigénica de alfa-actina y fibronectina se determinó mediante citometría de flujo y microscopía láser confocal. Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

Resultados: El análisis de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo mostró un incremento significativo de la expresión de alfa actina y de fibronectina en las células tratadas respecto a las células control ($p \leq 0.05$). Así mismo, las imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia mostraron una mayor expresión antigénica de alfa actina y de fibronectina en los fibroblastos tratados respecto a las células control. No se observaron la presencia de fibras de estrés.

Conclusiones: Los tratamientos de ácido elágico y punicalagina potencian la síntesis de alfa-actina (sin expresarse como fibras de estrés) y fibronectina, las cuales se distribuyen a lo largo del citoplasma celular. Estos hallazgos pueden estar relacionados con la transdiferenciación hacia miofibroblastos por parte de la alfa-actina, los cuales aumentan la movilidad y capacidad contráctil del fibroblasto permitiendo una contracción de la herida y un aumento de la activación de moléculas de la ME mediada por la fibronectina, lo que podría resultar beneficioso como tratamiento de las heridas.

ESTUDIO DE RESISTENCIA A LA DEGRADACIÓN DE MEMBRANAS PARA REGENERACIÓN ÓSEA FUNCIONALIZADAS CON DOXICICLINA Y ZINC

Infante N¹, Ávalos MJ¹, Osorio MT¹, Toledano M¹, Vallecillo C¹.

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

Antecedentes: Las membranas de colágeno son biomateriales indispensables para las técnicas de regeneración ósea guiada, ampliamente utilizadas para la recuperación del tejido óseo en los defectos alveolares. Su función principal es actuar como medio barrera entre el defecto óseo y el tejido blando, manteniendo el espacio y permitiendo que las células óseas proliferen en él sin invasión de células epiteliales. Uno de los principales problemas de estas membranas es su inestabilidad volumétrica y su rápida degradación.

Objetivos: El presente estudio se diseñó para analizar la resistencia a la degradación de diferentes membranas a lo largo del tiempo.

Material y métodos: Muestras de 10 x 10 mm² de Jason y Collprotect dopadas doxiciclina (Dox) y zinc (Zn) y sin funcionalizar se sometieron a procedimientos de degradación ante diferentes medios. Los medios seleccionados fueron; i) degradación hidrolítica (PBS), ii) resistencia a la colagenasa bacteriana (*Clostridium histolyticum*). Se realizaron medidas de peso con una microbalanza analítica y espesor con un calibre digital. Las membranas se analizaron en diferentes periodos de seguimiento hasta completar 21 días de inmersión. Los datos recogidos fueron analizados con ANOVA y Student Newman Keuls para las comparaciones de medias ($p < 0,05$) excepto cuando se analizaron las diferencias entre diferentes tiempos de inmersión dentro de la misma membrana y solución, donde se aplicaron comparaciones por pares ($p < 0,001$).

Resultados: Cuando las membranas fueron sometidas al medio PBS, Jason tanto funcionalizada como sin funcionalizar, resistió mejor a la degradación completando los 21 días de inmersión. Collprotect, funcionalizada o no, no superó las 48 h de inmersión en la prueba de resistencia a la degradación hidrolítica. En el test de resistencia bacteriana las membrana Collprotect no superaron las 12 h de inmersión, mientras que Jason sin funcionalizar o dopada con Zn alcanzó las 24 h de inmersión.

Conclusión: Jason obtuvo mejores resultados frente a la degradación en ambos medios estudiados. El medio *Clostridium histolyticum* fue más agresivo con las membranas estudiadas. La funcionalización no altera las características de las membranas ni modifica su resistencia a la degradación en medios PBS o *Clostridium histolyticum*.

BIOFABRICACIÓN DE MODELOS TUMORALES: MÁS CERCA DE UN TRATAMIENTO PERSONALIZADO

Gema Jiménez^{1,2,3,4}, Julia López de Andrés^{1,2,3,4}, Marta Ruiz-Toranzo¹, Elena López-Ruiz^{1,3,4,5}, Carmen Griñán-Lisón^{1,3,4} y Juan Antonio Marchal^{1,2,3,4}

¹ Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada. ² Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Universidad de Granada. ³ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada. ⁴ Unidad de Excelencia "Modeling Nature" (MNat), Universidad de Granada. ⁵ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén

Los modelos in vitro convencionales para el estudio del cáncer no reproducen con precisión el microambiente tumoral, siendo necesario generar nuevos modelos de estudio más representativos. Las novedosas técnicas de biofabricación, como la bioimpresión 3D, son una excelente herramienta para generar modelos en 3D multicelulares inmersos en una matriz extracelular. En este sentido, se han generado dos modelos de melanoma maligno (MM) de tres capas, compuestos por células madre cancerosas aisladas de una línea celular establecida de MM o de una línea celular primaria derivada de un paciente, junto con otros tipos celulares que componen el microambiente tumoral como son los fibroblastos, células madre mesenquimales y células endoteliales. Los diferentes tipos celulares, se embebieron en una biotinta y se bioimpresieron réplicas de los modelos de MM utilizando una bioimpresora de extrusión. Una vez obtenido el modelo, se procedió al análisis de la proliferación celular, viabilidad y actividad metabólica mediante imágenes confocales 3D y el ensayo de AlamarBlue. La remodelación del microambiente tumoral se evaluó mediante pruebas reológicas e imágenes ESEM. Además, se analizó la respuesta de ambos modelos tumorales al vemurafenib, midiendo la proliferación y viabilidad celular a diferentes dosis de fármaco y períodos de administración, y se examinaron los genes relacionados con quimiorresistencia mediante qPCR. La capacidad tumorigénica se analizó mediante la implantación subcutánea de los hidrogeles de MM en ratones NGS. Como resultados se observaron que los diferentes tipos celulares que componen el modelo mostraron una alta proliferación y actividad metabólica, y remodelaron activamente la matriz extracelular. Los modelos de MM reunieron una serie de propiedades reológicas similares a las de la piel y llegan a desarrollar una vascularización temprana. Además, estos modelos presentaron respuestas diferentes al vemurafenib en comparación con los cultivos celulares y entre ellos, siendo el modelo generado a partir de células de paciente el que mayor resistencia ha mostrado. Además, estos modelos inducen un proceso tumorigénico en xenotransplantes murinos logrando modelos in vivo más miméticos que los convencionales. Por primera vez, se ha desarrollado un modelo de MM trilaminar humano basado en células madre cancerosas bioimpresas que recrea el microambiente tumoral in vitro e in vivo, así como una respuesta al tratamiento más realista, siendo útil como modelo de cribado farmacológico para establecer una medicina personalizada y de precisión contra el MM.

HYBRID FLUORESCENT MASS-TAG NANOTRACKERS FOR LONG-TERM LIVE-CELL BARCODING

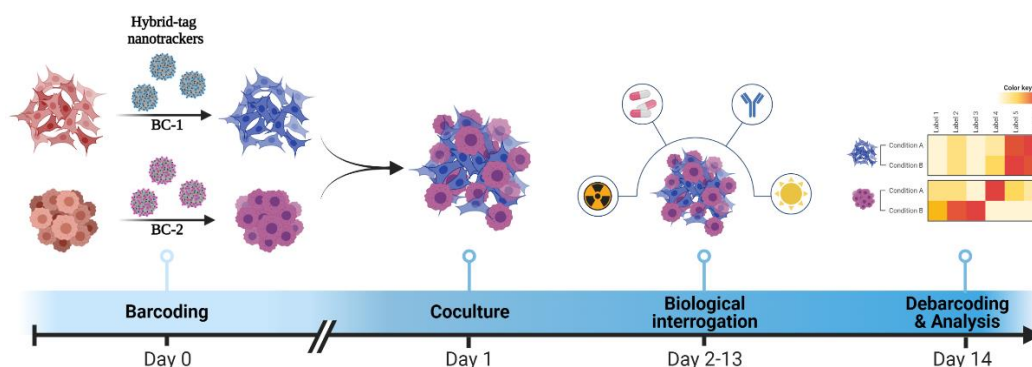
Jose Antonio Laz-Ruiz^{1,2,3}, Antonio Delgado-Gonzalez^{1,2,3,4}, Maria Victoria Cano-Cortes^{1,2,3}, Ying-Wen Huang⁴, Veronica Gonzalez⁴, Juan Jose Diaz-Mochon^{1,2,3}, Wendy Fantl^{4,5}, and Rosario Maria Sanchez-Martin^{1,2,3}

¹ GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Avda. Ilustración 114, 18016 Granada, Spain; ² Department of Medicinal & Organic Chemistry and Excellence Research Unit of "Chemistry applied to Biomedicine and the Environment", Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain; ³ Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, 18012 Granada, Spain; ⁴ Department of Urology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, United States; ⁵ Stanford Cancer Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, United States.

Barcoding and pooling cells for processing as a composite sample are critical to minimize technical variability in multiplex technologies. Fluorescent cell barcoding has been established as a standard method for multiplexing in flow cytometry analysis. In parallel, mass-tag barcoding is routinely used to label cells for mass cytometry. Barcode reagents currently used label intracellular proteins in fixed and permeabilized cells and, therefore, are not suitable for studies with live cells in long-term culture prior to analysis.

In this study, we report the development of fluorescent palladium-based hybrid-tag nanotrackers using a previously reported solid-phase chemistry protocol to barcode live cells for flow and mass cytometry dual-modal readout. We describe the preparation, physicochemical characterization, efficiency of cell internalization, and durability of these nanotrackers in live cells cultured over time. In addition, we demonstrate their compatibility with standardized cytometry reagents and protocols even on heterogeneous cell populations. Finally, we validated these nanotrackers for drug response assays during a long-term coculture experiment with two barcoded cell lines.

This method represents a new and widely applicable advance for fluorescent and mass-tag barcoding that is independent of protein expression levels and can be used to label cells before long-term drug studies. These reagents have key advantages for cell barcoding such as fluorescence and mass dual-modality, durability (up to 14 days) without any appreciable cellular damage, stability over time, and universality.



NANOESTRUCTURAS HÍBRIDAS MAGNETITA/ORO PARA SU APLICACIÓN EN TERAPIAS DE HIPERTERMIA MAGNÉTICA Y FOTOTERMIA

M.Lázaro*, P. Lupiañez, J.L Arias, M.P Carrasco-Jiménez, Á.V Delgado and G.R Iglesias

Dpto. de Física Aplicada e Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA. NanoMag Laboratory Edificio I+D Josefina Castro Avenida de Madrid, nº 19. 18071. Granada, España. marinalc@ugr.es

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) se utilizan en diversos campos que van desde la industria hasta las ciencias de la salud. Gracias a sus propiedades magnéticas, pueden ser manipuladas a través de un campo magnético, lo que permite el transporte en una dirección dada y la retención de ellas en un sitio determinado.

Cuando las NPMs son sometidas a un campo magnético alterno, producen una pérdida de energía en forma de calor. Esta técnica se denomina hipertermia magnética y puede ser utilizada para provocar la muerte de las células tumorales (42-46°C) [1].

Otra posible fuente de calentamiento es la llamada fototerapia, en la cual, las NPMs se irradian con un laser de longitud de onda e intensidad adecuadas [2], absorbiendo parte de la radiación (visible o IR) y reemitirla en forma de calor. Ambos estímulos electromagnéticos pueden utilizarse por separado o conjuntamente para potenciar la respuesta deseada, lo que denominamos terapia dual.

En este trabajo presentamos la síntesis y caracterización de nanovarillas magnéticas (NVMs), recubiertas con una triple capa polimérica y con semillas de oro para mejorar su biocompatibilidad y a su vez sus propiedades ópticas (Fig 1a,b). Las NVMs se someterán a hipertermia magnética, fototerapia y ambas técnicas simultáneamente (DUAL), evaluando en cada caso, la capacidad para producir aumento de temperatura (Fig 1c). Además, se realizan ensayos de citotoxicidad y liberación de doxorubicina, un conocido fármaco antitumoral [3].

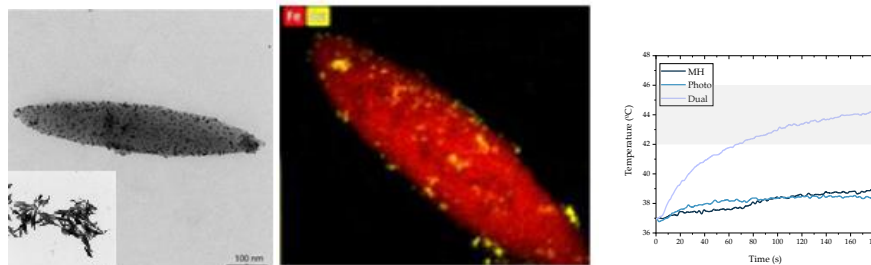


Figura 2. Imágenes de HRTEM de las nanovarillas recubiertas de oro (a,b) y aumento de temperatura en función del tiempo para la hipertermia magnética, fototerapia y terapia dual.

Junta de Andalucía and Ministerio de Economía y Competitividad, Programa FEDER 2014-2020. A-FQM-492-UGR20. Proyectos de I + D + I, del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación P20_00346. MINECO EC2019- 005930-P e Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, España.

[1] O.L Lanier, O.I Korotych, A.G Monsalve, D. Wable, S. Saviwala, N.W.F Grooms, C. Nacea, O.R Tuitt, J. Dobson. *Int J Hyperthermia* **36** (2019), 686-700.

[2] Y. Jabalera, A. Sola-Leyva, M.P Carrasco-Jiménez, G.R Iglesias, C. Jimenez-Lopez. *Pharmaceutics*, **13** (2021), 625.

[3] M. Lázaro, P. Lupiañez, J.L Arias, M.P Carrasco-Jiménez, Á.V Delgado, G.R Iglesias. *Polymers* **2022**, 14, 4913.

EFFECTO DEL ZOLEDRONATO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS EN MEMBRANAS DOPADAS CON GERANILGERANIOL.

Francisco Javier Manzano-Moreno¹, Elvira de Luna-Bertos², Paula Urbano Arroyo³, Concepción Ruíz², Manuel Toledano³, Raquel Osorio³.

¹Departamento de Estomatología, Universidad de Granada. Grupo BIO277. Grupo Tec-17. IBS Granada;

²Departamento de Enfermería, Universidad de Granada. Grupo BIO277. Grupo Tec-17. IBS Granada;

³Departamento de Estomatología, Universidad de Granada. Grupo CTS-242.

Introducción: El zoledronato es uno de los fármacos más frecuentemente administrados para inhibir la reabsorción ósea relacionada a ciertas patologías sistémicas. Se ha descrito la aparición de lesiones óseas necróticas en el hueso maxilar asociadas al uso de dicho fármaco, cuadro clínico conocido como osteonecrosis maxilar por bifosfonatos (ONB). Muchos de los pacientes en tratamiento con zoledronato necesitan ser tratados mediante procesos de regeneración ósea guiada (ROG) previa a la colocación de implantes dentales. Para contrarrestar el efecto del zoledronato y disminuir el riesgo de desarrollo de ONB en estos pacientes se ha propuesto el uso de geranilgeraniol, un metabolito de la vía del mevalonato que se ve inhibida por el uso de bisfosfonatos.

Objetivo: Determinar el efecto del zoledronato sobre la proliferación de osteoblastos cultivados en membranas de colágeno dopadas con geranilgeraniol.

Material y métodos: Las células osteoblásticas humanas MG-63 fueron cultivadas en medio DMEM con suero bovino fetal (SBF), sobre membranas de colágeno (Jason®). Se establecieron dos grupos: 1) membranas sin dopar y 2) membranas dopadas con geranilgeraniol. En ambos grupos se cultivaron los osteoblastos sin o con presencia de zoledronato (50µM). El efecto sobre la proliferación celular fue evaluado a las 24 horas mediante el método colorimétrico del MTT. La absorbancia fue medida en 570nm con un espectrofotómetro. Los datos recogidos fueron tratados y analizados mediante el programa informático SPSS versión 22.0. Se realizó el test de ANOVA, con la corrección de Bonferroni considerando significativos valores de $P < 0.05$.

Resultados: El tratamiento de los osteoblastos con zoledronato 50µM produjo un descenso significativo ($p < 0.001$) en la proliferación celular con respecto al control. Sin embargo, cuando se combinó el tratamiento de los osteoblastos con zoledronato sobre membranas dopadas con geranilgeraniol ese descenso en la proliferación celular se vio reducido significativamente ($p < 0.001$) con respecto al grupo tratado únicamente con zoledronato.

Conclusiones: Estos datos apoyan el uso de geranilgeraniol en combinación con membranas de colágeno para ROG en pacientes tratados con bifosfonatos con el objetivo de disminuir el riesgo de ONB en dichos pacientes.

Agradecimientos: Proyecto financiado PID2020-114694RB-I00 del MCIN/AEI 10.13039/501100011033. A Klockner S.A. por la donación de las membranas.

EFFECTO DE LA AMOXICILINA Y LA CLINDAMICINA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DIFERENTES MARCADORES DEL OSTEOLASTO

Javier Manzano-Moreno¹, Elvira de Luna-Bertos², Anabel González-Acedo², Candela Reyes-Botella¹, Concepción Ruiz²

¹ Departamento de Estomatología, Universidad de Granada. Grupo BIO277. Grupo Tec-17. ibs Granada; ² Departamento de Enfermería, Universidad de Granada. Grupo BIO277. Grupo Tec-17. ibs Granada.

Introducción: Los agentes descontaminantes más efectivos para tratar el hueso autólogo comúnmente utilizado para aumentar la anchura y la altura del hueso alrededor de los implantes dentales son los antibióticos clindamicina y amoxicilina. Además, clindamicina es capaz de aumentar el crecimiento celular, la síntesis de fosfatasa alcalina y la mineralización de los osteoblastos humanos en cultivo, mientras la amoxicilina no muestra efecto a este nivel.

Objetivo: Determinar el efecto de dos antibióticos (amoxicilina y clindamicina) sobre la expresión génica de diferentes marcadores implicados en la diferenciación/maduración, y por consiguiente en la función del osteoblasto.

Material y métodos: Los osteoblastos humanos obtenidos mediante cultivo primario procedentes de muestras de hueso intraoral fueron tratados con amoxicilina 400 µg/ml o clindamicina 150 µg/ml durante 24 horas. El estudio de la expresión génica de diferentes marcadores de diferenciación ósea (Osterix, BMP-7 y fosfatasa alcalina) se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en tiempo real. Para ello se extrajo el ARN mensajero de los osteoblastos tratados con los antibióticos, se realizó la retrotranscripción a ADN complementario y se procedió a su amplificación mediante termociclado, usando unos cebadores específicos para los genes estudiados diseñados con el programa *Primer3Design*. Los datos recogidos fueron tratados y analizados mediante el programa informático SPSS versión 22.0.

Resultados: El tratamiento de los osteoblastos con 150 µg/ml de clindamicina mostró un incremento significativo de la expresión de Osterix, BMP-7 y fosfatasa alcalina con respecto al control (células no tratadas). Sin embargo, el tratamiento con amoxicilina 400 µg/ml no produjo cambios significativos en la expresión génica de estos marcadores con respecto al control.

Conclusiones: Estos datos apoyan el uso de clindamicina a bajas dosis como el agente de elección para la descontaminación de injertos óseos intraorales previa a su utilización en regeneración ósea, gracias a que al efecto positivo sobre el crecimiento celular se le une un efecto favorable en el proceso de diferenciación/maduración del osteoblasto, contribuyendo a aumentar el éxito de la regeneración ósea.

1. Olvera-Huertas AJ, et al. The Effect of Chlorhexidine, Amoxicillin, and Clindamycin on the Growth and Differentiation of Primary Human Osteoblasts. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2022 Mar-Apr;37(2):283-2882.
2. Olvera-Huertas AJ, et al. Microbiological analysis of autologous bone particles obtained by low-speed drilling and treated with different decontamination agents. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2021 Jan;50(1):104-108.

OPTIMIZING GRAPHENE LIQUID-GATE TRANSISTORS FOR BIOSENSING APPLICATIONS

P. Martínez-Mazón, E. Fuente-Zapico, J. Galdón, C. Márquez and F. Gámiz

Nanoelectronics Research Group (CITIC-UGR), University of Granada, Spain. Instituto de Investigación Biosanitario de Granada, ibs.Granada, Granada, Spain.

Introduction. Graphene, a carbon single-atom layer, is one of the most promising materials for the future electronic devices. Inherent to the atomic thickness and the subsequent high surface-to-volume ratio, graphene presents high electrical and thermal mobilities, optimized electrostatic control of the channel and sensitivity to changes in its surrounding. These properties make it optimum for biosensing applications. For biological recognition, electrochemical gated sensors employing electrolytes such as ionic liquids and aqueous solutions are widely reported [1,2]. Nonetheless, due to the high sensitivity of graphene and the complex nature of the electrolyte solutions, the reproducibility between devices can be challenging [3]. We propose the use of double gate transistors which allows us both to understand the instability phenomena affecting the sensor performance (interface traps, defects, etc.) and to improve the reliability and variability of the sensors.

Experimental Setup. Fabrication process is summarized in Figure 1. Cr/Au contacts are directly deposited on SiO₂/Si substrates to perform four devices in a chip. Then, low-pressure chemical-vapor deposited graphene is transferred using the PMMA-based technique [4]. Graphene is annealed, etched, and finally passivated with Al₂O₃ using two lift-off photolithography stages.



Figure 1: Devices fabrication process.

Results. Figure 2.a shows the operation of three different sensors when using liquid (PBS) front-gate. Minimum of I_D - V_{FG} corresponds to Dirac point, where a variability among sensors is observed. To analyze the origin of this variability, Figure 2.b depicts the drain current vs. time characterization for a specific gate bias.

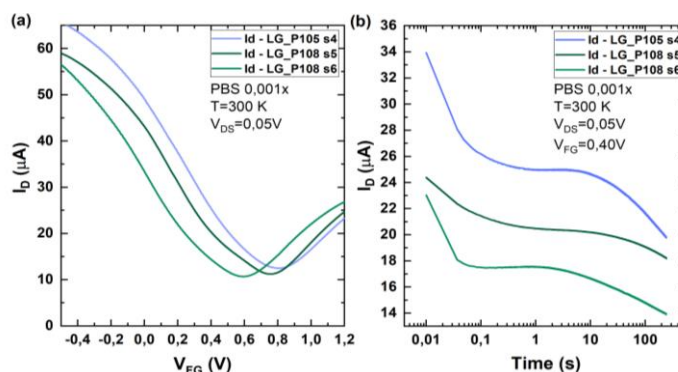


Figure 2: a) I_D - V_{FG} , b) I_D - t characterization

Conclusions. Understanding the instability phenomena which affect graphene interdevice variability is crucial to optimize a potential graphene biosensing platform.

Acknowledgment. This work has received funding from: EU H2020 MarieCurie (895322), the Spanish Program (TEC2017-89800-R), SUPERA COVID-19 Fund and CRUE-Santander, Regional Program FEDER UGRVID (CV20-36685) and P18-RT-4826 projects.

- [1] F. Chen et al., J. Am. Chem. Soc. 131, (2009).
- [2] N. Liu et al., Sensors, 19 (2019).
- [3] A. Pirkle et al., Appl. Phys. Lett. 99, 122108, (2011).
- [4] G. Borin, et al., Carbon N. Y. 84, 82–9, (2015).

DIFERENCIAL EXPRESIÓN DE INFLAMASOMAS, MUSASHI-1 Y CORTISTATINA EN PLACAS DE ATEROMA DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA.

Natividad Martín-Morales^{1,2,5}, Yunli Shen¹, Mercedes Caba-Molina^{1,3}, Saray Montalvo-Acosta⁴, Allinson Olaechea^{2,4}, Carmen Muñoz-Giménez^{1,4}, Miguel Padiá-Molina^{2,4,5}, Pablo Galindo-Moreno^{2,4,5}, Mario Delgado-Mora⁶, Francisco O'Valle Ravassa^{1,2,5}.

¹ Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Granada; ² Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER, CIBM), Universidad de Granada; ³ Unidad asistencial Anatomía Patológica, Hospital San Cecilio; ⁴ Departamento de Estomatología, Universidad de Granada; ⁵ Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs.Granada; ⁶ Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra – CSIC.

La enfermedad arterial periférica es una de las manifestaciones de la enfermedad vascular arteriosclerótica que afecta a más de 200 millones de personas en el mundo. La inflamación es un mecanismo patogénico clave en arterogénesis en el que se ha implicado la activación del inflammasoma NLRP3.

El objetivo ha sido valorar comparativamente entre placas de ateroma y zonas no afectas de arterias de miembros inferiores la expresión de moléculas relacionadas con el inflammasoma, Cortistatina y Musashi-1 mediante técnicas inmunohistoquímicas y moleculares.

Material y métodos: Fueron estudiadas un total de 78 muestras de arterias procedentes de 15 extremidades inferiores con amputación supracondílea de pacientes con Enfermedad vascular periférica incluyendo zonas con placa de ateroma y 11 sin lesión ateromatosa (controles) en vasos INFRA-POP y FEM-POP. Mediante técnicas morfológicas y morfométricas (H&E, Tricrómico y pentacrómico de Movat), inmunohistoquímicas frente actina de musculo liso, CD68, Inflamasoma NLRP3 y AIM2, Musashi-1 y mediante PCR cuantitativa NLRP3, AIM2, Musashi-1, IL-1beta y cortistatina.

La muestra se obtuvo en la UPIGAP del Hospital Universitario Clínico San Cecilio y se procesaron en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada en el marco del proyecto B-CTS-373-UGR 18 (FEDER) aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Granada (nº1142/CEIHC/2020).

Resultados: La edad media de los 15 pacientes fue de 75.5±6.8 años (rango de edad: 68 a 87 años), de los que el 75.6% eran hombres. En los 11 casos controles que no presentaban enfermedad vascular periférica la media de edad fue 41.7±13,1 (rango 18 a 62 años) de los que el 54.5% eran hombres. Al comparar las lesiones morfológicas y morfométricas según la clasificación AHA encontramos diferencias significativas en la presencia de enfermedad de Mönckeberg (p=0.000); en el depósito de colágeno en la placa (p=0.000), la superficie de la placa de ateroma (p=0.002); el espesor máximo y medio (p=0.000) y en el porcentaje de reducción de la luz vascular (p=0.000, test Kruskal Wallis). La expresión inmunohistoquímica de componentes del inflammasoma (AIM2 y de actina músculo específica es significativamente más intensa en placas de ateroma de pacientes con enfermedad vascular periférica que en los controles (p<0.001) y mediante PCR cuantitativa lo fueron NLRP3, AIM2, IL-1beta, Actina de musculo liso, cortistatina y Musashi-1.

Conclusiones: Los parámetros morfológicos, morfométricos, inmunohistoquímicos y moleculares evaluados fueron significativamente diferentes entre controles y pacientes con enfermedad vascular periférica. Describimos por primera vez la expresión del inflammasoma AIM2 en arterias humana con placas de ateroma.

GENERATION OF FUNCTIONALIZED HUMAN ORAL MUCOSA MODELS USING HOLOmatrix NATURAL BIOMATERIALS

Miguel-Ángel Martín-Piedra^{1,2}, Cristina Blanco-Elices^{1,2}, Olimpia Ortiz-Arrabal^{1,2}, Paula Ávila-Fernández¹, David Sánchez-Porras^{1,2}, Oscar-Darío García-García^{1,2}, Fernando Campos^{1,2}, María del Carmen Sánchez-Quevedo^{1,2}, Ricardo Fernández-Valadés^{1,2,3}, Miguel Alaminos^{1,2}, Ingrid Garzón^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs.GRANADA, Granada, Spain; ³ Division of Pediatric Surgery, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

The treatment of severe oral pathologies such as traumatic injuries, cancer and cleft palate often requires a surgical approach where the use of organic or synthetic membranes, flaps or graft implants is mandatory. This treatment may require more than one surgical procedure, which is often associated to high morbidity at the donor and recipient sites. In addition, the surgical management of certain areas of the oral mucosa is challenging due to the presence of subjacent bone, such as the hard palate. In this context, development of bioartificial oral mucosa substitutes with improved integration potential on these areas is in need. In the present work, we generated novel models of functionalized human oral mucosa substitutes by combining fibrin-agarose biomaterials with HOLOmatrix mineralized ossicles as a potential bioartificial tissue for use in tissue engineering of these specific areas of the human oral cavity.

To generate novel models of functionalized human oral mucosa, a stromal substitute was first generated using a mixture of human fibrin and 0.1% type VII agarose with 250,000 cultured human oral mucosa fibroblasts. This mixture was combined with a 0.5% concentration of HOLOmatrix extracted from marine invertebrates (1), and the polymerization reaction was triggered with calcium chloride. These novel oral mucosa models were histologically characterized to determine their potential use in tissue engineering.

Our results demonstrated the feasibility of the method to generate novel functionalized oral mucosa models using HOLOmatrix natural biomaterials potentially useful in tissue engineering. Functionalized oral mucosa was biocompatible *ex vivo*, as human oral mucosa fibroblasts spread within the tissue substitute without any significant alterations. As HOLOmatrix has higher density than fibrin-agarose, the resulting biomaterial showed a gradient of concentration of both components, with high concentration of fibrin-agarose on top and high concentration of HOLOmatrix at the basement.

Although future *in vivo* analysis should be carried out, the preliminary results of this work suggest that functionalized fibrin-agarose human oral mucosa substitutes could be potentially useful for the treatment of pathologies of the oral cavity involving bone and oral mucosa. This technology could contribute to increase the success rate of the treatment in these high-risk areas and will allow the polyvalent use of this tissue substitute in different topographical areas of the oral cavity.

Supported by Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI21/0980, FIS PI18/0331 and ICI19/00024 (BIOCLEFT), and by grant PI-0442-2019 from Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain. Cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the "Una manera de hacer Europa" program.

1. Mezali K, Thandar AS, Khodja I. On the taxonomic status of *Holothuria* (*Holothuria*) *tubulosa* (s.s.) from the Algerian coast with the description of a new Mediterranean species, *Holothuria* (*Holothuria*) *algeriensis* n. sp. (Echinodermata: Holothuroidea: Holothuriidae). *Zootaxa*. 2021 Jun 3;4981(1):89106.

DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CON NÚCLEOS DE MAGHEMITA CON POTENCIAL APLICACIÓN EN TERAPIAS DIRIGIDAS

Ana Medina¹, Michele Sechi^{1,2}, Marta Ibáñez-Vergara¹, Juan Rodríguez¹, Marisol Zurita¹, José L Arias^{1,3,4}

¹.Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18011 Granada, España. ². Dipartimento di Medicina Chirurgia e Farmacia, Facoltà di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche, Sassari, Italia. ³. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, 18016 Granada, España. ⁴. Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Universidad de Granada, 18012 Granada, España.

El control del destino biológico de agentes terapéuticos en el organismo mediante nanopartículas (NPs) que responden a estímulos externos (por ejemplo, campos magnéticos) da lugar a una mayor acumulación y selectividad en el lugar diana, reduciendo de esta manera los efectos adversos derivados de la farmacoterapia convencional (1). En este contexto, se han formulado NPs con núcleos magnéticos de maghemita (γ -Fe₂O₃) embebidos en una matriz polimérica de poli(ε-caprolactona) (PCL).

La preparación de las NPs γ -Fe₂O₃/PCL fue realizada siguiendo el método de emulsión con posterior evaporación de disolvente (2) (n = 3). En la que los núcleos magnéticos de γ -Fe₂O₃, previamente elaborados mediante coprecipitación química (1), fueron embebidos en la matriz de PCL. La limpieza de las NPs obtenidas se realizó mediante separación magnética y, posteriormente, fue determinado el tamaño de partícula y el índice de polidispersión (Pdl) mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS) y las características eléctricas superficiales fueron determinadas en función de la fuerza iónica y pH mediante electroforesis.

La metodología de preparación de las NPs dotó a éstas de un tamaño adecuado para la vía de administración parenteral (265.45 ± 54.39 nm, Pdl 0.39 ± 0.08), y el estudio de las propiedades electroforéticas de los diferentes tipos de NPs demostró la eficiente inclusión de los núcleos magnéticos en la matriz de PCL. El potencial zeta (ζ) en función de la concentración de KNO₃ de las NPs de γ -Fe₂O₃/PCL fue similar al obtenido con las NPs de PCL puras (ambos negativo), a diferencia del obtenido con las NPs de γ -Fe₂O₃, con un ζ positivo. Con el fin de confirmar estos resultados, se determinó el ζ en función del pH, donde las similitudes entre las NPs de γ -Fe₂O₃/PCL y PCL y las diferencias con las de γ -Fe₂O₃ fueron claramente observadas.

Se ha desarrollado un método de formulación reproducible de NPs γ -Fe₂O₃/PCL que, a falta de ensayos, pueden tener aplicación en terapias dirigidas.

Agradecimientos: Instituto de Salud Carlos III (PI19/01478) (FEDER), Programa Operativo FEDER de Andalucía 2014–2020 (Junta de Andalucía, I+D+i A1-FQM-341-UGR18); y el Programa de Ayudas a Proyectos I+D+i destinadas a Universidades y Entidades Públicas de Investigación (Junta de Andalucía, PY20_00346).

1. Fernández-álvarez F, García-García G, Arias JL. Pharmaceutics. 2021;13(8):1–22.
2. García-García G, Fernández-Álvarez F, Cabeza L, Delgado Á V., Melguizo C, Prados J, y cols. Polymers (Basel) [Internet]. 2020;12(2790).

PRURITO Y FUNCIÓN BARRERA EN PACIENTES CON DERMATITIS ATÓPICA

Trinidad Montero-Vilchez^{1,2}, Raquel Sanabria-de-la-Torre², Clara-Amanda Ureña-Paniego¹, Alejandro Molina-Leyva^{1,2}, Agustín Buendía-Eisman^{2,3}, Salvador Arias-Santiago^{1,2,3}.

¹ Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España. ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, España. ³ Departamento de Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España.

Introducción. La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por la aparición de lesiones eccematosas muy pruriginosa. En la etiopatogenia de la enfermedad interviene una disfunción de la barrera epidérmica. Escasos estudios han evaluado la relación entre la función de la barrera cutánea y el picor en los pacientes con DA.

Objetivo. Evaluar la asociación entre el prurito reportado por los pacientes con DA y la alteración de la barrera epidérmica.

Materia y métodos. Se diseñó un estudio transversal en el que se incluyeron pacientes con DA grave de al menos 6 meses de evolución diagnosticado por un dermatólogo. Se utilizó una escala de valoración numérica (numeric rating scale, NRS) de 0 (ausencia de picor) a 10 (máximo picor sospechado) para evaluar el prurito autorreferido por el paciente. Se midió de manera objetiva la función barrera en una lesión eccematosa de la región del antebrazo y en una zona de piel sana. Los parámetros de función barrera evaluados fueron la pérdida transepidérmica de agua, (transpeidermal water loss, TEWL), la hidratación del estrato córneo (stratum corneum hydration, SCH), el eritema y la temperatura.

Resultados. Se incluyeron 43 pacientes con DA (71,7% mujeres) con una edad media de 29,02 (15,34 DS) años. La media del NRS del picor fue de 8,14 (1,87 DS). Se observó una correlación positiva entre el NRS del picor y la TEWL ($r=0,357$; $p=0,019$), temperatura ($r=0,363$; $p=0,017$) y el eritema ($r=0,319$; $p=0,042$) en las lesiones eccematosas. Se clasificó a los participantes en dos grupos en función del NRS del picor: NRS ≤ 8 (55,8%; $n=24$) y NRS > 8 (44,2%; $n=19$). Los pacientes con mayor NRS presentaron mayor TEWL (30 vs 20,47 $g \cdot m^{-1} \cdot h^{-2}$, $p=0,028$), mayor temperatura (32,79 vs 31,66°C, $p=0,001$) y mayor eritema (427,30 vs 367,56 unidades arbitrarias, $p=0,025$) en las lesiones eccematosas.

Conclusión. Los pacientes con DA y prurito intenso presentan una mayor disfunción de la barrera epidérmica que se refleja en valores más elevados de TEWL, eritema y temperatura.

LOS INFLAMASOMAS NLRP3 Y AIM2 EN PATOLOGÍA PERIODONTAL Y PERI- IMPLANTARIA

Carmen Muñoz-Giménez^{1,2}, Natividad Martín-Morales^{1,3,4,5}, Saray Montalvo-Acosta⁶, Pedro Hernández-Cortés^{4,7}, Francisco O'Valle^{3,4,8}, Pablo Galindo-Moreno^{1,4}, Miguel Padiá-Molina^{1,4}

¹ Departamento de Estomatología, Universidad de Granada. ² Máster Universitario en Ciencias Odontológicas, Universidad de Granada. ³ Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Granada. ⁴ Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs.GRANADA. ⁵ Programa de Doctorado en Biomedicina. ⁶ Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública. ⁷ Departamento de Cirugía, Universidad de Granada. ⁸ Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER, CIBM), Universidad de Granada.

Introducción: Una de las vías de activación del sistema inmunitario innato es mediante inflammasomas, que son complejos multiproteicos cuya función principal es el accionamiento de la caspasa-1 que, a su vez, conducirá a la maduración de IL-1 β . Su implicación en la patología periodontal y peri-implantaria no ha sido estudiada aún.

Objetivo: Valorar la expresión de los inflammasomas NLRP3 y AIM2 en muestras gingivales de tejido periodontal sano, con enfermedad periodontal y con enfermedad peri-implantaria.

Material y Métodos: Se realizó una evaluación histológica convencional, posterior a la fijación de las muestras, mediante tinción de hematoxilina-eosina, pentacrómico de Movat y tricrómico de Masson. Además, se valoró el grado de destrucción del tejido mediante cuantificación del área ocupada por tejido conectivo y colágeno fibrilar en tinciones de rojo sirio con y sin luz polarizada. Finalmente, se realizó la cuantificación de la expresión de CD45, NLRP3, AIM2 e IL-1 β mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Resultados: El nivel de deterioro tisular producido por la periodontitis y peri-implantitis es similar, existiendo una menor extensión de área de ocupación por tejido conectivo y colágeno fibrilar en comparación con muestras de tejido periodontal sano. El grado de detección de CD45 fue significativamente superior tanto en peri-implantitis como periodontitis, representativo del infiltrado inflamatorio. Además, se detectó una mayor presencia de inflammasomas NLRP3, AIM2 e IL-1 β en ambas patologías en comparación con el tejido sano, siendo mayor en muestras de peri-implantitis que en muestras de periodontitis.

Conclusión: Existe una mayor expresión de inflammasomas NLRP3 y AIM2, así como de IL-1 β en la periodontitis en comparación con el tejido sano y, más aún, en la peri-implantitis.

HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NOVEL BIOMATERIALS GENERATED BY DECELLULARIZATION OF STURGEON CARTILAGE FOR CORNEA AND LIMBUS TISSUE ENGINEERING

Olimpia Ortiz-Arrabal^{1,2}, Carmen Gonzalez-Gallardo^{2,3}, Ramón Carmona⁴, Óscar D. García-García^{1,2}, Jesús Chato-Astrain^{1,2}, David Sánchez-Porras^{1,2}, Víctor S. Carriel^{1,2}, Ingrid Garzón^{1,2}, Miguel-Ángel Martín-Piedra^{1,2}, Fernando Campos^{1,2}, Miguel Alaminos^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs.GRANADA, Granada, Spain; ³ Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain; ⁴ Department of Cellular Biology, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain

The human cartilage may be affected by different diseases and pathologies. However, its intrinsic regeneration capability is very low due to the lack of blood vessels in the structure of this tissue. Tissue engineering allows the regenerative treatment of chondral diseases using bioartificial tissues generated as advanced therapies medicinal products (ATMP). Natural scaffolds generated by decellularization of native tissues and organs are promising biomaterials for use in tissue engineering due to the biocompatibility and the ability to mimic native tissues (1). In the present work, we evaluated the usefulness of decellularized cartilage obtained by a chondrosteian fish to generate novel scaffolds for use in tissue engineering of the human cornea and scleral limbus.

In this study, a decellularization protocol based on the use of three different detergents and an enzymatic treatment was applied to sturgeon cartilage samples obtained from a local fish farm. DNA quantification and DAPI staining were performed on native and decellularized cartilage to test the efficiency of the decellularization protocol. Then, decellularized sturgeon cartilage was recellularized using human mesenchymal stem cells, and cultured *ex vivo* for 4 weeks to generate bioartificial tissues. Biocompatibility was assessed by evaluation *in vivo* for 60 days. Biochemical, histochemical and immunohistochemical analyses were conducted to characterize each bioartificial tissue.

Results revealed that the decellularization protocol succeeded in eliminating all cells and DNA from the sturgeon cartilage. DNA quantification and DAPI staining showed high decellularization efficiency. Decellularized scaffolds were transparent and favored cell adhesion and proliferation of human cells to generate a biological substitute of the human cornea and scleral limbus. This biomaterial also demonstrated biosafety when grafted *in vivo* and triggered a pro-regenerative process driven by CD-206 macrophages. Histological structure of the bioengineered tissues showed a homogeneous stroma with cells properly attached on top. Cells were physiologically active and able to synthesize relevant components of the extracellular matrix, such as collagen fibers and other components of the cornea stroma. In conclusion, we propose decellularized sturgeon cartilage as a promising novel biomaterial for use in cornea and limbus tissue engineering.

Supported Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI20/0317 and ICI21/00010 (NANOULCOR). Supported by grant CSyF PI-0086-2020 from Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain and grant B-CTS-504-UGR20 (Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the “Una manera de hacer Europa” program.

1. Khajavi M, Hajimoradloo A, Zandi M, Pezeshki-Modaress M, Bonakdar S, Zamani A. Fish cartilage: A promising source of biomaterial for biological scaffold fabrication in cartilage tissue engineering. J Biomed Mater Res A. 2021 Sep;109(9):1737-1750.

IMPROVEMENT OF KERATINOCYTE CULTURE PROTOCOLS USING NOVEL NATURAL GROWTH FACTORS

Olimpia Ortiz-Arrabal^{1,2}, Jesús Chato-Astrain^{1,2}, Carmen González-Gallardo^{2,3}, Miguel Ángel Martín-Piedra^{1,2}, Cristina Blanco-Elices^{1,2}, Víctor Carriel^{1,2}, Ingrid Garzón^{1,2}, Ricardo Fernández-Valadés^{1,2,4}, María Dolores Mesa-García^{2,5,6}, Carolina Gómez Llorente^{2,5,6}, Miguel Alaminos^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs.GRANADA, Granada, Spain; ³ Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain; ⁴ Division of Pediatric Surgery, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain
⁵ Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, Campus Universitario de Cartuja, University of Granada, Spain; ⁶ Biomedical Research Center, Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", University of Granada, Spain

Tissue engineering provides the possibility of generating skin substitutes that could contribute to the clinical treatment of skin injuries and burns. In the biofabrication process of artificial skin by tissue engineering, large amounts of patient keratinocytes are needed. Human keratinocytes show slow proliferation rates in culture, thus causing a delay in the generation of skin substitutes. Several natural biomolecules have been tested to improve keratinocyte culture protocols. Maslinic acid (MA) is a bioactive compound present in olive oil with numerous beneficial properties on human cells (1). In this study, we analyzed the effect of maslinic acid on human keratinocytes in culture.

First, we tested a wide range of increasing concentrations of MA (1-80 µg/mL) on human skin keratinocytes at 24, 48 and 72 hours. At each time, LIVE/DEAD, DNA quantification, flow cytometry and WST-1 assays were performed to determine the effects of maslinic acid on cell viability and proliferation. Immunohistochemistry of proliferative marker KI-67 and gene expression analysis were also conducted on these cells in presence of 5 µg/mL of MA.

Results showed that the use of MA in the culture medium was safe for the cells, as human keratinocytes showed high levels of cell viability at most concentrations. In fact, 80 µg/mL of MA was the only concentration showing lower cell viability. Regarding cell proliferation, a concentration of 5 µg/mL of MA was able to improve cell proliferation at the three time periods analyzed here, with an increase of the number of cultured cells and an increment of the WST-1 proliferation activity. This concentration of MA was able to significantly increase the percentage of cultured cells as determined by KI-67 expression. These results demonstrate that the use of MA in the culture medium is not associated to an alteration of the cell viability of cultured human keratinocytes, except at the highest concentrations. In addition, MA might have pro-proliferative effects on human skin keratinocytes and could therefore be used to accelerate keratinocyte culture protocols for use in tissue engineering.

Supported by Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI21/0980, ICI19/00024 and ICI21/00010, and by grants PE-0395-2019 and PI-0442-2019 from Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain. Supported by grant B-CTS-450-UGR20 (Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades). Cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the "Una manera de hacer Europa" program.

1. Jing Z, Rui W, Ruihua L, Hao Y, Hengtong F. Review of the Biological Activity of Maslinic Acid. *Curr Drug Targets*. 2021;22(13):1496-1506

ASSESSMENT OF NANOMECHANICAL PROPERTIES OF DENTIN SURFACE TREATED WITH NANOPARTICLES DOPED WITH DOXYCYCLINE AND DEXAMETHASONE

Estrella Osorio¹, Macarena Garrido¹*, Fátima S. Aguilera¹, Manuel Toledano^{1,2}, Enrique Fernández¹, Raquel Osorio¹.

¹ Universidad de Granada, Facultad de Odontología. ² Instituto de Investigación Biosanitaria. Granada * Estudiante de Grado

Objective: To investigate the effect of novel polymeric nanoparticles (NPs) doped with doxycycline (Doxy) and dexamethasone (Dex) in the remineralization of dentin surfaces, through the analysis of its nanomechanical properties. **Material and Methods:** Previous to adhesive application, solutions (10 mg/mL) in PBS of Undoped-NPs, Doxy-NPs, Dexa-NPs were applied. A control group was added where NPs were not used. An etch-and-rinse adhesive system (Single Bond -SB-) was applied and resin composite build-ups were performed incrementally. Slabs 1 mm thick were obtained and polished to 0.1 μm , using diamond paste. After 24 hours of storage at 37°C in PBS, their nanomechanical properties were evaluated using a Ti-750D TriboIndenter equipped with the Nano DMA (nanoscale Dynamic Mechanical Analysis) package. Data was taken from 30x30 μm (approx.) areas with a sweep frequency of 0.2 Hz and a dynamic (oscillating) force of 5 μN . **Results:** The mean values and standard deviation of Complex Modulus, Storage Modulus, Hardness and Young's Modulus (Ei) obtained for the experimental groups are shown in the table.

Experimental groups	CM (GPa)	LM (GPa)	SM (GPa)	Tan (δ)
Untreated dentin	44.53 (18.64) A	2.79 (1.61) A	43.46 (19.56) A	0.18 (0.04) A
Undoped-NPs	45.25 (20.70) A	2.45 (1.60) A	44.27 (11.67) A	1.30 (0.17) B
Dexamethasone-NPs	54.97 (32.21) AB	2.58 (1.58) A	54.10 (21.94) AB	0.12 (0.03) A
Doxycycline-Nps	83.35 (14.63) B	0.63 (0.04) B	84.24 (11.36) B	0.03 (0.04) C

Table: Means and SD of Complex modulus (GPa), Loss Modulus (GPa), Storage Modulus (GPa) and Tan (δ) in untreated dentin and dentin treated with undoped-NPs, Dexamethasone-NPs or Doxycycline-NPs.

Conclusions: Both Complex Modulus and Storage Modulus were higher in samples treated with doped nanoparticles. In general, Loss modulus and Tan Delta were lower in groups treated with doped nanoparticles. Therefore, the presence of doped nanoparticles facilitated the viscoelastic mechanical properties of the resin-dentin interface through the dissipation of energy.

Acknowledgment: This work was funded by Grant PID2020-114694RB-I00 funded by MCIN/AEI 10.13039/501100011033.

BIOFABRICATION OF A FREEZE-DRIED THREE-LAYERED SKIN SUBSTITUTE BASED ON BIOINKS SUPPLEMENTED WITH BIOMIMETIC BIOLOGICAL MOLECULES

Paula Pleguezuelos Beltrán^{1,2,3,4,5,†}, Carlos Chocarro Wrona^{6,†}, Patricia Gálvez Martín^{7,8}, Juan Antonio Marchal^{1,2,3,4,5,*}, Elena López Ruiz^{1,3,4,5,9,*}

¹ Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain. ² Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain. ³ BioFab i3D Lab – Biofabrication and 3D (bio)printing Laboratory, Granada, Spain. ⁴ Excellence Research Unit "Modeling Nature" (MNat), University of Granada, Granada, Spain. ⁵ Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada – University of Granada, Granada, Spain. ⁶ 3d.FAB, GEMBAS, ICBMS, Université Lyon 1, Villeurbanne, France. ⁷ R&D Human Health, Bioibérica S.A.U., Barcelona, Spain. ⁸ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain. ⁹ Department of Health Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain. † These authors contributed equally to this work. * Corresponding authors: jmarchal@go.ugr.es; elruiz@ujaen.es

Skin is one of the most important defense mechanisms of the body, but given its direct contact with the external environment, it is very susceptible to suffer damage. Numerous advances have been developed for the treatment of cutaneous wounds, however, the current skin substitutes and dressings developed so far to treat skin wounds in clinical practice are not sufficiently biomimetic. Therefore, the composition of the biomaterials used for the fabrication of skin substitutes should be improved. In this study, we have developed a freeze-dried three-layered skin substitute based on biomimetic bioinks composed of the main biological molecules of the extracellular matrix (ECM) of each of the three layers of the skin: epidermis, dermis and hypodermis. Bioinks were formulated based on agarose and collagen type I, and each one was supplemented with different glycosaminoglycans and other biomolecules characteristic of each skin layer. Then, bioinks were used to biofabricate a three-layered hydrogel that was subsequently freeze-dried. We carried out a mechanical characterization of the freeze-dried skin substitute, and assessed its *in vitro* biocompatibility with human dermal fibroblasts (hDFs). As well, we analyzed its *in vivo* wound healing capability in a murine excisional wound healing model. The results showed that the freeze-dried three-layered substitute presented desirable mechanical properties for its use as a skin substitute, and excellent biocompatibility due to its biomimetic composition, similar to the native ECM of the skin. Moreover, it was demonstrated that this substitute can promote wound healing *in vivo*, obtaining similar results to those of an autograft, manifesting its potential for its clinical application in the regeneration of cutaneous wounds.

ADVANCING IN DYNAMIC CHEMISTRY LABELLING AND NANOTECHNOLOGY APPLICATIONS FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS

Agustín Robles-Remacho^{abc}, M. Angelica Luque-Gonzalez^{abc}, F. Javier López-Delgado^d, Juan J. Guardia-Monteagudo^d, Mario Antonio Fara^d, Salvatore Pernagallo^d, Rosario M. Sanchez-Martin^{abc}, Juan Jose Diaz-Mochon^{abc}

^a GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer, University of Granada, Andalusian Regional Government, PTS Granada, Avenida de la Ilustración, 114, 18016, Granada, Spain. ^b Department of Medicinal and Organic Chemistry, School of Pharmacy, University of Granada, Campus Cartuja s/n, 18071, Granada, Spain. ^c Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospital of Granada/University of Granada, Avenida del Conocimiento, s/n, 18016, Granada, Spain. ^d DESTINA Genomica S.L, PTS Granada, Avenida de la Innovación 1, Edificio BIC, Armilla, 18100, Granada, Spain

Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are genetic alterations of one single base that may occur in the sequence of a gene or in a regulatory genomic region and can lead to pathological disorders. Detecting these SNPs is crucial for accurate diagnosis in diseases such as cancer, in which punctual mutations are present in a high frequency and can condition the success of treatments. In this work, we present two diagnostic platforms based on Dynamic Chemistry Labelling and Nanotechnology approaches.

In one hand, we developed a nanotechnology-based approach combined with DCL for the detection of point mutations in KRAS sequences by flow cytometry, in an easy-to-use manner available in most clinical laboratories. Specifically, we detected single-differences in KRAS codon 12 (G12 position) in order to develop an accurate system for KRAS punctual mutation detection. KRAS is a driver gene in which mutations in codons 12, 13 and 64 can lead to cancer. Mutations in these codons are present in a high frequency in patients affected by cancer, for example, in colon cancer, G12D is represented in the 30% of patients.

On the other hand, we developed chemFISH, a method based in DCL for the detection of SNVs in repetitive sequences, as variability in these sequences could have a major impact on chromosomal functions and cell division. ChemFISH can serve as a rapid method to validate previously detected SNVs in sequencing data, as well as to find novel SNVs in repetitive sequences in a direct and rapid reaction. With this approach, we detected the α -satellite DNA in a variety of human cell lines by microscopy, detecting single bases with high specificity (82.41%–88.82%) and with a low coefficient of variation among samples (13.16%–25.33%). ChemFISH is a method that will contribute to the development of novel molecular assays for nucleic acids imaging by fluorescent microscopy.

In conclusion, the presented diagnosis platforms allow the detection of single nucleotide changes in nucleic acids biomarkers by using a versatile chemistry that could contribute to the development of novel molecular assays providing benefits in terms of result consistency, cost and easy-of-use.

USO DE POLIALQUILCIANOACRILATOS EN NANOMEDICINA

Juan Rodríguez¹, Marisol Zurita¹, Ana Medina¹, Marta Ibáñez-Vergara¹, José L Arias^{1,2,3}

¹ Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18011 Granada, España. ² Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, 18016 Granada, España. ³ Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Universidad de Granada, 18012 Granada, España.

Introducción: Los Polialquilcianoacrilatos (PACAs) son una familia de polímeros que se empezaron a usar en la década de 1980 comenzando así su estudio como vectores de fármacos en distintas áreas de la Medicina destacando su potencial uso en cáncer.

El objetivo de este trabajo es investigar mediante una revisión bibliográfica el uso actual de PACAs en nanomedicina.

Material y métodos: Se ha usado el buscador de PubMed donde se ha realizado una revisión bibliográfica empleando las siguientes palabras clave “Polyalkylcyanoacrylates” obteniéndose 106 resultados, “Polycyanoacrylate” y “Nanoparticles” donde se encuentran 23 resultados de los cuales sólo uno es de los últimos cinco años.

Resultados y Discusión: Los monómeros de alquilcianoacrilato varían en la longitud de la cadena lateral del grupo éster encontrando cadenas alquílicas de mayor o menor longitud. Esto va a influir en la biodegradabilidad ya que cuanto mayor sea la cadena lateral mayor tiempo de vida van a tener en el organismo. De esta manera la variedad de monómeros permite controlar aspectos farmacocinéticos como la distribución o la degradación.

Se ha visto en un ensayo *in vitro* con células de la línea Huh7 una reducción de la IC₅₀ de 1.7 veces al administrar doxorubicina frente a nanopartículas de poliisohexilcianoacrilato cargadas con Doxorubicina. Además estudios en ratones demostraron su acumulación en las células de Küpffer lo que va a dar lugar una disminución de los efectos cardiotóxicos de la doxorubicina por su acumulación en el hígado. Sin embargo cuando se comenzó el ensayo clínico se tuvo que detener en la fase II debido a dificultades respiratorias que causaron la muerte de dos pacientes.

Conclusiones: Los estudios realizados sobre nanopartículas de PACAs ofrecen resultados prometedores. Aunque actualmente ningún medicamento con este material ha superado los ensayos clínicos ya que no se ha desarrollado todavía ninguna estructura que garantice seguridad.

Agradecimientos: Instituto de Salud Carlos III (PI19/01478) (FEDER), Programa Operativo FEDER de Andalucía 2014-2020 (Junta de Andalucía, I+D+i A1-FQM-341-UGR18); y el Programa de Ayudas a Proyectos I+D+i destinadas a Universidades y Entidades Públicas de Investigación (Junta de Andalucía, PY20_00346)

Bibliografía:

1. Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Apr 25;55(4):519-48. doi: 10.1016/s0169-409x(03)00041-3. PMID: 12706049.
2. Couvreur P. (Poly-cyanoacrylate) nanomedicines for cancer and beyond: Lessons learned. *J Control Release.* 2021 Jun 10;334:318-326. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.04.028. Epub 2021 Apr 27. PMID: 33915223.

BIOIMPRESIÓN DE TUMORES EN DISPOSITIVOS *METASTASIS-ON-A-CHIP*: ¿A UN PASO DE LA MEDICINA PERSONALIZADA?

Jesús Ruiz-Espigares^{1,2}, Julia López de Andrés^{1,2}, Laura de Lara-Peña^{1,2}, Gema Jiménez^{1,2,3,4*}, Juan Antonio Marchal^{1,2,3,4*}

1. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Granada, España. 2. Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España. 3. Centro de Investigación Biomédica de Granada (ibs.GRANADA), Hospital Universitario de Granada-Universidad, Granada, España. 4. Unidad de Excelencia de Investigación Modeling Nature (MNat), Universidad de Granada, Granada, España.

Desde hace décadas, se llevan realizando diversos intentos para obtener un modelo mimético para el estudio de la metástasis, motivo de la mayor parte de las muertes causadas por el cáncer, con el fin de resolver las incógnitas que rodean a esta enfermedad. Para comprender mejor este proceso de diseminación celular, se necesitan modelos más realistas que sean capaces de recrear fielmente el microambiente tumoral (TME) de forma completa y esencial. Así, recientemente se han propuesto nuevas herramientas conocidas como *tumor-on-a-chip* y *metastasis-on-a-chip*. Estas herramientas incorporan sistemas microfluídicos y pequeñas cámaras de cultivo donde el TME puede modelarse fielmente gracias a la bioimpresión 3D. En este trabajo se ha desarrollado una revisión bibliográfica sobre las diferentes fases de la metástasis, las incógnitas que quedan por resolver y el uso de nuevos modelos para estudiar esta enfermedad. El objetivo es proporcionar una visión global del panorama actual y del gran potencial que tienen estos sistemas para la investigación traslacional *in vitro* sobre las bases moleculares de la patología. Además, estos modelos permitirán avanzar hacia una medicina personalizada, generando chips a partir de muestras de pacientes del tumor original para realizar un cribado farmacológico preciso permitiendo establecer el protocolo de tratamiento más adecuado.

LA TERAPIA FOTODINÁMICA MEJORA LA FUNCIÓN DE BARRERA EPIDÉRMICA EN PACIENTES CON QUERATOSIS ACTÍNICA

Raquel Sanabria-de la Torre^{1,2}, Trinidad Montero-Vílchez^{1,3}, Carolina Montero-Vílchez⁴, Pablo Díaz-Calvillo³, Juan Ángel Rodríguez-Pozo³, Alejandro Molina-Leyva^{1,3}, Salvador Arias-Santiago^{1,2,3}.

¹Instituto de Investigación Biosanitaria *ibs.GRANADA*, Granada, España. ²Departamento de Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España. ³Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España. ⁴Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España.

Introducción. La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento eficaz para las queratosis actínicas (QA), pero hay poca información sobre cómo afecta este tratamiento a la función de barrera de la piel.

Objetivo. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la TFD sobre la función de barrera epidérmica en pacientes con QA.

Material y métodos. Se realizó un estudio observacional prospectivo en el que se incluyeron a pacientes que presentaban al menos tres QA en la cabeza. Los parámetros de la función de barrera epidérmica, como la pérdida transepidérmica de agua (TEWL), la hidratación del estrato córneo (SCH), la temperatura, el eritema y la elasticidad, se midieron una hora antes y un mes después de la TFD. Los parámetros se evaluaron en piel lesionada y no lesionada.

Resultados. Trece pacientes con una edad media de 73,69 años fueron incluidos en el estudio. El número medio de QA disminuyó un mes después del tratamiento con TFD (15,08 vs 1,92 $p < 0,001$). Los parámetros de la función de barrera epidérmica también cambiaron, en la piel lesionada, se observó un incremento de la SCH (29,39 vs 44,41 AU, $p = 0,035$) y se observó una tendencia al aumento de los valores de elasticidad tanto en la piel lesionada (0,61 vs 0,66 $p = 0,542$) como en la piel no lesionada (0,57 vs 0,67 $p = 0,170$). No se observaron cambios en la TEWL ni en la temperatura.

Conclusión. La TFD podría mejorar la función de barrera epidérmica en pacientes con QA. Sería interesante desarrollar nuevas investigaciones para evaluar las diferencias en la función de barrera epidérmica tras distintos tipos de TFD.

DUPILUMAB Y FUNCIÓN BARRERA EN PACIENTES CON DERMATITIS ATÓPICA

Raquel Sanabria-de la Torre^{1,2}, Trinidad Montero-Vílchez^{1,3}, Alberto Soto-Moreno², Juan-Angel Rodríguez-Pozo³, Alejandro Molina-Leyva^{1,3} y Salvador Arias-Santiago^{1,2,3}.

¹Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, España. ²Departamento de Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España. ³Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España.

Introducción. La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad inflamatoria sistémica, crónica y recurrente. Dupilumab es un nuevo tratamiento biológico que bloquea la acción de las interleucinas (IL)-4 e IL-13, citoquinas clave en la inmunopatogénesis de la DA. Este fármaco es efectivo para el tratamiento de la DA grave en adultos y niños. Actualmente se desconoce el impacto del dupilumab en la función de barrera epidérmica de los pacientes con DA.

Objetivo.

- 1) Evaluar el impacto del dupilumab en la función de barrera epidérmica
- 2) Comparar el efecto de dupilumab en la función barrera con la ciclosporina y los corticoides tópicos

Material y métodos. Se diseñó un estudio observacional prospectivo en el que se incluyeron pacientes con diagnóstico de DA que fueran a iniciar tratamiento con corticoides tópicos, ciclosporina o dupilumab. Los pacientes fueron evaluados al inicio del estudio y tras 16 semanas de tratamiento. La variable principal de eficacia clínica fue el EAS-50, alcanzar una mejoría del EASI mayor del 50 y la variable principal de restauración de la barrera cutánea fue la TEWL-50, alcanzar una reducción de la TEWL mayor del 50.

Resultados. Se incluyeron 46 pacientes con DA en el estudio, 10 recibieron tratamiento con corticoides tópicos, 14 con ciclosporina y 22 con dupilumab. Los pacientes que recibieron dupilumab presentaron una enfermedad más grave. Tras 16 semanas de tratamiento se observó que los pacientes que recibieron dupilumab alcanzaron con mayor frecuencia el EASI-50 (81,8% vs 40% vs 28,6, $p=0,026$) y la TEWL-50 (50% vs 30% vs 14,3%, $p=0,004$). Asimismo, los pacientes en tratamiento con dupilumab presentaron una mayor reducción de la temperatura (-0,87 vs +0,75 vs +0,54°C, $p=0,012$) y un mayor incremento de la SCH (+17,17 vs +2 vs +12,54 UA, $p=0,016$).

Conclusión. 1) Dupilumab mejora la función de la barrera epidérmica en pacientes con DA. 2) Dupilumab fue más eficaz en comparación con los corticoides tópicos y la ciclosporina en la restauración de la función barrera epidérmica en pacientes con DA.

DEVELOPMENT OF NOVEL CARTILAGE SUBSTITUTES USING ALTERNATIVE CELL SOURCES

David Sánchez-Porras^{1,2}, José Martín Losilla-Martínez³, Jesús Chato-Astrain J^{1,2}, Olimpia Ortiz-Arrabal^{1,2}, Óscar Darío García-García^{1,2}, Miguel-Ángel Martín-Piedra^{1,2}, Cristina Blanco-Elices^{1,2}, Paula Ávila-Fernández¹, Fernando Campos^{1,2}, Antonio Campos^{1,2}, Víctor Carriel^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; ³ Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

Degenerative, traumatic, or autoimmune processes can affect the articular cartilage, causing pain, loss of mobility and a decrease in the quality of life of patients. Currently, one of the most promising treatments is based on the use of autologous chondrocyte cultures, but results obtained with this technique are typically suboptimal. Several tissue-engineered cartilage models have been developed to the date [1]. One of the models showing promising results is the bioengineered cartilage substitute based on fibrin/agarose (FA) biomaterials with chondrocytes immersed within [2]. However, cultured chondrocytes tend to dedifferentiate in culture and novel sources of cells should be investigated. The aim of this preliminary study was to determine the potential of FA hydrogels to generate functional cartilage substitutes when alternative cell sources are used.

Two different cell sources were obtained to generate tissue engineered articular cartilage: elastic chondrocytes (EC) and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSC). Both types of cells were combined with fibrin-agarose hydrogels to generate a cartilage substitute. Then, substitutes were evaluated *in vivo* in a laboratory rabbit model. Defects of 5 mm in diameter and 2 mm deep were generated in the femoral condyles of New Zealand rabbits, and the defects were then covered with the cartilage substitutes containing EC (FA-EC) or ADSC (FA-ADSC). Results were evaluated after 12 weeks of *in vivo* implantation by macroscopic and hematoxylin-eosin (HE) and alcian blue (AB) histological methods (n=3 per group).

Macroscopic analysis of the repaired condyles revealed a cartilage-like tissue capable of covering the defects in all treated animals. Animals treated with FA-EC showed the ability to generate a tissue whose composition was similar to the native control. In contrast, regeneration with FA-ADSC was poor in terms of morphology. Histological analysis of FA-EC showed similar results to the control, with a homogeneous extracellular matrix and chondrocyte cell morphology resembling the native tissue, and a homogenous surface. FA-ADSC showed an irregular pattern of tissue regeneration, with a discontinuous extracellular matrix.

The preliminary results of the present study suggest the potential usefulness of FA-based hydrogels for articular tissue engineering. EC offered the best regenerative results, making them a promising cell source for repairing articular hyaline cartilage defects when used in combination with FA hydrogels. In contrast, results obtained using FA-ADSCs were poorer, as compared to FA-EC. Further studies are needed to determine the regenerative potential of artificial joint cartilage substitutes based on these biomaterials and alternative cell sources.

This study was supported by project PI-0257-2017 of Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, Spain and by CTS-115 group (Tissue Engineering Group).

[1] Sánchez-Porras et. al. (2021) Biomedicines. Mar 12;9(3):292

[2] Garcia-Martinez L, et al. (2017) Histochem Cell Biol. 147(1):83-95

ANÁLISIS DE VIDEO CON TÉCNICAS DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL PARA EVALUACIÓN DEL TEMBLOR ESENCIAL INCAPACITANTE EN PROCEDIMIENTOS DE ESTIMULACIÓN CEREBRAL PROFUNDA

Lucía Triguero-Cueva ^{1,2}, Claudio Lopez Mesa ¹, Francisco Luque Sánchez ³, Laura Hernández Muñoz ³, Francisco Herrera Triguero ³, Carlos Javier Madrid Navarro ¹, María José Pérez Navarro ¹, Adolfo Mínguez Castellanos ^{1,2}, José Pablo Martínez Barbero ⁴, Benjamín Iáñez Velasco ⁵, Majed Jouma Katati ⁵, Francisco Escamilla Sevilla ^{1,2}

¹ Servicio de Neurología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA. ³ Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial. Universidad de Granada, ⁴ Servicio de Radiodiagnóstico, Sección de Neuroimagen. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada, ⁵ Servicio de Neurocirugía. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada ⁵

Objetivos.- Presentar los resultados preliminares de un sistema de evaluación de la gravedad del temblor basado en análisis de vídeo mediante técnicas de inteligencia artificial (IA).

Material y Métodos.- Se realizaron evaluaciones prequirúrgicas y postquirúrgicas (3 y 6 meses) en 4 pacientes con temblor esencial incapacitante (rango de edades 51-75 años; sexos 1M/3V) intervenidos mediante estimulación cerebral profunda (ECP). Las evaluaciones incluyeron videofilmaciones y la escala *Fahn-Tolosa-Marin Tremor-Rating-Scale* (FTM-TRS). El análisis del vídeo se centró en las extremidades superiores (EES), utilizando técnicas de IA para detectar y evaluar el desplazamiento de una región de interés (dedos índices) a lo largo de los fotogramas, en maniobras de control postural y cinéticas. Se obtuvieron gráficas de movimiento con análisis de frecuencias y amplitudes (figuras 1 y 2).

Figura 1. Secuencias estáticas:

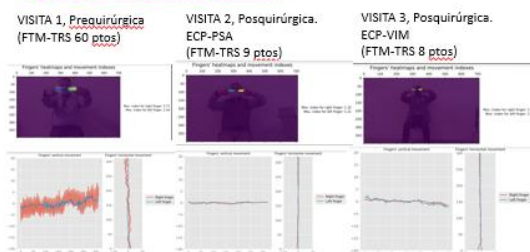
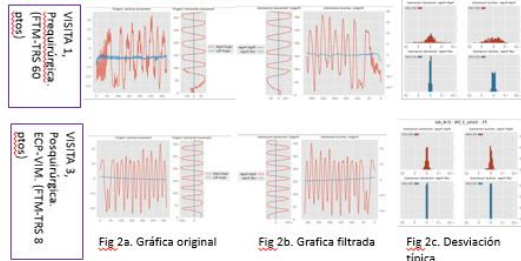


Figura 2. Secuencias dinámicas:



Resultados.- Las medidas obtenidas mediante técnicas de IA se correlacionaron con las puntuaciones de la FTM-TRS, obteniéndose un R^2 de 0.78, 0.81 y 0.77 con los ítems de EES (24 registros), subapartados A+B (12 registros) y puntuaciones totales (12 registros) respectivamente. La mejoría media del temblor detectada con la ECP fue del 83.5% según FTM-TRS y del 70.5% en el análisis de vídeo.

Conclusiones.- Nuestros resultados mostraron que la evaluación del temblor basada en sistemas de análisis de vídeos mediante técnicas de IA es posible y abre una vía para evaluar la gravedad del temblor de una forma objetiva y rápida.

ASSOCIATION OF PHYSICAL ACTIVITY AND SEDENTARY BEHAVIOR WITH QUALITY OF LIFE IN PATIENTS WITH NON-SPECIFIC CHRONIC LOW BACK PAIN: THE BACKFIT PROJECT

Tsiarleston, G¹., Donoso, B⁶., Gil-Gutiérrez, YM^{2,3}., Villegas-Fuentes, A., Vega-Retuerta, N., Pozuelo-Calvo, R^{2,3}., Segura-Jiménez, V^{2,3,4,5}.

¹Department of Physical Education and Sports, University of Granada, Granada, Spain ²UGC Neurotraumatología y Rehabilitación, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain ³Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain ⁴GALENO research group, Department of Physical Education, Faculty of Education Sciences, University of Cádiz, Cádiz, Spain ⁵Research Institute and Biomedical Innovation of Cadiz (INIBICA), Cádiz, Spain ⁶Department of Psychology, Faculty of Education Sciences and Psychology, University of Cordoba, Córdoba, Spain.

Background: Low back pain is one of the most prevalent musculoskeletal disorders of the World (~80%). The pain is chronic when persists for more than 12 weeks and is considered non-specific when causes are from unknown origin¹. Patients with non-specific chronic low back pain (NSCLBP) are more likely to fail to meet the recommended physical activity (PA) levels², while prolonged periods of sedentary behavior (SB) lead to increased pain³. These factors could affect the quality of life of these patients.

Objective: To study the association of time spent in PA intensity levels and SB with physical and mental components of health-related quality of life (HRQoL) in patients with NSCLBP.

Methods: Cross-sectional study with 91 participants (mean \pm standard deviation= 51.1 \pm 10.3 years) with NSCLBP. Time spent in PA and SB (expressed as percentage of total accelerometer wear time) were measured with the triaxial accelerometer (Actigraph GT3X+) which was worn in the non-dominant wrist for 7 consecutive days. HRQoL was assessed with the 36-item Short-Form Health Survey (SF-36).

Results: Linear regression analysis showed that higher time spent in light PA ($b=0.59$; 95% confidence interval (CI) = 0.19, 0.99; $p=0.004$) and moderate-to-vigorous PA ($b=0.43$; 95% CI = 0.05, 0.81; $p=0.03$) were associated with higher mental component of HRQoL. Time spent in SB was negatively associated with higher physical ($b=-0.17$; 95% CI = -0.334, 0.003, $p=0.046$) and mental ($b=-0.39$; 95% CI = -0.63, -0.15, $p=0.002$) components of HRQoL.

Conclusion: Our findings suggest that greater time spent in any PA intensity level and lower SB are associated with better HRQoL in patients with NSCLBP experience. Future intervention programs increasing time spent in PA levels and reducing SB are warranted in this population.

References

1. O'Sullivan, P. Manual Therapy, 2005; 10(4): 242–255.
2. Oliveira CB, et al., Trials 2018;19(1)
3. Barone Gibbs B, et al., Occup Environ Med. 2018;75(5):321–7

¿PUEDEN LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONTRIBUIR A LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER?

Marisol Zurita¹, Ana Medina¹, Marta Ibáñez-Vergara¹, Juan Rodríguez¹, José L. Arias^{1,2,3}

¹ Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18011 Granada, España. ² Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBEIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España. ³ Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Universidad de Granada, 18012 Granada, España.

Introducción: El cáncer es una de las enfermedades más letales del mundo, la terapia actual exige un proceso invasivo con resultados inciertos. Las nanopartículas de óxido de hierro (IONP) se conocen como material biocompatible con propiedades únicas, que permite su uso innovador en el tratamiento del cáncer in vivo ya sea como agente causante de hipertermia o como un sistema de administración de fármacos dirigidos.

Materiales y métodos: Se ha realizado una revisión bibliográfica consultando la base PubMed usando las palabras clave "Iron Oxide and cáncer" obteniendo 5.611 resultados. Se usó como criterio de selección las publicaciones de los últimos 10 años y se obtuvo 3.639 resultados, de los cuales se consultaron 5 artículos ya que dichos artículos incluían estudios in vivo e in vitro del uso de los SPION para combatir el cáncer.

Resumen y discusión: Los IONP recubiertos con cubiertas poliméricas, lipídicas o inorgánicas se utilizaron como vehículos de administración de fármacos para la administración sistémica de agentes anticancerígenos. Se hizo un estudio pre-clínico con nanopartículas supermagnéticas de óxido de hierro (SPION) (diámetro de 100 nm) recubiertas de almidón, cargados con metotrexato e inyectados por vía intraarterial, expuestos a un campo magnético extracorpóreo, y demostraron una notable actividad antitumoral con una remisión completa del carcinoma de células escamosas VX-2 inducido experimentalmente en conejos.

Además, se ha visto en un estudio clínico con pacientes con glioblastoma que la terapia con IONP después de una intervención quirúrgica produce efectos terapéuticos superiores que la terapéutica tradicional, con baja toxicidad sistémica tanto in vitro como in vivo.

Conclusión: El magnetismo como característica principal de los IONP los convierte en una buena alternativa como tratamiento contra el cáncer y se están convirtiendo es una clase emergente de los nanomedicamentos. Además, la hipertermia que utilizan los SPION para generar calor es mínimamente invasiva y específica para el tejido tumoral por lo que las nanopartículas magnéticas contribuyen a la mejorar de la terapia contra el cáncer.

Agradecimientos: Instituto de Salud Carlos III (PI19/01478) (FEDER), Programa Operativo FEDER de Andalucía 2014-2020 (Junta de Andalucía, I+D+i A1-FQM-341-UGR18); y el Programa de Ayudas a Proyectos I+D+i destinadas a Universidades y Entidades Públicas de Investigación (Junta de Andalucía, PY20-00346).

Bibliografía

1. Martinkova P, Brtnicky M, Kynicky J, Pohanka M. Iron Oxide Nanoparticles: Innovative Tool in Cancer Diagnosis and Therapy. *Adv Healthc Mater.* 2018 Mar;7(5). doi: 10.1002/adhm.201700932. Epub 2017 Dec 4. PMID: 29205944.
2. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem Rev.* 2012 Nov 14;112(11):5818-78. doi: 10.1021/cr300068p. Epub 2012 Oct 9. PMID: 23043508.
3. Zhang Y, Fu X, Jia J, Wikerholmen T, Xi K, Kong Y, Wang J, Chen H, Ma Y, Li Z, Wang C, Qi Q, Thorsen F, Wang J, Cui J, Li X, Ni S. Glioblastoma Therapy Using Codelivery of Cisplatin and Glutathione Peroxidase Targeting siRNA from Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020 Sep 30;12(39):43408-43421. doi: 10.1021/acsami.0c12042. Epub 2020 Sep 17. PMID: 32885649.

ALTA PREVALENCIA DE MIELOPATÍA CERVICAL NO DIAGNOSTICADA EN PACIENTES QUE SUFREN FRACTURAS DE CADERA

Nicolás Plais^{1,2}, Maribel Almagro Gil¹, Enrique Jiménez Herrero¹, Rafael Gómez Sánchez¹

¹ Servicio COT del Hospital Universitario Clínico San Cecilio. Granada. ² Instituto Biosanitario de Granada

Objetivo e introducción: La mielopatía cervical degenerativa (MCD) es la causa más frecuente de disfunción de la médula espinal en adultos y se produce por un estrechamiento progresivo del canal espinal a nivel cervical. Su impacto puede ser devastador y se asocia a una morbilidad elevada y en particular, una alteración progresiva del equilibrio. La prevalencia de MCD se estima entre 0.06-0.11%, pero se sospecha que esta cifra pueda ser muy infravalorada.

Con el envejecimiento de la población, el número de fracturas por fragilidad se ha multiplicado. Las fracturas de cadera representan una causa de morbilidad y mortalidad significativa.

Nuestra hipótesis es que la presencia de una MCD no diagnosticada aumenta de forma considerable el riesgo de fractura de cadera en la población anciana.

Material y Métodos: Diseñamos un estudio transversal de prevalencia en 432 pacientes consecutivos, con edad > 65 años, ingresados con diagnóstico de fractura de cadera.

Los criterios de exclusión fueron traumatismos de alta energía, diagnóstico previo de DCM, cirugía cervical previa o presencia de alteraciones neurológicas que pudieran crear confusión a la hora de la exploración (deterioro cognitivo, enfermedad de Parkinson, Ictus...).

Se realizó una anamnesis dirigida y exploración clínica de los pacientes, y se confirmó o no la presencia de MCD por resonancia magnética nuclear de columna cervical. Se procedió a un análisis descriptivo y de correlaciones y se realizaron regresiones logísticas para desvelar que variables tienen mayor influencia de identificar pacientes con mielopatía cervical.

Resultados: Analizamos 432 pacientes de los cuales 147 cumplieron los criterios de inclusión. El estudio constó de 106 mujeres y 41 hombres con una edad media de 82.9 años y un índice de Charlson de 4.95. Identificamos 23 pacientes con sospecha de mielopatía cervical. Por RMN, se confirmó la presencia de mielopatía cervical en 12 pacientes. La prevalencia de MCD en esta población alcanzó el 9.5%. La presencia conjunta de dolor cervical, reflejos hipertónicos y una puntuación <14 en la escala modificada japonesa de mielopatía tuvo una capacidad predictiva del 90.9%.

Conclusión: La MCD está infravalorada e infratratada. Su presencia es un factor de riesgo de fractura de cadera en pacientes >65 años. El diagnóstico precoz es crítico ya que su retraso da lugar a un aumento de la morbilidad y discapacidad permanente. Este estudio es el primero en realizarse en una población europea.

TUMOR-TARGETING NIR-TRIGGERED DRUG DELIVERY SYSTEMS BASED ON PLASMONIC NANOPARTICLES FOR CANCER THERAPY

M.C. Ortega-Liebana^{1,2,3}, J.J. Diaz-Mochon^{1,2,3}, and R. M. Sanchez-Martin^{1,2,3}

¹GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Avda. Ilustración 114, Granada 18016, Spain. ²Department of Medicinal & Organic Chemistry and Excellence Research Unit of "Chemistry applied to Biomedicine and the Environment", Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, Granada 18071, Spain. ³Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, Granada 18012, Spain.

Despite recent advances in cancer therapy, many challenges remain to provide efficient and safe local treatments. A major goal in the field is to make smart multifunctional nanodevices that could precisely control the delivery of bioactive molecules at specific location, in an atomically precise manner. My project, termed 'GeneNanobots', aims to develop an unprecedented 'track and treat' nanomachine equipped with navigational ability to achieve antigen-specific targeting and controlled therapeutic agent delivery capabilities to treat B cell cancers. Concretely, we are working on developing light-controlled thermosensitive polymer-functionalised gold-based nanodevices specifically designed to (1) track and tag tumours by recognition of a target antigen using the mimics of the single-chain variable fragment (scFv) present on the chimeric antigen receptor (CAR) T-cells, and to (2) NIR-controlled release of therapeutic agents *in situ*. The first nanobot have been successfully synthesized and characterized. *In vitro* cytotoxicity studies were also carried out after 7 days of treatments with each nanobots at different concentrations. Currently, we are testing their efficacy in different human B-lymphocyte cell lines and in other types of cancer lines to see if our nanobots selectively target only the desired surface receptor over-expressed in the B cells and then, selectively release the cytotoxic agent upon NIR irradiation. The modular feature of the nanobots will combine cellular and drug therapies to treat cancers and potentially a variety of other diseases. This innovation will reduce systemic toxicity, enhance treatments, have impact on the reduction of the health and the economic burden of cancer, as well as boost its adoption by the pharmaceutical industry, driving it to its commercial success.

MINERALIZED EGGSHELL MEMBRANE AS AN OSTEOINDUCTIVE BIOMATERIAL FOR BONE REGENERATIVE MEDICINE

Voltes-Martínez A^{1,2,3}, Torres-Mansilla A⁴, Álvarez-Lloret P⁴, Gómez-Morales J*⁵, Marchal JA*^{1,2,3,6} and López-Ruiz E*^{1,2,6,7}

¹ Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain. ² Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, Granada, Spain. ³ Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain. ⁴ Department of Geology, Faculty of Geology, University of Oviedo, Oviedo, Spain. ⁵ Laboratory for Crystallographic Studies, IACT, CSIC – University of Granada, Granada, Spain. ⁶ Excellence Research Unit "Modeling Nature" (MNat), University of Granada, Granada, Spain. ⁷ Department of Health Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain.

Regeneration of damaged bone tissue focuses on the attempt to repair bone lesions that the body fails to heal using different combinations of synthetic and natural biomaterials. Hybrid biomimetic materials aim to replicate the organic-inorganic interactions of mineralized biological tissues. Eggshell membrane (ESM) can control the nucleation of calcite crystals during eggshell formation, constituting a potential organic template for the controlled precipitation of other mineral phases. Different biomimetic strategies have been studied to improve the properties of synthetic nanocrystalline apatites using a vapor diffusion seated drop (VDSD) crystallization methodology. This approach favors the microenvironment for the controlled precipitation of calcium phosphate (CaP), an essential mineral in bone tissue. In this study, a biological organic surface, such as eggshell membranes (ESMs), has been used to control the microstructural properties during the mineralization process. The results show that ESMs mineralized by VDSD give rise to a CaP/ESM biomimetic material that is similar in composition and properties to mineralized tissues. Moreover, in-vitro studies revealed that it is biocompatible and favors the osteogenic differentiation of hMSCs after 21 days in culture. We conclude that this new natural biomaterial could be developed for guided bone regeneration and restorative dentistry.

This research was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness, Instituto de Salud Carlos III (FEDER funds, DTS21/00098), Fundación Mutua Madrileña (FMM-AP17196-2019 and by the Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad de la Junta de Andalucía (PYC20.RE.015.UGR).

MUTATION IN COQ5 LEADS TO COQ10 DEFICIENCY, DEVELOPMENTAL DELAY AND EARLY DEATH IN ZEBRAFISH

Sergio López-Herrador ¹, Julia Corral-Sarasa ², Luis C. López ^{1,2}, M. Elena Díaz-Casado ^{1,2}

¹ University of Granada - Granada (Spain), ² Ibs.Granada - Granada (Spain)

Introduction: Primary deficiencies in Coenzyme Q10 (CoQ10) are a group of inherited mitochondrial disorders with a clinically heterogeneous condition. At least 12 genes are involved in CoQ10 biosynthesis, and mutations on these genes are associated with human disease. Mutations in the COQ5 gene have been reported as cause of primary CoQ10 deficiency. This gene encodes for the only C-methylation step in the biosynthetic CoQ10 pathway (Malicdan et al., 2018). However, how mutations in COQ5 leads to the characteristics clinical symptoms is not well understood, and treatment remains challenging.

Results: Here, we characterize the Coq5L229X zebrafish model and evaluate the treatment with two analogs of the precursor for CoQ biosynthesis. Coq5L229X animals show changes in the swimming pattern, with a decrease in the total distance traveled and speed. These phenotypic effects are due to the reduction in the levels of CoQ10, leading to a developmental delay, as decreased in body size, head size and the development of structures (e.g., swim bladder). All these abnormalities lead to early death, being 35 dpf the maximal lifespan of the mutant animals, with a high mortality rate since day 10 post-fecundation.

Conclusion: The Coq5L229X zebrafish model mimics the encephalopathic presentation of the patients with COQ5 mutations, and represents an excellent model to evaluate pathophysiological mechanisms underlying primary CoQ10 deficiency and to test the therapeutic potential of the analogs of the precursor for CoQ biosynthesis.

HISTOBOOK: A SELF-ORIENTED LEARNING MODEL FOR THE ACQUISITION OF COMPETENCES IN TISSUE ENGINEERING BY MEDICAL STUDENTS

Luis Martínez Giron^{1,2}, Paula Avila-Fernandez^{1,2}, Cristina Blanco-Elices^{1,2}, David Sánchez-Porras^{1,2}, Olimpia Ortiz-Arrabal^{1,2}, Oscar-Darío García-García^{1,2}, Fernando Campos^{1,2}, María del Carmen Sánchez-Quevedo^{1,2}, Ismael Ángel Rodríguez¹, Ingrid Garzon^{1,2}, M. Alaminos^{1,2}, Jesús Chato-Astrain^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain

New teaching approaches have been developed over the past few decades focused on the meaningful learning model. One of the models is the “self-oriented learning” format, which has been previously shown to improve medical students’ competences (1). This model is based on the self-cognition and self-construction of their own knowledge, and makes the students the main protagonists of their own learning process, with the generation of distinctive and elaborate learning tools. Although this model was previously evaluated in other university students (1), to the best of our knowledge, this is the first attempt to evaluate the effectiveness of this model in university teaching of Tissue Engineering (TE). Here, we implemented and evaluated a self-oriented learning methodology in a TE course on medical students enrolled at the Medical School of the University of Granada.

During the practical sessions related to the biofabrication of bone and cartilage artificial tissues, students corresponding to the study group were directed using a self-discovery learning method. Through this process, students were encouraged to elaborate a self-personalized notebook, that we called *Histobook*. This *Histobook* would constitute their own learning material and the base of their future studies. In this self-elaborated notebook, the student should focus on the manufacturing methods related to artificial human tissues using graphical and/or digital resources. Identification and selection of the threshold concepts was the first step in this process, followed by projection of a conceptual map of the different strategies to manufacture these artificial tissues.

Students involved in this preliminary study were able to identify more than the 80% of the threshold concepts, and so the relevant ideas related to TE and bone and cartilage biofabrication. They improved their ability to summarize and understand the key definitions and processes related to the biofabrication of bone and cartilage as bioartificial tissues, since these concepts were included in the *Histobook*. Moreover, the students enrolled in this project revealed their inclination in this new teaching model and would recommend its implementation in future courses.

The elaboration of the *Histobook* during this self-oriented learning model showed that the students acquired better transversal competences in TE and biofabrication of bone and cartilage, as compared to traditional-based learning models.

Supported by Proyectos de Innovación Docente y Buenas Prácticas del Plan FIDO UGR 2022-2023 (CÓDIGO 22-170), Unidad de Calidad e Innovación Docente y prospectiva, Plan Propio de la Universidad de Granada, Spain.

1. Martin-Piedra MA, et al. Anat Sci Educ. 2022 Jan 24. doi: 10.1002/ase.2171. Epub ahead of print.

GENERATION OF A BANK OF MICROSCOPICAL IMAGES OF HISTOLOGICAL STATES AS A LEARNING TOOL IN MEDICAL STUDENTS

Oscar-Darío García-García^{1,2}, Pascual-Vicente Crespo^{1,2}, Francisco-Javier Cañizares-García^{1,2}, Víctor Carriel^{1,2}, Jesús Chato-Astrain^{1,2}, David Sanchez-Porras^{1,2}, Cristina Blanco-Elices^{1,2}, Paula Ávila-Fernández^{1,2}, Fernando Campos^{1,2}, María del Carmen Sanchez-Quevedo^{1,2}, Miguel-Ángel Martín-Piedra^{1,2}

¹ Tissue Engineering Group, Department of Histology, University of Granada, Granada, Spain; ² Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain

In recent decades, universities are undergoing important changes, induced by technological and social trends towards digitalization. Currently, the adoption of technologies by universities is related to a paradigm shift, in which technology is conceived as a complex and interconnected environment that enables digital learning. In this context, there is a necessity to create new digital tools to complement current knowledge in histology and tissue engineering, which is essentially based on a process of microscopic observation and consultation of conventional atlases. With the new digital tools, students could have the opportunity to perform a process of observation-description-identification-decision, possibly for the first time in their undergraduate studies. This process is key for the generation of a diagnosis in their future clinical practice that will favor fundamental skills and abilities to approach medical practice.

The present strategy is based on a Bank of Microscopic Images of Histological States (BMIHS) offering a resource to medical students that would facilitate, at a later stage, to recreate a complete experience acquired with the traditional microscope, favoring self-learning in histology and tissue engineering in an interactive way and with total availability of time and resources, as previously described (1). This tool could also provide the University of Granada with a unique tool for consulting the different types of normal human tissues. The BMIHS will allow the students to examine relevant images corresponding to the normal histological states of the human tissues, from the euplastic state to the proplastic and retroplastic states, which are very seldom considered in the teaching-learning process of medical students.

So far, development of the project allowed the generation of the BMIHS of euplastic human tissues. The use of these images resulted in very good participation of the students enrolled in the subjects of Histology taught at the Medical School of the University of Granada. Students referred that this system significantly contributed to their formative process and allowed non-presential learning using this database. Besides, the students who participated in this study would recommend the use of this new didactic tool in future courses.

In conclusion, implementation of the BMIHS resulted in an improvement of students participation and a high satisfaction referred by students involved in the project.

Supported by Proyectos de Innovación Docente y Buenas Prácticas del Plan FIDO UGR 2022-2023 (CÓDIGO 22-182), Unidad de Calidad e Innovación Docente y prospectiva, Plan Propio de la Universidad de Granada, Spain.

1. Heidger Jr PM, et al. Anat Rec. 2002 Apr 15;269(2):107-12. doi: 10.1002/ar.10078.

ESTRADIOL AND ESTRONE HAVE DIFFERENT BIOLOGICAL FUNCTIONS TO INDUCE NF-KB-DRIVEN INFLAMMATION, EMT AND STEMNESS IN ER+ CANCER CELLS

Ana Belén Diaz-Ruano¹, Nuria Martínez-Alarcon¹, Macarena Perán^{1,2,3,4}, Karim Benabdellah⁵, María Ángeles García-Martínez⁶, Ovidiu Preda⁶, César Ramírez-Tortosa⁶, Andrea Gonzalez-Hernandez¹, Juan Antonio Marchal^{1,2,3,7,8,*}, Manuel Picon-Ruiz^{1,2,3,7,8,*}.

¹ Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research, University of Granada, 18100 Granada, Spain ² Excellence Research Unit "Modeling Nature" (MNat), University of Granada, 18016 Granada, Spain. ³ BioFab i3D Lab - Biofabrication and 3D (bio)printing Laboratory, 18100 Granada, Spain. ⁴ Department of Health Sciences, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain. ⁵ GENYO Centre for Genomics and Oncological Research, Genomic Medicine Department, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, Health Sciences Technology Park, Av. de la Ilustración 114, 18016 Granada, Spain. ⁶ University Hospital San Cecilio, Av. del Conocimiento, s/n, 18016 Granada, Spain. ⁷ Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), 18012 Granada, Spain. ⁸ Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, 18016 Granada, Spain.

In general, the risk to being diagnosed with cancer increases with age; however, the development of estrogen receptor positive (ER+) cancer types in women are more closely related to the menopausal status than age. In fact, general risk factors for cancer development, as obesity-induced inflammation, show differences in their association with ER+ cancer risk in pre- and post-menopausal women. Here, we tested the role of the principal estrogens in the bloodstream before and after menopause, estradiol (E2) and estrone (E1) respectively, on inflammation, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cell enrichment in the human ER+ cervical cancer cell line HeLa. Our results demonstrate that E1, contrary to E2, is pro-inflammatory; increases embryonic stem-transcription factors (ES-TF) expression; and induces EMT in ER+ HeLa cells. Moreover, we observed that high intratumoral expression levels of 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (HSD17B) isoforms involved in E1 synthesis are poor prognosis factors, while overexpression of E2-synthetizing HSD17B isoforms are associated with better outcome, for patients diagnosed with ER+ ovarian and uterine corpus carcinomas. This work demonstrates that E1 and E2 have different biological functions in ER+ gynaecologic cancers. These results open a new line of research in the study of ER+ cancer subtypes, highlighting the potential key oncogenic role of E1 and HSD17B E1-synthetizing enzymes, in the development and progression of these diseases.

BIORTHOGONAL NANOPARTICLES: USING THE PRINCIPLES OF THE CURRENT NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY IN THERANOSTIC APPLICATIONS

Mónica Rodríguez-Segura^{1,2,3}, Rocío López-González^{1,3}, Victoria Cano-Cortes^{1,2,3}, Francisco Javier López-Delgado⁴, Carlos Peris-Torres^{1,3}, Juan Jose Diaz-Mochon^{1,2,3}, and Rosario M. Sanchez-Martin^{1,2,3}

¹GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Avda. Ilustración 114, Granada 18016, Spain. ²Department of Medicinal & Organic Chemistry and Excellence Research Unit of "Chemistry applied to Biomedicine and the Environment", Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, Granada 18071, Spain. ³Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, Granada 18012, Spain ⁴DestINA Genomica SL, Av. de la Innovación, 1, 18100 Urb. los Vergeles, Granada

Introduction: Polymeric nanoparticles have exceptional physical and chemical properties that have been exploited in recent decades in the field of nanomedicine in the search for new nanosystems for the diagnosis and therapy of several diseases. Click and bioorthogonal chemistry are high-performance chemical reactions with a great impact in the field of nanomedicine too due to their main features: efficiency, versatility, selectivity and biocompatibility, this chemistry take place under aqueous conditions which provides good yields and avoids the interaction with biological molecules. Besides, it does not require high temperatures, pressure or the presence of cytotoxic reagents as catalysts as copper. The engineering of polymer nanoparticles by click chemistry offers a promising response in diagnosis and therapy of different diseases

Aim: The main objective of this project is to develop and to validate bioorthogonal nanosystems for different biomedical applications.

Methods: Amino-polystyrene nanoparticles were functionalized following a Fmoc solid phase protocol and using oxyma/DIC as coupling reagents. Nanoparticles were conjugated with several ligands via bioorthogonal chemistry. The physicochemical characterization of the nanoparticles and the in vitro evaluation was carried out following standard protocols.

Results: The development and validation of bioorthogonal nanosystems for diagnostic and therapeutic applications based on polymeric nanoparticles conjugated to BCN allowing covalent binding with azide-activated ligands has been successfully carried out. Protocols have been developed to generate these bioorthogonal nanoparticles in a reproducible manner and their physico-chemical and biological properties have been determined.

Conclusions: A successful bioorthogonal conjugation approach to produce nanosystems based on polymeric nanoparticles for targeting and labeling biomolecules in biological media using click chemistry has been developed. These bioorthogonal nanoparticles have been successfully implemented for diagnostic and therapeutic applications.

EVALUATION OF THE VERSATILITY OF A MULTIFUNCTIONALIZED NANOSYSTEM WITH THERANOSTIC APPLICATION FOCUSED ON ACTIVE TARGETING TOWARDS PANCREATIC CANCER

Paula Garcia-Sacristan ^{1,2,3}, **M. Victoria Cano-Cortes** ^{1,2,3} and **Rosario M. Sanchez-Martin** ^{1,2,3}

1. GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain. 2. Department of Medical and Organic Chemistry and Excellence Research Unit of “Chemistry applied to Biomedicine and the Environment”, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain 3. Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University of Hospitals of Granada-University of Granada, 18012 Granada, Spain

Pancreatic cancer early diagnosis and effective treatment remains a challenge. Its high mortality and increasing incidence have reinforced the need for new therapeutic and diagnostic approaches. The peak of nanotechnology has allowed the extension of its applications among different areas, including medicine. As a result, nanodevices of varied nature have emerged as potential candidates to tackle the main limitations of cancer treatment. NanoChemBio group has optimized protocols based on biorthogonal chemistry, which added to our expertise with polymeric nanoparticles, permits the multifunctionalization of nanodevices for different applications.

The main aim of this project is the development of a novel multifunctional theranostic nanosystem that integrates tracking, therapy and active targeting as well as the incorporation of a linker for the controlled release of the drug.

For the active targeting of the nanodevice, a homing peptide was used to enhance the selective uptake by tumoral cells. As therapy component, they were loaded with a frequently used chemotherapeutic, gemcitabine, with an acidic pH labile bond to promote a more localized release and avoid the potential side effects of the drug. Following that, the nanoparticles were characterized to ensure their reproducibility and to optimize the followed protocols. They were also evaluated *in vitro* using BxPC-3 pancreatic cancer cell line, firstly to determine the cellular uptake of the nanoparticles, analyzed both through flow cytometry and confocal microscopy, and to study their cytotoxicity through viability assays. As highlighted result, the nanoparticles functionalized with the homing peptide were internalized significantly better compared to the ones without it.

Overall, the obtained results are promising and provide a solid basis for further studies to achieve the translation to the clinic of a safe and effective nanodevice for pancreatic cancer and other malignancies precision medicine.

