



V SIMPOSIO DE  
T E R A P I A S  
**AVANZADAS**  
TECNOLOGÍAS  
B I O M É D I C A S

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

20 DICIEMBRE 2024

SALÓN DE ACTOS

## INFORMACIÓN GENERAL

El Área de Terapias Avanzadas y Tecnologías Biomédicas del Instituto de Investigación Biosanitaria IBS.GRANADA organiza el **V SIMPOSIO DE TERAPIAS AVANZADAS Y TECNOLOGÍAS BIOMÉDICAS**. Tendrá lugar el martes **20 de diciembre de 2024** en el Salón de Actos de 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-simposio-terapias-avanzadas-tecnologias-biosanitarias-ibs-granada/>

El plazo límite para realizar la inscripción es el 19 de diciembre de 2024.

## COORDINACIÓN CIENTÍFICA

**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.

**Laura Martínez Ruiz.** Contrato Investigador con Cargo a Proyecto. Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Granada. MP17-Comunicación Intercelular.

## COMITÉ CIENTÍFICO

Araceli Aguilar González  
David Sánchez Porras  
Fabiola Bermejo Casares  
Francisco Javier Molina Estévez  
Francisco Martín Molina  
Ingrid Johanna Garzón Bello  
Julía Corral Sarasa  
Kristina Pavlovic  
Laura Jiménez Sánchez  
María del Carmen Sánchez Quevedo  
María Tristán Manzano  
Marina Cortijo Gutiérrez  
Miguel Alaminos Mingorance  
Miguel Ángel Martín Piedra  
Miguel Etayo Escanilla  
Olimpia Ortiz Arrabal  
Óscar Darío García García  
Paula Ávila Fernández  
Pilar Muñoz Fernández  
Víctor Carriel Araya

### Colaboradores:



Este programa y libro de Abstracts del V Simposio de Terapias Avanzadas y Tecnologías Biomédicas del ibs.GRANADA, se encuentra en la siguiente dirección:  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.14514308>

## PROGRAMA

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

**9:00-9:20h** Inauguración del Simposio

- **Dr. José Juan Jiménez Moleón.** Decano 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 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

**9:20-9:30h** Presentación de las Jornadas

**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.

**Laura Martínez Ruiz.** Contrato Investigador con Cargo a Proyecto. Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Granada. MP17-Comunicación Intercelular.

**9:30-10:00h** Conferencia Invitada: Gene Editing for the treatment of rare genetic disorders of the blood

**Dra. Alessia Cavazza**

Associate Professor in Gene Therapy at University College of London. "Special Genyo external seminar"

### 10:00-10:45h Mesa 1: Salud y Rehabilitación

- **Comparación de cirugía de miembro superior vs toxina botulínica en calidad de vida de pacientes con ACVA. Ensayo clínico. Resultados a los 6 meses.**

*Dra. Patricia Hurtado Olmo. Investigadora del grupo TECe21-REPARACIÓN, REGENERACIÓN Y SUSTITUCIÓN ÓSEA ibs.GRANADA*

- **The efficacy of a combined exercise and mindfulness approach in alleviating pain and disability in population with non-specific chronic low back pain**

*Dr. Víctor Segura-Jiménez. Investigador del grupo TECE20-REHABILITA-T: AVANCES E INNOVACION EN REHABILITACION Y PROMOCION DE LA SALUD ibs.GRANADA*

- **Hábitos de vida saludable, función barrera de la piel y biomarcadores de gravedad en dermatitis atópica**

*Dra. Raquel Sanabria de la Torre. Investigadora del grupo TECE19-DERMATOLOGÍA CLÍNICA Y TRASLACIONAL ibs.GRANADA*

### 10:45- 11:45 h Mesa 2: Ingeniería Tisular y Biomateriales

- **Generación de piel artificial por ingeniería tisular: resultados clínicos**

*Dr. Miguel Alaminos Mingorance. Investigador del grupo TEC03-INGENIERÍA TISULAR ibs.GRANADA*

- **Hidrogeles Magnéticos para la Regeneración de Tejidos y Actuación Remota**

*Dr. Modesto T López López. Investigador del grupo TEC05-FÍSICA DE INTERFASES Y SISTEMAS COLOIDALES ibs.GRANADA*

- **Comportamiento óptico de las resinas biocompatibles impresas en 3D: Aplicación en restauración dental**

*Dra. María del Mar Pérez Gómez. Investigadora del grupo TEC09-ÓPTICA DE BIOMATERIALES Y TEJIDOS ibs.GRANADA*

- **Acción de los bisfenoles sobre las células formadoras de hueso**

*Dra. Elvira de Luna Bertos. Investigadora del grupo TEC17-BIOTEJSALUD ibs.GRANADA*

### 11:45-12:15h Café y visita a pósteres

### 12:15-13:30h Mesa 3: Farmacología avanzada

- **Programa de Optimización de Antimicrobianos: Proyectos de investigación en marcha**

*Dra. María Núñez Núñez. Investigadora del grupo TEC01-PRÁCTICA SEGURA EN EL USO DE MEDICAMENTOS ibs.GRANADA*

- **Modulación anti-inflamatoria del colon en pacientes con ileostomía derivativa a través de la rehabilitación de la microbiota colónica**

*Dr. Alberto Carrillo Acosta. Investigador del grupo TEC13-CIRUGIA AVANZADA ibs.GRANADA*

- **Nuevas estrategias para el análisis de la etiología de patrones extremos de esterilidad masculina**

*Dra. Andrea Guzmán Jiménez. Investigadora del grupo TEC14-REPRODUCCION HUMANA Y ENFERMEDADES HEREDITARIAS Y COMPLEJAS ibs.GRANADA*

- **Investigación traslacional para desentrañar la fisiología del balance energético humano**

*Dr. Guillermo Sánchez Delgado. Investigador del grupo TEC15-MEDICINA NUCLEAR Y MOLECULAR ibs.GRANADA*

- **Cáncer de páncreas y disfunción endocrina: nuevas fronteras en Onco-Metabolismo**

*Dr. Alfonso Rubio Navarro. Investigador del grupo TEC16-TERAPIAS AVANZADAS: DIFERENCIACIÓN, REGENERACIÓN Y CÁNCER ibs.GRANADA*

### 13:30-14:30h Mesa 4: Dispositivos diagnósticos y biomédicos

- **Graphene biosensing platform for rapid detection and interconnected surveillance of virus outbreaks**

*Dra. Paula Martínez Mazón. Investigadora del grupo TEC04-NANOELECTRÓNICA ibs.GRANADA*

- **Active-Targeting Nanoplatforms for Cancer Therapy and Diagnosis**

*Dra. María Victoria Cano Cortés. Investigadora del grupo TECE18-NANOCHEMIBIO ibs.GRANADA*

- **Novel medical imaging-based approaches to predict treatment response in rectal cancer: the role of radiomics**

*Dra. Marta García Cerezo. Investigadora del grupo TECe22-IMAGEN MÉDICA AVANZADA  
ibs.GRANADA*

- **Complicaciones Precoces del implante de válvula aórtica percutánea (TAVI)**

*Dr. Antonio Padilla Serrano. Investigador del grupo TEC23-LABORATORIO PARA LA  
INVESTIGACIÓN EN MEDICINA INTENSIVA Y EDUCACIÓN MÉDICA  
(INTENSIVEEDUCATIONLAB) ibs.GRANADA*

**14:30-14:45h Cierre de la jornada y conclusiones**

**ÍNDICE DE RESÚMENES DE COMUNICACIONES ORALES PRESENTADAS**  
**ORAL PRESENTATION INDEX**

- **MODULACIÓN ANTI-INFLAMATORIA DEL COLON EN PACIENTES CON ILEOSTOMÍA DERIVATIVA A TRAVÉS DE LA REHABILITACIÓN DE LA MICROBIOTA COLÓNICA ..... 1**
- **CÁNCER DE PÁNCREAS Y DISFUNCIÓN ENDOCRINA: NUEVAS FRONTERAS EN ONCO-METABOLISMO ..... 2**
- **NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL ANÁLISIS DE LA ETIOLOGÍA DE PATRONES EXTREMOS DE INFERTILIDAD MASCULINA..... 3**
- **COMPLICACIONES PRECOCES DEL IMPLANTE DE VÁLVULA AÓRTICA PERCUTÁNEA (TAVI)..... 4**
- **ACCIÓN DE LOS BISFENOLES SOBRE LAS CÉLULAS FORMADORAS DE HUESO ..... 5**
- **COMPORTAMIENTO ÓPTICO DE LAS RESINAS BIOCOMPATIBLES IMPRESAS EN 3D: APLICACIÓN EN RESTAURACIÓN DENTAL ..... 6**
- **GENERATION OF ARTIFICIAL SKIN BY TISSUE ENGINEERING: CLINICAL RESULTS IN SEVERELY BURNT PATIENTS..... 7**
- **HIDROGELES MAGNÉTICOS PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS Y ACTUACIÓN REMOTA ..... 8**
- **COMPARISON OF UPPER LIMB SURGERY VS BOTULINUM TOXIN ON QUALITY OF LIFE OF PATIENTS WITH ACVA. CLINICAL TRIAL ..... 9**
- **GRAPHENE BIOSENSING PLATFORM FOR RAPID DETECTION AND INTERCONNECTED SURVEILLANCE OF VIRUS OUTBREAKS ..... 10**
- **HÁBITOS DE VIDA SALUDABLE, FUNCIÓN BARRERA DE LA PIEL Y BIOMARCADORES DE GRAVEDAD EN DERMATITIS ATÓPICA ..... 11**



**ÍNDICE DE RESÚMENES PRESENTADOS COMO PÓSTER**  
**POSTER ABSTRACT INDEX**

- **OPTIMIZATION OF AN ULTRARAPID DECELLULARIZATION PROTOCOL FOR HUMAN LIMBAL SUBSTITUTES IN LIMBAL STEM CELL DEFICIENCY THERAPY ..... 12**
- **DECONSTRUCTING mRNA-LNP SYSTEM: ANALYSIS OF ENCAPSULATED mRNA IN THE LIPIDIC NANOPARTICLES BY (IP-RP) UHPLC/DAD AFTER EXTRACTION AND ISOLATION ..... 13**
- **IMPLICACIÓN DE GCasa y LRRK2 EN LA RUTA AUTOFAGIA-LISOSOMA Y SU PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON ..... 14**
- **CA21113: ADVANCING GENOME EDITING FOR HUMAN DISEASES. SECOND YEAR ACHIEVEMENTS OF THE GenE-HumDI COST ACTION COLLABORATIVE NETWORK ..... 15**
- **DEVELOPMENT OF ACTIVATION-INDUCIBLE PROMOTERS FOR THE IMPROVEMENT OF CAR-T THERAPY ..... 16**
- **EFFECTO DE LA CLINDAMICINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DIFERENTES MARCADORES DE CRECIMIENTO EN OSTEÓBLASTOS TRATADOS CON ZOLEDRONATO ..... 17**
- **CRIBADO DEL TROPISMO TUMORAL DE AAVS EN MODELOS IN VITRO E IN VIVO PARA TERAPIAS DIRIGIDAS AL CÁNCER DE PULMÓN ..... 18**
- **BIOFABRICATION OF BIOENGINEERED SUBSTITUTES OF THE HUMAN SCLERAL LIMBUS BY TISSUE ENGINEERING. AN IN VIVO STUDY IN LABORATORY RABBITS ..... 19**
- **ANÁLISIS DE LA CURVA DEL OLVIDO VINCULADA A LA ADQUISICIÓN DE LAS PRINCIPALES COMPETENCIAS COGNITIVAS DE UN PROGRAMA DE FORMACIÓN EN SOPORTE VITAL: VALOR DE LOS CONCEPTOS UMBRALES. "PROYECTO RCP-UGR" ..... 20**

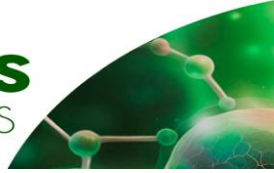
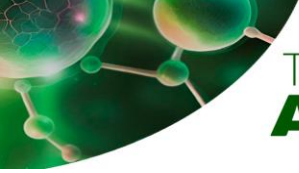
- **ENHANCING CAR-T CELL THERAPY THROUGH PD-1 DELETION AND CONTROLLED IL-15 EXPRESSION..... 21**
- **ESTRADIOL AND ESTRONE: CONTRASTING INFLUENCES ON INFLAMMATION, EMT, AND STEMNESS IN OBESITY-DRIVEN ER+ BREAST CANCER..... 22**
- **ELEVATED INTRACELLULAR ESTRONE LEVELS THROUGH HSD17B14 OVEREXPRESSION: EFFECTS ON INFLAMMATION, CSC ENRICHMENT, AND MIGRATION IN ER+ BREAST CANCER CELLS ..... 23**
- **FUNCTIONALIZATION OF 3D PRINTED PLLA NERVE GUIDE CONDUITS WITH FIBRIN-BASED HYDROGELS FOR APPLICATION IN NERVE TISSUE ENGINEERING ..... 24**
- **ESTUDIO DE LOS NIVELES DE HIERRO Y MAGNESIO EN LECHE FERMENTADAS COMERCIALES ..... 25**
- **ESTUDIO DE LOS MACROMINERALES CALCIO, POTASIO Y FÓSFORO EN LECHE FERMENTADAS COMERCIALES ..... 26**
- **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GRAPHENE-BASED BIOSENSOR PLATFORM FOR EARLY DISEASE DIAGNOSIS ..... 27**
- **IMPACTO DEL GEN FSHR EN EL ÉXITO DE LA TESE EN CASOS DE INFERTILIDAD MASCULINA SEVERA: UN ENFOQUE GWAS..... 28**
- **“ANÁLISIS DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE POMPE” ..... 29**
- **IMMUNOLOGICAL PROFILE OF NOVEL BIOGENIC ACELLULAR CONDUITS FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS..... 30**
- **PRELIMINARY STUDY OF CHARACTERIZATION AND STABILITY OF THE MEDICINAL PRODUCT VOXZOGO®: CONTROL SAMPLES ..... 31**
- **¿ES LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA PREDICTORA DEL RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON CÁNCER DE COLON?..... 32**

- **USO DE GENES SUICIDAS COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE PULMÓN..... 33**
- **ANALYSIS OF THE SHARED GENETIC COMPONENT BETWEEN SERTOLI CELL-ONLY SYNDROME AND AN IMMUNE-MEDIATED CONDITION..... 34**
- **OPTIMIZING EXOSOME PRODUCTION FROM CAR-T CELLS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY..... 35**
- **ASSESSMENT OF THE EFFICACY OF IL-18 INDUCIBLE 4TH GENERATION AHER2 CAR-T CELLS..... 36**
- **POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO DEL ÁCIDO ELÁGICO EN FIBROBLASTOS HUMANOS..... 37**
- **APROXIMACIÓN A LA ACTIVIDAD PROAPOPTÓTICA Y ANTIINFLAMATORIA DE COMPLEJOS ORGÁNICOS: DITERPENOS ENT-KAURENOS, HIDROXITRIMETIL ENT-KAURENO DERIVADO (D23-12)..... 38**
- **RESPONSE SURFACES MODEL FOR DESIGNING DEXAMETHASONE AND DOXYCYCLINE-DOPED NANOPARTICLES TO IMPROVE DENTIN-RESIN INTERFACES ..... 39**
- **MODELO DE PEZ CEBRA *coq5<sup>L229X</sup>* PARA LA INVESTIGACIÓN DE TERAPIAS EN ATAXIA CEREBELOSA ASOCIADA A UNA ENFERMEDAD ULTRA-RARA ..... 40**
- **INTRATUMORAL MELATONIN TREATMENT, A NOVEL CLINICAL APPROACH TO OVERCOME CISPLATIN RESISTANCE IN HEAD AND NECK CANCER..... 41**
- **INFLUENCE OF BIOFABRICATION VARIABLES ON EPITHELIAL THICKNESS OF TISSUE ENGINEERED ORAL MUCOSA SUBSTITUTES: A META-ANALYSIS STUDY ..... 42**
- **INNOVATIVE PLATFORM FOR DIRECT PROFILING OF CIRCULATING CELL-FREE RNA IN BIOFLUIDS..... 43**

- **DESARROLLO Y EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE POR COMPETENCIAS EN ALUMNOS DE SEXTO GRADO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA..... 44**
- **EVALUACIÓN DEL CONTENIDO EN COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN KÉFIRES COMERCIALES ..... 46**
- **COMPOSICIÓN FENÓLICA DE ESPECIALIDADES DE SOJA FERMENTADA COMERCIALES. INTERÉS EN LA ALIMENTACIÓN..... 47**
- **DESARROLLO DE MODELOS CELULARES HER2+ COMO HERRAMIENTAS IN VITRO PARA LA MEJORA DE INMUNOTERAPIAS CAR-T CONTRA TUMORES SÓLIDOS..... 48**
- **SYNTHESIS OF A NEAR-INFRARED FLUORESCENT (NIR) DYE FOR BIOANALYTICAL APPLICATIONS ..... 49**
- **IN VIVO EVALUATION OF CROSSLINKED TISSUE-LIKE COLLAGEN MEMBRANES FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS ..... 50**
- **CREATING UNIVERSAL ANTI-CD19 CAR T CELLS WITH A MEMORY PHENOTYPE THROUGH PRECISION CRISPR/Cas9 EDITING ..... 51**
- **MECANISMOS MOLECULARES DE LA SARCOPENIA: EFECTO PROTECTOR DEL EJERCICIO Y LA MELATONINA EN UN MODELO DE RATÓN KNOCKOUT PARA *Bmal1*..... 52**
- **INSERTION OF THE DONOR CASSETTE INTO CX3CR1 ENABLES EPIGENETIC REGULATION OF A CONSTITUTIVE PROMOTER IN HEMATOPOIETIC STEM CELLS, LEADING TO ITS ACTIVATION DURING MYELOID DIFFERENTIATION..... 53**
- **TOWARDS A HUMANIZED MOUSE MODEL OF POMPE DISEASE..... 54**
- **CANCER THERAPEUTIC APPLICATION OF INTRACELLULAR NANOCATALYSTS ..... 55**
- **ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE TNSALP SOBRE EL INFLASOMA EN PACIENTES CON HPP ..... 56**

- GENERATION AND IN VITRO CHARACTERIZATION OF A NOVEL 3D-PRINTED TUBULAR MESH FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS ..... 57
- MELATONIN ACTIVATES HUMAN SKELETAL MUSCLE CALCIUM-DEPENDENT THERMOGENESIS IN VITRO: ROLE OF MELATONIN RECEPTOR 2 ..... 58
- DEVELOPMENT OF A NOVEL VHH-BASED CAR-T CELL THERAPY AGAINST EpCAM+ TUMORS ..... 59
- GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS GAA KNOCK-OUT COMO MODELO PARA LA ENFERMEDAD DE POMPE ..... 60
- BIOIMPRESIÓN DE TUMORES EN DISPOSITIVOS METASTASIS-ON-A-CHIP: ¿EL FUTURO DE LA MEDICINA PERSONALIZADA? ..... 61
- ORGANELLE-MOLECULAR MECHANISMS OF MUSCLE NON-SHIVERING THERMOGENESIS IN RESPONSE TO MELATONIN IN OBESE DIABETIC ZDF RATS ..... 62
- MICROGLIA REDUCE ASTROCYTE VIABILITY IN THE AUTO-IMMUNE DISEASE NEUROMYELITIS OPTICA ..... 63
- EFFECT OF DOXYCYCLINE AND DEXAMETHASONE NANOPARTICLES ON SHEAR BOND STRENGTH TO DENTIN AFTER COLLAGENASE CHALLENGING ..... 64
- CONSTRUCTION OF A BIOLOGICAL SUBSTITUTE OF THE HUMAN URETHRA TUNICA ALBUGINEA BY TISSUE ENGINEERING ..... 65
- FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF A TISSUE-ENGINEERED URETHRAL CONSTRUCT ..... 66
- TORSIONAL WAVE ELASTOGRAPHY AS A DIAGNOSTIC TOOL FOR SKIN CANCER: AN ACCURACY ASSESSMENT ..... 67
- EARLY DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER THROUGH MIRNA BIOMARKER ANALYSIS ..... 68

- **INNOVATIVE METHOD BASED ON PANCREATIC PROENZYMES TO DISRUPT TUMOR SUPPORT FROM CANCER-ASSOCIATED FIBROBLASTS IN THE MICROENVIRONMENT OF PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA ..... 69**
- **CAN A SIMPLE TEST SUCH AS HANDHELD DYNAMOMETRY BE ASSOCIATED WITH TEMPORAL SUMMATION OF PAIN IN CHRONIC PRIMARY LOW BACK PAIN? THE HEALTHYBACK PROJECT..... 70**
- **PREDICCIÓN DEL COLOR DE MATERIALES CAD-CAM DE ESPESORES VARIABLES SOBRE SUSTRATOS DE DIFERENTES COLORES ..... 71**
- **UNA NOVEDOSA APROXIMACIÓN PARA EVALUAR LA INMUNIDAD CELULAR MEDIADA POR CÉLULAS T USANDO VESÍCULAS EXTRACELULARES..... 72**



**ÍNDICE DE RESÚMENES DE COMUNICACIONES ORALES**  
**ORAL PRESENTATION INDEX**

## MODULACIÓN ANTI-INFLAMATORIA DEL COLON EN PACIENTES CON ILEOSTOMÍA DERIVATIVA A TRAVÉS DE LA REHABILITACIÓN DE LA MICROBIOTA COLÓNICA

Carrillo-Acosta, A<sup>1,2</sup>; Carolina Gómez-Llorente<sup>2,3,4</sup>; Conde-Muiño R<sup>1,2</sup>; Torres-Alcalá T<sup>1</sup>; Villar-Del Moral JM<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, Spain. <sup>4</sup> Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos José Mataix, Granada, Spain

La ileostomía derivativa, realizada tras la cirugía del cáncer de recto, impide el paso del contenido intestinal -quimo- a colon y recto. Este recurso quirúrgico se utiliza con la intención de disminuir el riesgo de dehiscencia anastomótica y sus potenciales complicaciones asociadas. Como consecuencia de la ausencia de tránsito colónico se produce una alteración de la microbiota normal (disbiosis), una inflamación local (colitis de exclusión), y una atrofia neuromuscular por la ausencia de motilidad colónica y función defecatoria. Una ileostomía puede mantenerse por un periodo de unos 12 meses. Este grupo de trabajo ha desarrollado un compuesto funcional y nutricional con la intención de restaurar la motilidad colónica, la función defecatoria, y el aporte nutricional. El objetivo de este grupo es estudiar el efecto de este nuevo compuesto como modulador anti-inflamatorio del colon, rehabilitador de la microbiota intestinal y la función defecatoria, y su efecto concomitante en la quimioterapia adyuvante en pacientes con ileostomía. En un primer estudio piloto de intervención nutricional se va a administrar este producto funcional en 10 pacientes intervenidos mediante resección de recto e ileostomía con la intención de probar su seguridad (reacciones adversas y efectos secundarios), la capacidad formadora de heces normales (diario defecatorio, escala Bristol y escala LARS), su dosis útil más frecuente y la aplicabilidad durante un periodo de un mes (cuaderno del paciente). Además, se va a comparar la microbiota en dos tiempos, antes de iniciar la intervención nutricional y al mes de la misma, para analizar variaciones en su composición poblacional, en particular las asociadas a un estado pro-inflamatorio del colon. La determinación de la composición de la microbiota intestinal se realizará de la siguiente manera: las muestras se mantendrán congeladas a -80°C. Posteriormente se obtendrá el DNA mediante el kit QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Barcelona, Spain). Se comprobará la calidad y la cantidad del mismo espectrofotométricamente (NanoDrop ND-100). Se amplificará 600pb correspondientes a la región variable V3-V1 del gen 16S rRNA usando oligonucleótidos específicos (barcoded). A continuación, se llevará a cabo la PCR en un volumen final de 15 µl que contendrá los oligonucleótidos barcode y los oligonucleótidos específicos de las distintos géneros, familias y especies bacterias objetos de estudio. El producto de PCR será pirosecuenciado en la plataforma Roche/454 GS titanium technology (Branford, CT, USA). Para el análisis de las muestras, se obtendrán los correspondientes ASV (Amplicon Sequence Variance), y se normalizarán mediante rarefacción. Para la determinación taxonómica se usará la base de datos Greengenes.



## CÁNCER DE PÁNCREAS Y DISFUNCIÓN ENDOCRINA: NUEVAS FRONTERAS EN ONCO-METABOLISMO

Nieves Casillas-Ruiz <sup>1,2</sup>, Carmen Griñán-Lisón <sup>1,2,3,4</sup>, María Trinidad Villegas <sup>5</sup>, Lukas E. Dow <sup>6</sup>, María Paz Zafra <sup>1,2,3,7</sup>, Juan Antonio Marchal <sup>1,2,3,7</sup>, Alfonso Rubio-Navarro <sup>1,2,3,8</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), Granada, España. <sup>3</sup> Unidad de Excelencia de Investigación " Modeling Nature " (MNat), Universidad de Granada, España. <sup>4</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad de Granada, España. <sup>5</sup> División de Cirugía, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, España. <sup>6</sup> Sandra and Edward Meyer Cancer Center, Weill Cornell Medicine, Nueva York, NY, EE.UU. <sup>7</sup> Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Universidad de Granada, España. <sup>8</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad de Granada, España.

El cáncer de páncreas, particularmente el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), es una de las neoplasias más agresivas, con una supervivencia a cinco años inferior al 13%. Existe una asociación bidireccional entre PDAC y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Mientras que la DM2 de larga duración incrementa el riesgo de desarrollar PDAC (1,5 a 2 veces), estudios epidemiológicos han demostrado que este riesgo se multiplica por 4 a 8 en pacientes con DM reciente (1 a 3 años de duración). Notablemente, hasta un 85% de los pacientes con PDAC presentan hiperglucemia que se manifiesta con frecuencia de 2 a 3 años antes del diagnóstico, sugiriendo una relación causal.

Nuestra investigación busca desentrañar los mecanismos subyacentes a esta disfunción endocrina inducida por el PDAC. A través de un modelo preclínico en ratones basado en organoides, hemos identificado que el PDAC afecta significativamente la homeostasis de la glucosa y a la función de las células  $\beta$  pancreáticas, promoviendo su desdiferenciación. Además, factores secretados por el microambiente tumoral parecen desempeñar un papel clave en este proceso.

Complementamos estos hallazgos con estudios transcriptómicos en células endocrinas humanas obtenidas de pacientes con PDAC, lo que nos permitió identificar posibles reguladores moleculares implicados en la disfunción de los islotes pancreáticos.

Estos hallazgos amplían nuestra comprensión sobre la interacción entre el PDAC y la disfunción de las células  $\beta$  en la DM asociada al PDAC. Esta investigación abre el camino para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a restaurar la función endocrina normal y mejorar los resultados en pacientes con DM asociada al PDAC. Al identificar posibles dianas farmacológicas, nuestro objetivo es proporcionar un abordaje más efectivo para el manejo integral de estos pacientes, impactando positivamente tanto en su control metabólico como en el tratamiento oncológico.

## NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL ANÁLISIS DE LA ETIOLOGÍA DE PATRONES EXTREMOS DE INFERTILIDAD MASCULINA

Andrea Guzmán-Jiménez<sup>1,2</sup>, Sara González-Muñoz<sup>1,2</sup>, Miriam Cerván-Martín<sup>3</sup>, José A. Castilla<sup>2,4</sup>, M. Carmen Gonzalvo<sup>2,5</sup>, Ana Clavero<sup>2,5</sup>, Marta Molina<sup>2,5</sup>, Nicolás Garrido<sup>6</sup>, Lluís Bassas<sup>7</sup>, Susana Seixas<sup>8,9</sup>, João Gonçalves<sup>10,11</sup>, Alexandra M. Lopes<sup>9,12</sup>, Sara Larriba<sup>13</sup>, Rogelio J. Palomino-Morales<sup>2,14</sup>, F. David Carmona<sup>1,2</sup>, Lara Bossini-Castillo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; <sup>3</sup>Institute of Parasitology and Biomedicine López-Neyra (IPBLN), CSIC, Granada, Spain; <sup>4</sup>Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Spain; <sup>5</sup>Unidad de Reproducción, UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Granada, Spain; <sup>6</sup>IVIRMA Global Research Alliance, IVI Foundation, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain; <sup>7</sup>Laboratory of Semiology and Embryology, Andrology Service-Fundació Puigvert, Barcelona, Spain; <sup>8</sup>i3S—Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal; <sup>9</sup>Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal; <sup>10</sup>Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal; <sup>11</sup>ToxOmics—Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, Nova Medical School, Lisbon, Portugal; <sup>12</sup>CGPP-IBMC – Centro de Genética Preditiva e Preventiva, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal; <sup>13</sup>Human Molecular Genetics Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; <sup>14</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada, Granada, Spain.

El estudio de las bases genéticas del fallo espermatogénico grave (SPGF) ha avanzado en los últimos años significativamente gracias a los estudios de asociación del genoma completo (GWAS). Estos permiten investigar millones de variantes genéticas repartidas por todo el genoma, gracias a la existencia de paneles de imputación de alta cobertura que posibilitan obtener información tanto de variantes comunes como raras. Por ello, en este trabajo, empleamos una metodología novedosa para explorar datos de un GWAS previo<sup>1</sup> con el objetivo de conocer mejor tanto los mecanismos multifactoriales como los monogénicos que subyacen al SPGF. La cohorte de estudio comprendía 1.274 pacientes con SPGF y 1.951 controles de origen europeo. En primer lugar, mediante una búsqueda exhaustiva de la literatura y las bases de datos relevantes, se seleccionaron un total de 1.797 genes implicados en el proceso de espermatogénesis. Posteriormente, evaluamos la variación genética común y rara presente en estos genes con un enfoque basado en análisis de polimorfismos individuales mediante regresión logística, que identificó a la variante rs12347237\*T del gen *SHOC1* como factor de riesgo para el desarrollo de SPGF ( $P = 4.15E-06$ , OR = 2.66). Además, esta señal fue replicada en una cohorte ibérica independiente ( $P_{combinada} = 4.15E-06$ , OR = 2.66). Tras esto, realizamos un “burden test” para explorar los efectos acumulativos de variantes raras en los 1.797 genes seleccionados donde, curiosamente, identificamos que en el gen *SHOC1* ( $P = 4.9E-03$ ) había variantes con dicho efecto en el desarrollo de SPGF. Tanto las variantes raras como las comunes identificadas en *SHOC1* se hallaban dentro del mismo bloque haplotípico, afectando a las regiones codificantes y no codificantes del gen. También mediante este enfoque de análisis basado en genes, pudimos identificar tres genes adicionales (*PCSK4*, *AP3B1* y *DLK1*) con un efecto acumulativo significativo ( $P < 5.56E-04$ ) en este tipo de infertilidad masculina. Finalmente, empleamos un novedoso método de detección de mutaciones raras en homocigosis con alto potencial patogénico, con el cual logramos identificar 32 variantes en 35 individuos extremadamente raras y altamente patogénicas, localizadas en regiones codificantes de los genes seleccionados. Este estudio pone de manifiesto cómo tanto las variantes genéticas comunes como las raras contribuyen al desarrollo del SPGF idiopático, evidenciando la complejidad genética de esta condición. Los hallazgos destacan la versatilidad de los GWAS en la identificación de factores genéticos asociados a rasgos complejos, por lo que este enfoque abre nuevas posibilidades para la medicina personalizada en el tratamiento y diagnóstico del SPGF.

<sup>1</sup>Cerván-Martín M, *et al.* Immune and spermatogenesis-related loci are involved in the development of extreme patterns of male infertility. *Communications biology*. 2022; 5(1):1220.

## COMPLICACIONES PRECOCES DEL IMPLANTE DE VÁLVULA AÓRTICA PERCUTÁNEA (TAVI)

Antonio Padilla-Serrano, M.D., Ph.D., Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares, Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España. Grupo de investigación biosanitaria ibs.Granada TEC23-Laboratorio para la Investigación en Medicina Intensiva y Educación Médica (INTENSIVEEDUCATIONLAB). E-mail: [antoniopadillaserrano@yahoo.es](mailto:antoniopadillaserrano@yahoo.es)

Antonio Cárdenas Cruz, M.D., Ph.D., Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares, Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España. Profesor de Medicina. Universidad de Granada. Grupo de investigación biosanitaria ibs.Granada TEC23-Laboratorio para la Investigación en Medicina Intensiva y Educación Médica (INTENSIVEEDUCATIONLAB). E-mail: [cardenasacruz@ugr.es](mailto:cardenasacruz@ugr.es)

La estenosis aórtica degenerativa se está convirtiendo en una enfermedad cada vez más prevalente donde el implante percutáneo de la válvula aórtica (TAVI) ha supuesto una opción de tratamiento para un grupo de pacientes en los cuales no estaba indicada la cirugía por su elevado riesgo quirúrgico. Las complicaciones que pueden ocurrir durante el implante de la TAVI o inmediatamente después del procedimiento incluyen: problemas cardiovasculares, lesión de órganos y muerte. Estas complicaciones precoces relacionadas con la TAVI son poco frecuentes. En cambio, el delirio es muy prevalente en esta población que recibe una TAVI, el cual se asocia a un mayor riesgo de mortalidad.

Nuestro grupo de investigación va a realizar un estudio prospectivo de tipo observacional longitudinal cuyo objetivo va a ser analizar las complicaciones que pueden ocurrir durante el implante de la TAVI o inmediatamente después del procedimiento durante su ingreso en el Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Es importante realizar este estudio para identificar los factores de riesgo, mejorar las estrategias de prevención y tratamiento y optimizar los resultados a corto plazo de los pacientes sometidos a este procedimiento. Esto permitirá mejorar la seguridad y eficacia de la técnica, así como, mejorar la calidad de vida de los pacientes y reducir la carga económica asociada a estas complicaciones precoces.

Se dispone del informe favorable del Comité de Ética de la Investigación.

## ACCIÓN DE LOS BISFENOLES SOBRE LAS CÉLULAS FORMADORAS DE HUESO

De Luna-Bertos E1., García-Recio E2., Costela-Ruiz VJ1., Ruiz C1.

<sup>1</sup> Departamento de Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Granada. Grupo Tec-17. Ibs.Granada. <sup>2</sup> Departamento de Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud, Campus de Melilla. Universidad de Granada. Grupo Tec-17. Ibs.Granada.

El efecto que producen los Bisfenoles (BPs) sobre el tejido óseo, a día de hoy, sigue siendo un tema controvertido, por el número reducido de estudios que analizan el efecto y el posible mecanismo de acción de estas sustancias sobre las células formadoras de hueso. Esta falta de conocimiento nos hace plantearnos como objetivo analizar el efecto de distintos BPs (BPA, BPS, BPF y BPAF) sobre la fisiología del osteoblasto.

### Metodología

Se establecieron cultivos primarios de osteoblastos humanos, a partir de donantes sanos, previo consentimiento informado. Las líneas celulares de osteoblastos humanos se expusieron a BPA, BPF, BPS o BPAF en concentraciones de 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> o 10<sup>-7</sup> M durante 24 h; osteoblastos no tratados sirvieron como grupo control. Se estudió la proliferación celular, la inducción de apoptosis, la actividad fosfatasa alcalina (ALP), la mineralización a los 7, 14 y 21 días de cultivo en un medio osteogénico y la expresión de genes osteoblásticos (ALP, COL-1, OSC, RUNX2, OSX, BMP-2, BMP-7, RANKL, OPG, TGF-β1, TGFR1, TGFR2, TGFR3 y VEGF) mediante RT-PCR.

### Resultados

La capacidad proliferativa de osteoblastos humanos después de 24 h de tratamiento con BPA, BPF y BPS se vio inhibida de manera dependiente de la dosis, dicho efecto es atribuido a la inducción de apoptosis. Mientras que el tratamiento con el BPAF no mostró efecto sobre la proliferación o viabilidad celular. La diferenciación celular se vio afectada negativamente por el tratamiento con los BPs de forma dosis-dependiente, observándose un descenso en la síntesis de fosfatasa alcalina y una reducción en la formación de nódulos de calcio a los 21 días, para los distintos BPs analizados. Efecto también observado a los 14 días con el BPA.

En cuanto a la expresión génica de marcadores osteogénicos con funciones clave en la maduración y función de los osteoblastos (ALP, COL-1, OSC, RUNX2, OSX, BMP-2 y BMP-7) observamos cambios significativos, que se traducen en una disminución de la expresión génica, de manera dependiente de la dosis, en presencia de los distintos BPs. Paralelamente, la expresión de marcadores implicados en la formación y resorción ósea (RANKL, OPG, TGF-β1, TGFR1, TGFR2, TGFR3 y VEGF) también se reguló a la baja en función del BP y la dosis.

### Conclusión

Estos resultados ponen de relieve que la exposición a BPs produce efectos nocivos sobre el osteoblasto; al inhibir su crecimiento, diferenciación y función a través de la disminución en la síntesis de ALP y la mineralización; así como, cambios en la expresión génica que puede desestabilizar el equilibrio homeostático del tejido óseo, lo que podría tener importantes consecuencias a largo plazo para la salud ósea.

## COMPORTAMIENTO ÓPTICO DE LAS RESINAS BIOCOMPATIBLES IMPRESAS EN 3D: APLICACIÓN EN RESTAURACIÓN DENTAL

María M. Pérez<sup>a</sup>, Cristina Espinar<sup>a</sup>, María Tejada-Casado<sup>a</sup>, Álvaro Della Bona<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Optics, Faculty of Science, Campus Fuentenueva, University of Granada, Edificio Mecenas, s/n, 18071 Granada, Spain. Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, E18011 Granada, Spain. <sup>b</sup> Post-Graduate Program in Dentistry, Dental School, University of Passo Fundo, Campus I, Passo Fundo, RS, Brazil

### Objetivos

Evaluar la influencia del espesor y el ángulo de impresión sobre las propiedades ópticas de las resinas biocompatibles de restauración dental impresas en 3D.

### Material y Métodos

Se evaluaron cuatro sistemas de resinas 3D: DFT-Detax Freeprint Temp; FP- Formlabs Permanent Crown; FP- Formlabs Temporary CB; and GCT- GC Temporary-. Las muestras de cada material fueron impresas a 0° y 90° y pulidas hasta 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mm de espesor. La teoría de doble flujo de Kubelka-Munk fue empleada para la evaluación del scattering ( $S$ ,  $s'$ ), absorción ( $K$ ,  $a$ ), albedo ( $a$ ), transmitancia ( $T\%$ ), reflectividad ( $RI$ ) y espesor óptico infinito ( $X$ ). Los datos fueron analizados usando los test Kruskal–Wallis, Mann-Whitney y el coeficiente VAF. CIEDE2000 y RTP00 y sus respectivos 50:50% umbrales fueron empleados para evaluar las diferencias de color y translucidez.

### Resultados

El comportamiento espectral de  $S$ ,  $s'$ ,  $K$ ,  $a$ ,  $T\%$ ,  $RI$  y  $X$  es dependiente de la longitud de onda. Aunque el comportamiento fue similar para todos los especímenes, los valores de  $S$ ,  $s'$ ,  $K$ ,  $a$  y  $X$  presentaron diferencias significativas debidas al espesor para ambos ángulos de impresión. Los valores de  $S$ ,  $s'$ ,  $K$ ,  $a$  aumentan con la longitud de onda, mientras and  $T\%$  y  $X$  decrece. Existen diferencias significativas en  $RI$  entre 0° y 90° a 0.5 y 1.0mm de espesor, para  $S$  y  $K$  a 2mm, para  $X$  a 0.5 y 1.0 mm para DFT y FT. En general, los cambios de color son debidos a los cambios en lightness y croma, y  $E_{00} > PT_{00}$ . Los cambios en translucidez son material y shade dependientes

### Conclusiones

Las propiedades ópticas de las resinas restauradoras impresas en 3D varían entre espesores y podrían verse afectadas por la orientación de la construcción. Por lo tanto, estos factores deben tenerse en cuenta para mejorar el potencial biomimético de este tipo de resinas restauradoras. La selección de la orientación de construcción (0° y 90°) para las resinas impresas en 3D influye en el color visual y la translucidez y, por tanto, su aspecto estético. La metodología empleada es óptima para la evaluación óptica de materiales biocompatibles en otras áreas clínicas

## GENERATION OF ARTIFICIAL SKIN BY TISSUE ENGINEERING: CLINICAL RESULTS IN SEVERELY BURNT PATIENTS

Miguel Alaminos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Tissue Engineering Group, Department of Histology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain

The clinical management of burnt patients with large extensions of their body surface affected by deep burns is challenging. In cases in which autografts can be used, the gold-standard treatment is based on the application of unaffected skin on burnt areas [1]. However, patients affected by massive burns are typically devoid of sufficient healthy skin able to cover burnt areas. One possible alternative is the use of bioengineered skin substitutes generated in the laboratory and applied as advanced therapies medicinal products (ATMP). In this regard, the Tissue Engineering Group of the University of Granada developed a novel substitute of the human skin based on fibrin-agarose biomaterials called UGRSKIN, that showed promising preclinical results [2] and was approved by the Spanish Medicines Agency (AEMPS) for compassionate use in severely burnt patients. Recently, UGRSKIN has been authorized by AEMPS for consolidate use as an ATMP for use under the hospital exemption regulation.

In the present work, we analyzed the clinical and histological results obtained with the use of UGRSKIN applied to 12 patients affected by severe skin burns (8 males and 4 females), to determine the clinical usefulness and possible side effects of this novel technology. Results revealed a global survival of 75%, with 9 out of 12 patients surviving to the treatment, whereas 3 patients passed away, mostly due to infection and severe systemic complications. When skin biopsies were obtained from each patient after 30, 60 and 90 days of the treatment, we found that the UGRSKIN was able to integrate in the patient, with no detectable side effects or complications at the histological level. Interestingly, we found that the epithelial layer tended to differentiate, mature and integrate very fast at the burn area, with samples corresponding to day 30 showing clear signs of cell differentiation, including the formation of basal, spinosum, granulosum and corneum strata, and tended to show positive immunohistochemical expression of relevant epidermal markers, such as keratins, filaggrin or involucrin, although some markers required longer *in vivo* follow-up times. However, the stromal layer took larger periods of time to differentiate, and the interface between the grafted skin and the host skin was visible at day 60 of development. Blood vessels were present in the grafted skin from day 30 onwards.

These results confirm the positive effects of UGRSKIN and its capability to improve patient survival and recovery. The grafted skin showed relevant markers of differentiation and was devoid of any detectable complications or side effects.

Supported by grant B-CTS-450-UGR20 (proyectos de I+D+i, Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, University of Granada and Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía, Spain). Cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the “*Una manera de hacer Europa*” program.

1. Orbay H, et al. Challenges in the Management of Large Burns. *Clin Plast Surg.* 2024 Apr;51(2):319-327

2. Martín-Piedra MA, et al. Effective use of mesenchymal stem cells in human skin substitutes generated by tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2019 Mar 29;37:233-249

## HIDROGELES MAGNÉTICOS PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS Y ACTUACIÓN REMOTA

Francisco J. Vázquez-Pérez<sup>1,2</sup>, Alberto León-Cecilla<sup>1,2</sup>, Cristina Gila-Vílchez<sup>1,2</sup>, Modesto T. López-López<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Granada, Departamento de Física Aplicada, Granada 18071, España. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs.GRANADA, Granada 18012, España

\*Correo electrónico: [modesto@ugr.es](mailto:modesto@ugr.es)

Los hidrogeles son sistemas blandos con apariencia similar a un sólido y una estructura interna altamente porosa. Consisten en redes tridimensionales hidrofílicas de cadenas poliméricas hinchadas por agua o fluidos biológicos, lo que los hace similares a la matriz extracelular y los convierte en un foco de investigación biomédica. La inclusión de partículas magnéticas da lugar a hidrogeles magnéticos, que combinan elasticidad con propiedades magnéticas, una característica única ausente en materiales naturales. Estas partículas permiten manipular la estructura interna del hidrogel, modificando sus propiedades macroscópicas y mejorando su funcionalidad. Por ejemplo, el encadenamiento inducido por campos magnéticos genera anisotropía, imitando la arquitectura jerárquica de sistemas biológicos, mientras que los hidrogeles convencionales suelen presentar estructuras isotrópicas.

Esta ponencia revisa los principales avances de nuestro grupo en el campo de los hidrogeles magnéticos, centrándose en aplicaciones de ingeniería tisular y en actuadores flexibles con control remoto mediante campos magnéticos. Antes de la gelificación, las partículas magnéticas pueden migrar y agregarse en patrones definidos, lo que también permite modificar la estructura de la red polimérica del hidrogel, mejorando su estabilidad. Tras la gelificación, las estructuras de partículas permanecen fijas en la red polimérica, creando estructuras alineadas e hidrogeles con memoria de forma. Esto permite desarrollar actuadores capaces de movimientos complejos y aplicaciones avanzadas como bombeo, entrega de carga y biomímesis.

### Agradecimientos

Proyecto PID2023-151913NB-I00 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033/ y por FEDER, UE y proyecto PID2020-118498GB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033, España.

## **COMPARISON OF UPPER LIMB SURGERY VS BOTULINUM TOXIN ON QUALITY OF LIFE OF PATIENTS WITH ACVA. CLINICAL TRIAL**

Patricia Hurtado Olmo, Ángela González Santos, Laura del Olmo Iruela, Belén Castro Ropero, Pedro Hernández Cortés.

Orthopedic Surgery Department and Rehabilitation Department of the San Cecilio Clinical University Hospital of Granada. Ibs.GRANADA-TECe21 Group-Bone Repair, Regeneration and Replacement. Advanced Therapies and Biomedical Technologies/ibs.GRANADA-TECe21.

### **OBJECTIVES**

To demonstrate whether surgical treatment of upper limb spasticity is an effective measure to improve the dependency and quality of life of patients with stroke sequelae compared to toxin treatment.

### **MATERIAL AND METHODS**

Controlled and randomized clinical trial. Intervention: Upper limb spasticity surgery. N=30: Group 1: Toxin (n=15), Group 2: Surgery (N=15). Evaluation of function using the Zancolli, Barthel, Asworth, House, Fugl-Mayer, GAS and VAS scales, evaluation of the patient's quality of life using SF36 scales, New Castle stroke Quality of life measure, SATED sleep scale and of anxiety and depression, and evaluation of the caregiver's burden using the Carer Burden and Zarit questionnaires, at entry into the study and after 6 months. Statistical analysis using t-Student. Significance level  $p < 0.05$

### **RESULTS**

At entry into the study, both groups were homogeneous in age, gender, time of evolution, intensity of spasticity and functional status. We have not observed significant changes in the evaluation of quality of life, function and caregiver burden at 6 months of follow-up in patients treated with toxin.

However, in patients treated by spasticity surgery, we observed improvement in function by the Zancolli scales ( $p=0.003$ ), Fugl Mayer ( $p=0.05$ ), GAS ( $p<0.001$ ), and a decrease in spasticity. by Asworth scale ( $p<0.001$ ), improvement in the perception of general health ( $p=0.041$ ), limitation of physical health ( $p<0.001$ ) and decrease in caregiver burden by Burden carer scale ( $p<0.001$ ).

### **CONCLUSION**

It is the first randomized clinical trial to compare surgery and toxin on the quality of life of stroke patients, carried out to date. Surgery at 6-month follow-up shows a significant improvement in quality of life, function and caregiver burden, unlike treatment with toxin.

Supported by grant: Research Project (PI20/01574) of the Carlos III Health Institute



## GRAPHENE BIOSENSING PLATFORM FOR RAPID DETECTION AND INTERCONNECTED SURVEILLANCE OF VIRUS OUTBREAKS

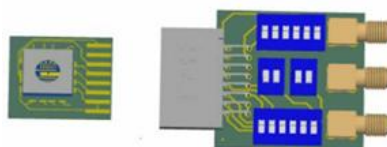
P. Martínez-Mazón<sup>1,2</sup>, E. Fuente-Zapico<sup>1,2</sup>, C. Márquez<sup>1,2</sup>, A. Martínez-García<sup>1</sup>, P. Fernández-Martínez Rey<sup>1</sup>, V. Millán-Calvellido<sup>1</sup>, F. Gámiz<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Graphene and 2D Materials Laboratory, Nanoelectronics Group, Department of Electronics, CITIC-UGR, University of Granada, Spain. <sup>2</sup> Biosanitary Research Institute of Granada ibs.GRANADA, 18012, Granada, Spain.

The integration of advanced data analysis algorithms, cloud networking, and cutting-edge biosensing technology offers a transformative approach to pandemic preparedness and response. The European Project EPOCA introduces an innovative Point-of-Care (PoC) platform based on multiplexed graphene field-effect sensors, each functionalized with specific biomolecules to enable rapid and reliable diagnosis of viral infections such as Ebola. By analyzing peripheral blood samples from suspected patients, the platform delivers accurate diagnostic results, which are then transmitted to a central server for real-time processing using custom-built Artificial Intelligence (AI) software. The AI-driven system identifies unusual epidemiological patterns, trends, or potential public health emergencies, enabling the dissemination of health alerts across interconnected platforms worldwide.

A core objective is to design and manufacture a user-friendly cartridge utilizing multiplexed graphene sensors for efficient sample analysis. Despite the proven high sensitivity of graphene-based diagnostic tools<sup>[1]</sup>, their market availability is limited by challenges in consistent and scalable manufacturing. Recent advances in wafer-scale production and robust functionalization techniques<sup>[2]</sup> have significantly enhanced reliability and reduced costs, paving the way for mass deployment. The project's ambition is to develop a diagnostic test that combines high sensitivity, speed, and ease of use, empowering healthcare professionals with early and accurate disease diagnosis while minimizing operator intervention.

The University of Granada (UGR) will lead the sensor development, from prototype creation to wafer-scale manufacturing. UGR will also design the microfluidic setup for sample flushing and the portable electronic transducer system, which integrates with the Libelium One platform for data readout. UGR will also contribute by developing the cartridge housing the sensors. The list of tasks include a validated chip prototype, wafer-scale production, cartridge integration, and system testing with model samples.



*Figure 1. Printed circuit board for sensor electrical characterization.*

This highly adaptable strategy bridges advanced diagnostics, AI-powered analysis, and real-time data sharing to create a proactive framework for outbreak management. By addressing manufacturing and deployment challenges while ensuring regulatory compliance, the project aims to unlock the full potential of graphene-based devices, enabling their widespread availability. These innovations are critical for enhancing global health response capabilities and reducing the impact of emerging pandemics.

[1] Jiang, Z., Feng, B., Xu, J., Qing, T., Zhang, P., & Qing, Z. (2020). Graphene biosensors for bacterial and viral pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 166, 112471.

[2] Cabral, P. D., Domingues, T., Machado Jr, G., Chicharo, A., Cerqueira, F., Fernandes, E., ... & Borme, J. (2020). Clean-room lithographical processes for the fabrication of graphene biosensors. *Materials*, 13(24), 5728.

## HÁBITOS DE VIDA SALUDABLE, FUNCIÓN BARRERA DE LA PIEL Y BIOMARCADORES DE GRAVEDAD EN DERMATITIS ATÓPICA

Raquel Sanabria de la Torre  
TEC-19 Dermatología Clínica y Traslacional

**Objetivos:** (1) Evaluar el impacto de los hábitos de vida como la adherencia a la dieta mediterránea (DM) y el nivel de actividad física (AF) en la gravedad de la dermatitis atópica (DA); (2) Analizar la función de barrera de la piel en lesiones eccematosas y piel sana de pacientes con DA; (3) Determinar biomarcadores de gravedad en pacientes con DA.

**Metodología:** Se diseñó un estudio transversal donde se incluyeron pacientes con DA que asistieran al Servicio de Dermatología del HUVN. Mediante entrevista clínica se recogieron datos sociodemográficos y mediante exploración física se evaluó la gravedad de la enfermedad con las escalas Body Surface Area (BSA), Eczema Area and Severity Index (EASI), SCORing Atopic Dermatitis (SCORAD), Redness Oedema Scratch (ROS) e Investigator Global Assessment (IGA). La gravedad evaluada por el paciente se analizó con las escalas Patient Oriented Eczema Measure (POEM), Atopic Dermatitis Control Tool (ADCT), Dermatology Life Quality Index (DLQI), Numerical Rating Scale (NRS) del sueño y del picor.

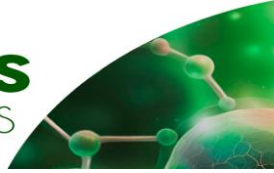
Los hábitos de vida se recogieron con el cuestionario PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) y con el Cuestionario Internacional de Actividad Física (CIAF). Los parámetros de función de barrera de la piel evaluados incluyeron la pérdida transepidérmica de agua (TransEpidermal Water Loss, TEWL), la hidratación del estrato córneo (Stratum Corneum Hydration, SCH), el eritema y la temperatura. Se tomaron muestras de sangre de los pacientes y se analizaron citoquinas con el panel ProcartaPlex™ Human Th1/Th2 Cytokine Panel (ThermoFisher) y el equipo Luminex™100/200™, siguiendo las indicaciones del fabricante.

**Resultados:** La adherencia media a la DM fue moderada con una puntuación 7,55(1,93) y la AF fue ligera con 2265.34 (3098.45) mets. La puntuación PREDIMED mostro una correlación negativa con todas las escalas de gravedad evaluadas por el médico y por el propio paciente. El mayor consumo de vegetales ( $p < 0,001$ ), fruta ( $p < 0,001$ ), pescado ( $p < 0,001$ ) y legumbres ( $p < 0,01$ ) se asoció con una menor gravedad de la DA. De igual forma, el menor consumo de mantequilla ( $p < 0,01$ ), repostería ( $p < 0,01$ ) y mayor consumo de vegetales ( $p < 0,001$ ) o sofritos ( $p < 0,01$ ) se asociaron con una mejor calidad de vida de los pacientes. La puntuación CIAF se correlacionó negativamente con la gravedad de la DA. A mayor gravedad de la DA los pacientes caminan menos ( $p = 0,05$ ). A mayor prurito menor AF intensa ( $p = 0,003$ ) y mayor sedentarismo ( $p = 0,002$ ). La función barrera de la piel esta alterada en los pacientes con DA, mostrando una temperatura, TEWL y eritema elevados y una SCH disminuida, tanto en piel sana como en piel afectada. La TEWL se incrementa y la SCH disminuye en respuesta a fármacos biológicos como dupilumab, lo que indica que podrían emplearse como biomarcadores de respuesta al tratamiento. Finalmente, se describieron perfiles de citoquinas asociados a distintos grados de la enfermedad, y se describen IL-12 ( $r = 0,043$ ,  $p = 0,005$ ), IL-13 ( $r = 0,43$ ,  $p = 0,003$ ), IL-2 ( $r = 0,50$ ,  $p = 0,04$ ), IL-1 beta ( $r = 0,47$ ,  $p = 0,001$ ) e IFN gamma ( $r = 0,49$ ,  $p = 0,008$ ) con una fuerte asociación a la gravedad de la DA. IL-4 ( $p = 0,01$ ) e IL-12 ( $p = 0,01$ ) se asociaron al desarrollo de alergias alimentarias. IL-18 se asoció con una peor función de la barrera epidérmica, encontrándose elevada con el aumento de la descamación y rugosidad en piel sana y eccema de pacientes con DA.

**Conclusiones principales:** La baja adherencia a la DM y niveles disminuidos de AF se asociaron a mayor gravedad de la DA. El prurito ejerce una influencia perjudicial sobre la realización de AF vigorosa y de actividades diarias como caminar en los pacientes con DA.

La función de barrera epidérmica está alterada en piel sana y eccematosa de los pacientes con DA, lo que se reflejó en una temperatura, eritema y TEWL elevados y una SCH disminuida. TEWL y SCH podrían ser útiles como biomarcadores de respuesta a fármacos.

IL-12, IL-13, IL-2, IL-1 beta e IFN gamma se encuentran incrementadas en los pacientes más graves. IL-4 e IL-13 se asociaron al desarrollo de alergias alimentarias y la IL-18 con peor función de la barrera epidérmica.



**ÍNDICE DE RESÚMENES PRESENTADOS EN FORMATO PÓSTER**  
**POSTER ABSTRACT INDEX**

## OPTIMIZATION OF AN ULTRARAPID DECELLULARIZATION PROTOCOL FOR HUMAN LIMBAL SUBSTITUTES IN LIMBAL STEM CELL DEFICIENCY THERAPY

Paula Ávila-Fernández<sup>1,2</sup>, Miguel-Ángel Martín-Piedra<sup>1,2</sup>, Antonio Campos<sup>1,2</sup>, Carmen González-Gallardo<sup>2,3</sup>, Víctor Carriel<sup>1,2</sup>, Fernando Campos<sup>1,2</sup>, Miguel Alaminos<sup>1,2</sup>; Jesús Chato-Astrain<sup>1,2</sup>, Óscar Darío García-García<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Histology and Tissue Engineering Group, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.

Limbal stem cell deficiency (LSCD) is associated to a functional impairment of the normal turnover and homeostasis of the corneal epithelium due to an alteration or dysfunction of the limbal epithelial stem cells (LESCs), allocated in the sclero-corneal limbus. Current treatments present several disadvantages and results are suboptimal. In this regard, a possible therapeutic alternative could be the use of bioengineered limbal substitutes generated by decellularization. Decellularization techniques allow the generation of cell-free structures in which the architecture and the extracellular matrix (ECM) components of the tissue are preserved. The objective of this study is to develop a human sclero-corneal limbus substitute using an optimized ultrarapid decellularization protocol for the future treatment of patients affected by LSCD.

Native limbi were decellularized using a previously described decellularization method [1] and a novel ultrarapid protocol developed by the research group. Assessment of decellularization efficiency was carried out by evaluating DNA removal, ECM preservation and biocompatibility. Then, mesenchymal stem cells (MSC) and LESCs were used to generate a recellularized limbal structure. Recellularized limbi were maintained for 7 days in culture and histological and immunohistochemical analyses were performed.

Both protocols achieved effective decellularization results, optimal for limbal decellularization. Histological analysis showed that both limbal substitutes were able to sustain cell adhesion and proliferation of all cell types used in this study, with some types of cells generating a multilayered epithelium with increasing number of cell layers. The immunohistochemical analysis of relevant limbal markers revealed positive expression of several proteins typical of epithelial cells, such as the cytokeratin cocktail AE1/AE3, and specific proteins related to limbal and corneal transparency and function in both limbal substitutes and in most cell types, although differences among cell types were detected.

This study developed an efficient ultrarapid decellularization protocol able to generate decellularized sclero-corneal limbi with potential usefulness in tissue engineering. This protocol was able to preserve the structural complexity of the human limbus, showing promising results regarding cell adhesion and proliferation of different cell types. Future studies should determine the possibility of generating more biomimetic limbal substitutes using conditioning culture media and longer development times.

Supported by grant PI-0086-2020, by Consejería de Salud y Consumo, Junta de Andalucía, Spain. Supported by grant B-CTS-504-UGR20, proyectos de I+D+i en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014–2020, Universidad de Granada and Consejería de Universidad, Investigación e Innovación, Junta de Andalucía. Co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF) through the “*Una manera de hacer Europa*” program, European Union.

[1] Poliseti N, et al. A Decellularized Human Limbal Scaffold for Limbal Stem Cell Niche Reconstruction. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(18):10067

## DECONSTRUCTING mRNA-LNP SYSTEM: ANALYSIS OF ENCAPSULATED mRNA IN THE LIPIDIC NANOPARTICLES BY (IP-RP) UHPLC/DAD AFTER EXTRACTION AND ISOLATION

Pilar Baena Álvarez<sup>1,2</sup>, Anabel Torrente López<sup>3</sup>, Jesús Hermsilla Fernández<sup>4</sup>, Antonio Salmerón García<sup>2,5</sup>, José Cabeza Barrera<sup>2,5</sup>, Natalia Navas Iglesias<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Analytical Chemistry Department, Science Faculty, University of Granada, Granada, Spain. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> Center of Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center, Leiden Netherlands. <sup>4</sup> Research and Development Department, Vircell S.L., Granada, Spain. <sup>5</sup> Pharmacy Service, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain.

SARS-CoV-2 pandemic revolutionized science through the development of vaccines based on messenger ribonucleic acid (mRNA) encapsulated in lipid nanoparticles (LNPs), known as the mRNA-LNP system (Fig.1). LNP-mRNA has been a major scientific contribution, revolutionizing biopharmaceuticals and accelerating new therapies in trials. However, mRNA-LNPs still present complex analytical challenges, which has led the European Medicines Agency to point out the need for developing quality control methodologies for these therapeutic and preventive systems. Despite their commercialization, studies on their stability and conformation are still ongoing.

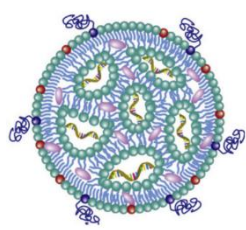


FIG SEQ FIG\\* ARABIC 1: mRNA-LNPs [1]

The present research work is framed in a wider study to deconstruct the mRNA-LNP, with the aim of developing methodologies and analytical strategies for the analysis of the critical quality attributes of this new therapeutic system in order to assess stability in real use conditions, i.e. previously to patient administration. As model, this research uses the Comirnaty® vaccine (Pfizer-BioNTech) and it focuses on the quantification of the mRNA present in the vaccine formulation. Among the different liquid chromatographic modes, ion pairing-reversed phase (IP-RP) was selected by its capability of separating RNA of different size, including those of 4000 nt.

Previous sample treatment steps were required to extract and isolate the mRNA from the reconstituted vaccine, which were developed and optimized in our own previous research studies [2,3]. This includes the use of an organic solvent extraction to isolate the mRNA, discarding the lipid fraction [2]. The mRNA pellet obtained was reconstituted in triethylammonium acetate (TEAA) for ion pairing by sonicating the solution using an ultrasound bath in order to break the mRNA tangles clearly detected by transmission electron microscopy (TEM) [3], which prevented the further analysis by ultra-high performance liquid chromatography with diode array detection (UHPLC/DAD).

For (IP-RP)UHPLC/DAD analysis, once selected the RP column suitable for the analysis of intact mRNA (Agilent, 4000 A), the experimental parameters affecting the analytical signal were optimized, i.e. mobile phase composition (TEAA/acetonitrile) and gradient applied, column temperature (65 °C), mobile phase flow (0,3 ml/min), DAD chromatographic acquisition wavelength (214 nm and 260nm) and injection volume (20 µL). The characteristic mRNA UV-spectrum was used to evaluate the results obtained throughout this optimization step. Satisfactory chromatograms have been obtained by this method with peaks well assigned to the presence of mRNA that allow their quantification.

[1] Yu, X., Yu, C., Wu, X., Cui, Y., Liu, X., Jin, Y., Li, Y., & Wang, L. (2023). Validation of an HPLC-CAD Method for Determination of Lipid Content in LNP-Encapsulated COVID-19 mRNA Vaccines. *Vaccines*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/vaccines11050937>

[2] P Baena Álvarez, Estrategias analíticas para el análisis del ARN mensajero encapsulado en nanopartículas lipídicas de la vacuna contra la covid-19 Comirnaty®, Tutora: Natalia A. Navas Iglesias, Degree in Chemistry, University of Granada, academic year 2023-24. 2nd Prize for the best TFG by the Association of Chemists of Andalusia (AQA) 2022-23.

[3] P Baena Álvarez, Deconstruyendo la vacuna para la covid-19 Comirnaty® (Pfizer): evaluación de diferentes tratamientos de extracción y aislamiento del ARNm contenido en las nanopartículas lipídicas, Tutora: Natalia A. Navas Iglesias, Master's Degree in Biotechnology, University of Granada, date defence July 2024, academic year 2023-24.

## IMPLICACIÓN DE GCasa y LRRK2 EN LA RUTA AUTOFAGIA-LISOSOMA Y SU PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Alicia Bautista-García<sup>1,3</sup>, María Isabel Siervo<sup>3</sup>, Clara Ruz<sup>2</sup>, Sara Bandrés-Ciga<sup>2,4</sup>, Francisco J. Barrero<sup>2,5</sup>, Juan Carlos Romero<sup>2,6</sup>, Adolfo Mínguez<sup>2,6</sup>, Francisco Arrebola<sup>3,7</sup>, Francisco Vives<sup>1,2,3</sup>, Raquel Duran<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria "ibs.GRANADA", Granada, España. <sup>3</sup> Instituto de Neurociencias "Federico Olóriz", Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Granada, España. <sup>4</sup> Molecular Genetics Section, Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Bethesda, USA. <sup>5</sup> Servicio de Neurología, Hospital Universitario Clínico San Cecilio, Granada, España. <sup>6</sup> Servicio de Neurología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España. <sup>7</sup> Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada España.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente después del Alzheimer, y su origen se debe principalmente a la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. Se han identificado variantes genéticas que incrementan el riesgo de desarrollar la EP, destacando las mutaciones en los genes GBA1 y LRRK2. Las mutaciones en GBA1 reducen la actividad de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa (GCasa), una enzima clave en la vía lisosomal, mientras que las alteraciones en LRRK2 aumentan la actividad de su dominio quinasa. Estos factores representan las principales causas genéticas asociadas a la EP.

Estudios previos han evidenciado que una disminución en la actividad de GCasa junto con un aumento en la actividad quinasa de LRRK2 conduce a la acumulación de glucosilceramida, lo que interfiere en la entrada y degradación de la  $\alpha$ -sinucleína en los lisosomas. Esta disfunción promueve la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y, en última instancia, la muerte neuronal. Sin embargo, todavía no se comprende completamente cómo interactúan la quinasa LRRK2 y GCasa en la alteración de la función lisosomal en casos de EP esporádica. Este vacío de conocimiento subraya la necesidad de profundizar en las bases moleculares de esta enfermedad para avanzar en el desarrollo de tratamientos efectivos.

En este contexto, se analizó la actividad y concentración de proteínas implicadas en la vía lisosomal, como GCasa, catepsina D,  $\alpha$ -sinucleína, prosaposina y LAMP2, utilizando un modelo de neuroglioma humano. Las células fueron tratadas con un inhibidor selectivo de la actividad quinasa de LRRK2 (LRRK2-in-1) y un inhibidor irreversible de GCasa (CBE), incubándolas durante 24 y 72 horas. Los resultados mostraron que el tratamiento con el inhibidor de LRRK2 aumentó tanto la actividad como la concentración de GCasa y catepsina D, además de reducir significativamente los niveles de  $\alpha$ -sinucleína.

Estos hallazgos sugieren que la función lisosomal podría regularse a través de la actividad de la quinasa LRRK2, lo que abre nuevas vías para explorar enfoques terapéuticos en la EP.

## **CA21113: ADVANCING GENOME EDITING FOR HUMAN DISEASES. SECOND YEAR ACHIEVEMENTS OF THE GenE-HumDI COST ACTION COLLABORATIVE NETWORK**

Karim Benabdellah<sup>1</sup>, Francisco J Molina-Estevez<sup>1</sup>, Rasmus O. Bak<sup>2</sup>, Carsten W. Lederer<sup>3</sup>, Ayal Hendel<sup>4</sup>, Laura Torella<sup>5</sup>, Merita Xhetani<sup>6</sup>, Francisco Martin<sup>1,7,8</sup>, Paula Rio<sup>9</sup> Yonglun Luo<sup>2</sup> and Alessia Cavazza<sup>10</sup>

<sup>1</sup>GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, Avenida de la Ilustración 114, 18016 Granada, Spain, <sup>2</sup>Department of Biomedicine, Aarhus University, 8000 Aarhus, Denmark, <sup>3</sup>Department of Molecular Genetics Thalassaemia, The Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Nicosia, Cyprus, <sup>4</sup>Institute of Nanotechnology and Advanced Materials, The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan 52900, Israel, <sup>5</sup>DNA & RNA Medicine Division, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, 31008, Pamplona, Spain <sup>6</sup>Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tirana, Tirana, Albania. <sup>7</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology III and Immunology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain. <sup>8</sup>Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University of Granada, Granada, Spain. <sup>9</sup>Hematopoietic Innovative Therapies Division, Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIEMAT/CIBERER), 28040 Madrid, Spain. <sup>10</sup>Infection, Immunity and Inflammation Research and Teaching Department, Great Ormond Street Institute of Child Health, University College London, 20 Guilford Street, WC1N 1DZ, London, UK

Recent advances in genome editing (GE) technologies have unveiled unprecedented opportunities for treating diseases through precise modifications of patients' genomes. Despite promising results in animal models and ongoing clinical trials for genetic disorders, infectious diseases, and cancer, the insufficient integration of academic research into pharmaceutical companies' development strategies, limited interest in regulatory science, and the absence of established standards have hindered the widespread application of these technologies for treating human diseases. The GenE-HumDi COST action is a fast-growing European network that brings together >250 scientists from 26 different countries and seeks to pull to pieces the barriers hindering the advancement of GE technologies for treating human diseases by fostering robust collaboration among pharmaceutical companies, academic institutions, scientific and regulatory agencies, and patient advocacy groups. Our primary goal is to expedite the clinical translation of GE technologies by addressing fragmented knowledge and establishing standardized procedures and guidelines. Through the creation of a synergistic network of GE groups, GenE-HumDi coordinates efforts to enhance current GE protocols, conduct safety assessments, optimize delivery methods, promote clinical applications, and develop regulatory guidelines. This is accomplished through regular scientific meetings, development of training courses, and the sharing of data and materials, ensuring high scientific quality and reproducibility. A critical focus of our initiative is the establishment of standard operating procedures for GE safety assessments and delivery methods, as well as the comparison of different approaches to estimate off-target effects. Here, we aim to present all the activities GenE-HumDI has undertaken during the first two years of the Action. The first annual GenE-HumDi meeting in Granada, Spain (2023), and the second in Limassol, Cyprus (2024), have been instrumental in sharing recent advancements and enhancing communication among all relevant stakeholders, resulting in our first collaborative paper outlining the roles of GenE-HumDi members in advancing in the GE field. GenE-HumDi pays special attention to young researchers and to the geographical spread of knowledge into less research-intensive countries, and as such, regularly provides Inclusiveness Target Country (ITC) Conference Grants to Young Researchers and Innovators (YRI) working in ITCs and funds Short Term Scientific Missions (STSM) to foster collaboration among research groups within the network. With a special focus to train YRIs, GenE-HumDi also organizes Training Schools on different GE topics, as well as Genome Editing Chat webinars led by top researchers in the field and showcasing the latest advancements in GE. Overall, GenE-HumDI has created a strong international and collaborative network of experts in the field and strives to accelerate the translation of gene editing technologies for the treatment of human diseases, through creation of knowledge exchange activities among the Action's members. Alongside showcasing its main outcomes, GenE-HumDi is looking forward to expanding its network and welcomes proposals for organizing future activities within the field of genome editing.

## DEVELOPMENT OF ACTIVATION-INDUCIBLE PROMOTERS FOR THE IMPROVEMENT OF CAR-T THERAPY

C Blanco-Benitez<sup>1,2</sup>, P Fernandez-Coca<sup>1</sup>, P Garcia-Tirado<sup>1</sup>, P Justicia-Lirio<sup>2</sup>, M Tristan-Manzano<sup>3</sup>, J Martin-Campos<sup>2</sup>, V Ayllon<sup>1,2</sup>, F Martin<sup>2,4</sup>.

<sup>1</sup> Department of Cellular Biology, Faculty of Science, University of Granada, Granada, Spain <sup>2</sup> Department of Genomic Medicine, Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), PTS, Granada, Spain <sup>3</sup> LentiStem Biotech <sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology III and Immunology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain.

Tumour immunotherapy aims to enhance the immune system to eliminate tumour cells specifically. One type of immunotherapy that is achieving the best results is based on the genetic modification of T cells to generate CAR-T (“Chimeric Antigen Receptors”). Specific anti-CD19 CAR-T cells have achieved unprecedented successes in patients with refractory B-cell malignancies. However, there is still a lot of room for improvement due to the strong side effects, such as Cytokine Release Syndrome and neurotoxicity due to overactivation of CAR-T cells where or when they should not. The ability to turn transgene expression on and off at exactly the right time can therefore significantly improve the safety of this immunotherapy. In this line, different activation-inducible promoters based on the consensus binding sequence of the transcription factor NFAT (named NFATsyn) have been designed (Zimmermann, K. *et al.* 2020). However, these promoters showed expression in the absence of activation and prolonged expression over time. Optimal control of gene expression requires low background activity in the absence of induction and high activity in the presence of the effector.

In this study we propose to generate more effective CAR-T cells with potentially lower side effects by regulating the expression of bioactive molecules such as IL12 or IL18 in short periods of time through the use of inducible promoters that will start the transcription only after the activation of the T cell. Three chimeric promoters have been designed based on genes involved in the activation of T cells incorporating different combinations of transcription factor binding sites. These promoters were inserted into a lentiviral backbone to express GFP as a reporter gene to track the promoters activity. Primary human T cells were transduced with these GFP-expressing lentiviral vectors through inducible promoters and GFP expression after activation via CD3/CD28 was analysed. We have seen that our promoters increase GFP expression reaching a peak at 8 hours and a minimum at 24 hours. After 24 hours of activation, GFP expression gradually increases until 72 hours when it decreases again. Although our promoters increase GFP expression 5-fold upon activation, they exhibit high basal expression in the absence of activation. Due to this, a second generation of the best candidate has been developed to decrease leaking. This modification has been performed by eliminating fragments of enhancer sequences or by adding a repressor sequence of an endogenous gene involved in the activation of CAR-T cells obtained through RNAseq.



## EFFECTO DE LA CLINDAMICINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DIFERENTES MARCADORES DE CRECIMIENTO EN OSTEÓBLASTOS TRATADOS CON ZOLEDRONATO

Hunayda Bumedién<sup>1</sup>, Francisco Javier Manzano-Moreno<sup>1</sup>, Anabel González-Acedo<sup>2</sup>, Enrique García-Recio<sup>2</sup>, Elvira de Luna-Bertos<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Estomatología, Facultad de Odontología. Universidad de Granada. Grupo BIO277. Grupo Tec-17. ibs.GRANADA. <sup>2</sup> Departamento de Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud. Melilla. Universidad de Granada. Grupo BIO277. Grupo Tec-17. ibs.GRANADA. <sup>3</sup> Departamento de Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Granada. Grupo BIO277. Grupo Tec-17. ibs.GRANADA.

El zoledronato es un bifosfonato (BPs) frecuentemente asociado al desarrollo de osteonecrosis asociada a bifosfonatos (ONB). Además, se ha demostrado que el zoledronato tiene un efecto tóxico sobre el osteoblasto. Estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron que la clindamicina, además de su capacidad antibacteriana, tiene un efecto favorable sobre la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. Sin embargo, desconocemos el efecto que puede tener la asociación de ambos fármacos.

En este estudio nos propusimos analizar si la clindamicina es capaz de contrarrestar el efecto tóxico que el zoledronato ejerce sobre el osteoblasto a nivel del crecimiento, mediante el estudio del efecto de la combinación de clindamicina y zoledronato sobre la expresión génica del Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) y sus receptores en osteoblastos humanos en cultivo.

Los osteoblastos humanos, obtenidos por cultivo primario a partir de fragmentos de hueso mandibular, se cultivaron en presencia de 50 $\mu$ M de zoledronato, 150  $\mu$ g/ml de clindamicina o la combinación de ambos (zoledronato + clindamicina). El análisis de la expresión génica de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ R1, TGF- $\beta$ R2 y TGF- $\beta$ R3, fue realizado con PCR en tiempo real. Para ello se extrajo el ARN mensajero, se realizó la retrotranscripción a ADNc y se procedió a su amplificación mediante termociclado, usando unos cebadores específicos para los genes estudiados diseñados con el programa *Primer3Design*.

El tratamiento de los osteoblastos con 50 $\mu$ M de zoledronato produjo una disminución significativa de la expresión génica de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ R1, TGF- $\beta$ R2 y TGF- $\beta$ R3 respecto al control ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, el tratamiento con clindamicina 150  $\mu$ g/ml produjo un aumento significativo de la expresión génica de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ R1, TGF- $\beta$ R2 y TGF- $\beta$ R3 respecto al control ( $p < 0,001$ ). Finalmente, la combinación de clindamicina 150  $\mu$ g/ml y zoledronato 50 $\mu$ M contrarrestó parcialmente la disminución de la expresión génica de todos los marcadores estudiados como consecuencia del tratamiento con zoledronato.

El uso de dosis bajas de clindamicina es capaz de revertir el impacto negativo del zoledronato sobre la expresión génica de diferentes marcadores de proliferación del osteoblasto en cultivo, lo cual sugiere que la clindamicina podría ser un arma terapéutica eficaz para contrarrestar el efecto negativo de los BPs sobre el hueso, disminuyendo el riesgo de aparición de ONB en estos pacientes.

## CRIBADO DEL TROPISMO TUMORAL DE AAVS EN MODELOS IN VITRO E IN VIVO PARA TERAPIAS DIRIGIDAS AL CÁNCER DE PULMÓN

Cristina Camacho Rubio <sup>1</sup>, Laura Garrido Martín <sup>2,3</sup>, Carmen Griñan <sup>1,2,3,4</sup>, José Manuel Entrena <sup>6</sup>, Yaiza Jiménez Martínez <sup>1</sup>, Esmeralda Carrillo <sup>1,2,3,6,7</sup>, Juan Marchal <sup>1,2,3,6,7</sup>, Florencio Quero <sup>6</sup>, Houria Boulaiz <sup>1,2,3,6,7\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA). Hospitales Universitarios de Granada-Universidad de Granada, 18012 Granada, España. <sup>2</sup>Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, E-18012 Granada, España. <sup>3</sup>Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, E-18016 Granada, España. <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada, 18071 Granada, España. <sup>5</sup>Instituto de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, 18100, Granada, España. <sup>6</sup>Unidad de Investigación "Modelización de la Naturaleza" (MNat). Universidad de Granada, 18016 Granada, España. <sup>7</sup>Departamento de Cirugía y Sus Especialidades, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, E-18012 Granada, España.

La incidencia y la mortalidad del cáncer han aumentado en las últimas décadas alcanzando los 10 millones de muertes en según la Agencia Internacional para la investigación del cáncer (IARC). Con la terapia génica y la medicina personalizada se pueden obtener tratamientos más específicos y con menos efectos adversos. Los virus adenoasociados (AAVs) presentan varios serotipos que muestran preferencias de transducción hacia tejidos específicos y una baja inmunogenicidad.

El objetivo de nuestro estudio es investigar y analizar el tropismo de los distintos serotipos AAVs en diferentes líneas celulares tumorales, con un enfoque particular en células tumorales de cáncer de pulmón.

*In vitro*, se evaluó la eficiencia de transfección y el tropismo de los serotipos AAV2, AAV3, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 y AAVDJ en diferentes líneas tumorales y no tumorales mediante microscopía confocal y Ensignht. *In vivo*, mediante la inyección de células tumorales de las líneas H1944 y H23, se generó en ratones NSG tumores subcutáneos y metastásicos, a estos modelos se les inyectó AAVs ( $10^{12}$ ) intravenosamente. La expresión y localización de los vectores se monitorizó en tiempo real con IVIS Lumina Imaging.

En el ensayo *in vitro* la eficiencia de transfección varió según el serotipo y la línea celular: AAV3 tuvo un rendimiento moderado en H1944, H23 y HeLa; AAV5 y AAV9 destacaron en HeLa; AAV6 mostró alta eficiencia en PANC1 y en cáncer de pulmón, mientras que AAVDJ fue efectivo en HeLa, PANC1, A427 y HCT116. Ninguno de los AAVs analizados mostró tropismo por la línea no tumoral CCD-16Lu. En el ensayo *in vivo*, AAV6 destacó en H23, y AAV5 y AAVDJ en H1944, mostrando tropismo selectivo hacia células tumorales pulmonares tanto en tumor primario como metastático.

Estos resultados sostienen la idea de que los serotipos AAV6, AAV5 y AAVDJ tienen un tropismo selectivo hacia células tumorales pulmonares, situándolos como candidatos prometedores para terapias dirigidas contra el cáncer de pulmón.

## **BIOFABRICATION OF BIOENGINEERED SUBSTITUTES OF THE HUMAN SCLERAL LIMBUS BY TISSUE ENGINEERING. AN IN VIVO STUDY IN LABORATORY RABBITS**

Fernando Campos<sup>1,2</sup>, David Sánchez-Porras<sup>1,2</sup>, Jesús Chato-Astrain<sup>1,2</sup>, Óscar-Darío García-García<sup>1,2</sup>, Miguel-Ángel Martín-Piedra<sup>1,2</sup>, Ingrid Garzón<sup>1,2</sup>, Carmen González-Gallardo<sup>1,2,3</sup>, Miguel Alaminos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Tissue Engineering Group, Department of Histology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; <sup>3</sup> Division of Ophthalmology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.

Several models of the human cornea have been generated by tissue engineering, including the NANOULCOL cornea grafted in patients with severe cornea damage [1]. However, the fine structure and spatial organization of the human sclero-corneal limbus is very difficult to reproduce in the laboratory. In this work, we have generated different models of the human limbus by tissue engineering, and we have evaluated the structure and composition of these models both *ex vivo* and *in vivo* to determine the potential clinical usefulness of these models in patients with limbal deficiency.

Limbal substitutes were generated in the laboratory using different types of biomaterials including decellularization and additive fabrication protocols. Decellularization was carried out by treating native limbi with different physical, chemical and enzymatic agents to remove native cells, as previously reported [2]. Additive fabrication was based on the combination of limbal cells and biocompatible hydrogels to generate a substitute containing stromal cells and epithelial cells organized on the surface, that might partially reproduce the structure of the native human limbus. These bioartificial tissues were analyzed *ex vivo* and grafted *in vivo* at the eye surface of laboratory rabbits.

Results revealed that tissues generated by tissue engineering were properly decellularized and preserved most components of the extracellular matrix, as compared to the native human limbus, including several fibrillar and non-fibrillar components. Analysis of cells in these bioengineered tissues revealed the proper organization of cells, although their organization and differentiation level were low while kept in culture. However, *in vivo* grafting resulted in increased levels of differentiation and 3D organization, with an increased expression of corneal markers such as lumican and keratocan. *In vivo* grafting was biocompatible and no signs of rejection, inflammation or other types of complications were detected at long-term of *in vivo* follow-up.

These results revealed the good *in vivo* biocompatibility and biointegration of these substitutes generated by tissue engineering and support their clinical use in patients with limbal deficiency.

Supported by grant PI-0086-2020, by Consejería de Salud y Consumo, Junta de Andalucía, Spain, by grant B-CTS-504-UGR20, proyectos de I+D+i en el marco del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014–2020, Universidad de Granada and Consejería de Universidad, Investigación e Innovación, Junta de Andalucía. Co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF) through the “*Una manera de hacer Europa*” program, European Union.

1. González-Gallardo C, et al. Successful restoration of corneal surface integrity with a tissue-engineered allogeneic implant in severe keratitis patients. *Biomed Pharmacother.* 2023;162:114612.

2. Sánchez-Porras D, et al. Generation of a Biomimetic Substitute of the Corneal Limbus Using Decellularized Scaffolds. *Pharmaceutics.* 2021 Oct 17;13(10):1718

## ANÁLISIS DE LA CURVA DEL OLVIDO VINCULADA A LA ADQUISICIÓN DE LAS PRINCIPALES COMPETENCIAS COGNITIVAS DE UN PROGRAMA DE FORMACIÓN EN SOPORTE VITAL: VALOR DE LOS CONCEPTOS UMBRALES. "PROYECTO RCP-UGR"

Raquel Cantón Cortés<sup>1</sup>, Francisco Javier Gómez Jiménez<sup>1</sup>, Gerardo Gómez Moreno<sup>1</sup>, María de los Ángeles Hernández Paris<sup>1</sup>, Francisco Manuel Parrilla Ruiz, Antonio Cárdenas Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Medicina de Universidad de Granada

**Introducción:** La Parada Cardiorrespiratoria (PCR) es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) un problema grave de salud pública debido a su incidencia y elevada morbimortalidad. A nivel extrahospitalario, su supervivencia depende de los primeros eslabones de la cadena de supervivencia, sin embargo, en España las tasas de reanimación por parte de testigos no alcanzan el 15-30%, pues nunca ha existido una política de formación en Soporte Vital Básico (SVB) para la población general.

**Objetivo principal:** Describir, analizar y validar las competencias cognitivas que componen la formación en soporte vital y su vinculación con la aparición de la curva del olvido a través del análisis de los conceptos umbrales.

**Metodología:** Estudio multicéntrico, analítico observacional y prospectivo, con estudiantes de 1º y 4º de Educación Secundaria Obligatoria (ESO) de 6 centros educativos de Granada capital y su área metropolitana como población diana. En total se incluyeron 420 alumnos. En la primera sesión de la intervención, los alumnos cumplimentaron una evaluación de respuesta múltiple para ver grado de conocimiento sobre la materia, seguidamente se les impartió una clase teórico-práctica acerca del Soporte Vital Básico (SVB) según las recomendaciones del European Resuscitation Council (ERC) 2015, y finalmente volvieron a cumplimentar la evaluación inicial para ver qué habían aprendido. A los 6 meses tuvo lugar la segunda sesión, en la que realizaron nuevamente la evaluación para ver qué recordaban y qué habían olvidado. Se seleccionaron 6 "preguntas clave" de la evaluación realizada en base a su trascendencia y al conocimiento que se considera básico para un buen aprendizaje de las maniobras de SVB, y las cuales fueron la base para el desarrollo de los conceptos umbrales.

**Resultados:** En la evaluación post-clase, los alumnos obtuvieron mejores resultados, y posteriormente disminuyeron a los 6 meses, aunque no alcanzaron las cifras obtenidas en la primera evaluación. Dicha curva de aprendizaje-olvido no se mantuvo en una de las "preguntas clave" que hacía referencia al algoritmo del SVB en el adulto, en la que se incrementó la proporción de aciertos en las 3 evaluaciones. Los resultados fueron mejores en las tres evaluaciones en los alumnos de 4º ESO ( $p = 0.102$  en la 1ª eval., y  $p = 0.000$  en la 2ª y 3ª eval.), y en las mujeres ( $p = 0.371$  en la 1ª eval.,  $p = 0.000$  en la 2ª eval., y  $p = 0.013$  en la 3ª eval.). Los alumnos del área metropolitana obtuvieron mejores resultados en la 1ª eval. ( $p = 0.102$ ), mientras que los alumnos de la capital obtuvieron mejores resultados en las 2ª y 3ª evaluaciones ( $p = 0.061$ , y  $p = 0.000$  respectivamente).

**Conclusiones:** Los conceptos umbrales dentro del SVB incluyen: la identificación de una PCR y activación de los SEM, conocer la importancia del tiempo y el orden ante una PCR, así como de las compresiones torácicas continuas y de calidad, y conocer la indicación y saber realizar las compresiones abdominales y golpes interescapulares ante una obstrucción de la vía aérea por cuerpo extraño (OVACE).

## ENHANCING CAR-T CELL THERAPY THROUGH PD-1 DELETION AND CONTROLLED IL-15 EXPRESSION

**M Cortijo-Gutiérrez**<sup>1</sup>, N Maldonado-Pérez<sup>1</sup>, M Tristán-Manzano<sup>2</sup>, K Pavlovic-Pavlovic<sup>1</sup>, P Justicia-Lirio<sup>2</sup>, Manel Juan<sup>6</sup>, María Castilla<sup>6</sup>, RO Bak<sup>8</sup> IC Herrera<sup>3,4</sup>, K Benabdellah<sup>\*1</sup>, F Martín<sup>\*1,5,7</sup>

<sup>1</sup>.Department of Genomic Medicine, Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), Granada, 18016, Spain. <sup>2</sup> LentiStem Biotech. Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), Granada, 18016, Spain. <sup>3</sup>. GC1 4Cell Therapy, IMIBIC. University of Cordoba, Reina Sofía University Hospital, Cordoba, 14004, Spain. <sup>4</sup>. Hematology Unit, Reina Sofía Hospital, Córdoba, 14004, Spain. <sup>5</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Immunology, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Av. de la Investigación 11, 18007 Granada, Spain. <sup>6</sup>. Hospital Clinic, Barcelona, 08036, Spain. <sup>7</sup>. Instituto de Investigación Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA). Granada 19400, Spain. <sup>8</sup>. [Department of Biomedicine - Forskning og uddannelse, Skou-bygningen](http://www.forskning.uddannelse.skou-bygningen), 8000 Aarhus C, Denmark

Adoptive Cell Therapy (ACT) with genetically modified T cells expressing Chimeric Antigen Receptors (CAR) is promising for refractory leukemia or lymphoma. However, CAR-T therapy faces challenges like toxicity, tumor microenvironment inactivation, and low cell persistence. This work aims to develop a gene editing strategy to generate CAR-T cells that overcome inhibitory signals from Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in tumor cell. The initial approach involved PD-1 deletion in CAR-T cells and a detailed characterization of their phenotypic and metabolic features. The CAR utilized in this work, CAR ARI-0001, is a second-generation CAR specific for CD19. PD-1 elimination was achieved through CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein (RNP) delivery targeting exon 1 of the PDCD1 gene. Delivery of gRNA and Cas9 through RNP electroporation enables highly efficient PD-1 depletion (80%) without significant alterations in T cell phenotype or generating large deletions. Subsequent cellular and metabolic characterizations of CAR-T PD-1 KO cells revealed an increase in exhaustion markers, reduced proliferative capacity and lower spare respiratory capacity (SRC), indicating decreased mitochondrial oxidative potential. Despite this reduction in metabolic fitness, compared to ARI CAR-T cells, ARI PD-1 KO CAR T cells presented an increase in memory phenotype and enhanced persistence and cytotoxicity when confronted to PD-L1-expressing tumor cells. These findings indicate that, although PD-1 KO improves CAR-T cell persistence in the presence of PD-L1, it simultaneously induces a reduction in fitness that should be improved to enhance the therapeutic potential of these strategy. To achieve this goal, we proposed a controlled expression of IL-15, a cytokine that improves T cell proliferation and metabolism. A CRISPR/Cas9-Homology-Directed Repair platform (HDR) was designed to express IL-15 from the PD-1 endogenous promoter. Various DNA delivery methods were evaluated, with AAV6 proving to be the most efficient, achieving around 60% integration efficiency. The platform combined RNPs for CRISPR/Cas9 delivery and AAV6 for IL-15 cDNA delivery, to generate pdTRUCKIL-15 cells. As expected, IL-15 expression in pdTRUCKIL-15 cells followed the PD-1 expression profile. pdTRUCKIL-15 cells showed enhanced proliferation, reduced pro-apoptotic protein BIM, increased anti-apoptotic protein Bcl-xL, improved metabolic characteristics, and higher lytic capacity compared to CAR-T PD-1 KO and CAR-T WT cells. In summary, in this work we have demonstrated that PD-1 deletion in CAR-T cells enhances their activity against PD-L1+ tumor cells but reduces metabolic potential and proliferative activity. We also showed that controlled IL-15 expression under PD-1 endogenous promoter reverses these deficiencies, making pdTRUCKIL-15 cells better suited to confront PDL-1+ tumors, ensuring prolonged survival and persistence. This strategy represents a significant advance in CAR-T cell engineering, offering a platform that could be applied to other PDL-1+ cancer types.

## ESTRADIOL AND ESTRONE: CONTRASTING INFLUENCES ON INFLAMMATION, EMT, AND STEMNESS IN OBESITY-DRIVEN ER+ BREAST CANCER

Diaz-Ruano AB<sup>1</sup>, Gomez-Jimenez E<sup>1</sup>, Marchal JA<sup>1,2,3</sup>, Picon-Ruiz M<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada, Spain. <sup>2</sup> Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain; Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, Granada, Spain. <sup>3</sup> Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; Excellence Research Unit.

This study explores the distinct biological roles of estradiol (E2) and estrone (E1) in regulating NF- $\kappa$ B-driven inflammation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and stemness in estrogen receptor-positive (ER+) cancer cells. NF- $\kappa$ B activation, a key process in inflammation and tumorigenesis, is analyzed in the context of obesity, a significant risk factor for breast cancer. E2, the dominant estrogen in premenopausal women, demonstrates a protective effect against NF- $\kappa$ B activation and inflammation. Conversely, E1, the predominant estrogen in postmenopausal women, collaborates with TNF- $\alpha$  to promote NF- $\kappa$ B activation, exacerbating inflammation, tumorigenesis, EMT, and cancer stem cell characteristics.

The study employed HeLa pER $\alpha$  cells to assess the impact of prolonged exposure to TNF- $\alpha$ , either alone or in combination with E1 or E2. Biomarker analysis revealed that E1 and E2 exert opposing influences on inflammation, EMT regulation, and stemness. These findings underscore the distinct biological functions of these estrogens in obesity-driven breast cancer mechanisms, highlighting the pro-tumorigenic role of E1 in postmenopausal women.

Significantly, this research provides a foundation for developing new therapeutic approaches. By targeting E1 or its biosynthesis, clinicians could design treatments to reduce the risk of ER+ breast cancer, especially in obese postmenopausal women. Furthermore, the study supports the potential of E1-reduced hormone replacement therapies as preventive measures to lower breast cancer incidence in this vulnerable population.

The findings advance the understanding of estrogen-specific roles in cancer biology and offer actionable insights for improving treatment outcomes for ER+ breast cancer patients. By identifying E1 as a key driver of inflammation and tumorigenesis, this research opens avenues for more precise and effective therapies against breast cancer.

## ELEVATED INTRACELLULAR ESTRONE LEVELS THROUGH HSD17B14 OVEREXPRESSION: EFFECTS ON INFLAMMATION, CSC ENRICHMENT, AND MIGRATION IN ER+ BREAST CANCER CELLS

Díaz-Ruano AB<sup>1</sup>, Gomez-Jimenez E<sup>1</sup>, Marchal JA<sup>1,2,3</sup>, Picon-Ruiz M<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Biopathology and Medicine Regenerative Institute (IBIMER), University of Granada, Spain. <sup>2</sup> Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain; Biosanitary Research Institute of Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, Granada, Spain. <sup>3</sup> Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; Excellence Research Unit.

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy and the leading cause of cancer-related mortality among women worldwide. Estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer represents the most common subtype, largely influenced by estrogens and their biosynthetic pathways. Among the enzymes involved, the 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD17B) family plays a pivotal role, although its precise contributions to breast cancer progression remain unclear. This study investigates the impact of HSD17B14 overexpression on inflammation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and cancer stem cell (CSC) properties in ER+ breast cancer cells.

Using MCF7 cells, we achieved successful transfection to overexpress HSD17B14, reaching expression levels approximately 200 times higher than control cells. Overexpression resulted in a marked increase in the expression of pro-inflammatory cytokines, suggesting a pro-tumorigenic role of HSD17B14 in the tumor microenvironment. Furthermore, migration capacity was significantly enhanced, accompanied by upregulation of key EMT markers, such as Vimentin, ZEB1, TWIST, ZO-1, and DCLN1. These changes indicate that HSD17B14 contributes to cellular plasticity and metastatic potential.

In addition to promoting inflammation and EMT, HSD17B14 overexpression enriched the CSC population. Functional assays, including mammosphere formation and wound healing tests, demonstrated an increase in self-renewal capacity and cellular migration. These findings highlight the multifaceted role of HSD17B14 in driving inflammation, CSC enrichment, and metastatic behavior in ER+ breast cancer cells.

This research provides novel insights into the molecular mechanisms linking HSD17B14 with breast cancer progression, emphasizing its role in promoting inflammation and aggressive tumor phenotypes. Targeting HSD17B14 or its associated signaling pathways could represent a promising therapeutic approach for managing ER+ breast cancer, particularly in cases driven by inflammation and EMT. These findings pave the way for further studies to explore HSD17B14 as a potential biomarker and therapeutic target in breast cancer treatment strategies.

## FUNCTIONALIZATION OF 3D PRINTED PLLA NERVE GUIDE CONDUITS WITH FIBRIN-BASED HYDROGELS FOR APPLICATION IN NERVE TISSUE ENGINEERING

Miguel Etayo-Escanilla<sup>1,2</sup>, David Sánchez-Porras<sup>1,2</sup>, Paula Ávila-Fernández<sup>1,2</sup>, Jesús Chato-Astrain<sup>1,2</sup>, Sandra Vieira<sup>3</sup>, Barbara De Sousa<sup>3</sup>, Marta Pegueroles<sup>4</sup>, Óscar-Darío García-García<sup>1,2</sup>, Víctor Carriel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Histology and Tissue Engineering Group, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; <sup>3</sup> Department of Medical Sciences, Institute of Biomedicine, University of Aveiro, Portugal; <sup>4</sup> Biomaterials, Biomechanics and Tissue Engineering Group, Department of Materials Science and Metallurgical Engineering, Technical University of Catalonia, Spain.

The recovery of function following traumatic peripheral nerve injury remains a significant challenge in the field of regenerative medicine. In this regard, advanced nerve guide conduits (NGC) may provide a convenient, prefabricated alternative to autografts for the rehabilitation of these injuries [1]. Recent studies have highlighted the potential utility of 3D-printing techniques for the fabrication of these NGC, given their extensive versatility and precision [2]. The objective of this study was to fabricate 3D printed PLLA conduits and functionalize them with distinct fibrin-based hydrogels in order to enhance their biocompatibility and develop innovative NGC for peripheral nerve repair.

Mesh-patterned PLLA conduits (20x3 mm) were 3D-printed (PLLA group) and coated with fibrin (PLLA-F group), fibrin-agarose (PLLA-FA group), and 0.1% genipin-crosslinked fibrin-agarose (PLLA-FA-G group) hydrogels. The generated NGC were subjected to a scanning electron microscopy analysis. For the *in vitro* study, human neural cells (SH-SY-5Y) cells were seeded onto the conduit surfaces, and cell viability was determined by Resazurin (after 1, 3 days of cell culture) and Live/Dead (after 3 days of cell culture). For the *in vivo* evaluation, 5x3 mm NGCs of each group, except for PLLA-F, were intramuscularly implanted in the limbs of three Wistar rats (n=3). After 10 weeks, the collected samples were histologically analysed through Hematoxylin/Eosin, Picrosirius and Alcian Blue stainings.

Fibrin-based enhanced *in vitro* metabolic and viability outcomes compared to uncoated PLLA. Furthermore, the PLLA-FA-G group exhibited particularly superior results, as evidenced by the Resazurin and Live/Dead assays. The histological analysis confirmed successful *in vivo* integration of all NGC, highlighting the effectively preserved tubular morphology of the PLLA-FA-G group. Tissue development varied among groups, with the PLLA-FA-G NGCs promoting vascularized, proteoglycan-rich intraluminal tissue and reducing fibrosis compared to the other groups.

The functionalisation of PLLA conduits with fibrin-based hydrogels, in particular those based on FA and FA-G, led to a notable enhancement of their biological properties *in vitro*, accompanied by an improvement in their *in vivo* biocompatibility. Moreover, further *in vivo* nerve repair studies are required to evaluate the potential utility of these NGC in peripheral nerve repair.

This work was financed by the Spanish “Plan Estatal de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica” (I+D+i) of the Ministry of Science and Innovation of Spain (Instituto de Salud Carlos III Grant FIS PI23/00337) and co-financed by FEDER funds (European Union); Funded by “Proyectos de colaboración público-privada, Plan de Investigación Científica, Técnica y de innovación 2021–2023 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and European Union-NextGenerationEU/PRTR) (Grant CPP2021-009070). MEE by FPU Fellowship Grant FPU21/06183 of the Spanish Ministry of Universities. Grant PPJIA2022-19, Plan propio de investigación y transferencia 2022, Universidad de Granada, España.

[1] Semmler L et al. Silk-in-Silk Nerve Guidance Conduits Enhance Regeneration in a Rat Sciatic Nerve Injury Model. *Adv Healthc Mater.* 2023 Apr;12(11):e2203237. doi: 10.1002/adhm.202203237

[2] Liu K et al. 3D Printed Personalized Nerve Guide Conduits for Precision Repair of Peripheral Nerve Defects. *Adv. Sci.* 2022, 9, 2103875. <https://doi.org/10.1002/advs.202103875>



## ESTUDIO DE LOS NIVELES DE HIERRO Y MAGNESIO EN LECHE FERMENTADAS COMERCIALES

Amanda Fernández-Vázquez, Beatriz Nieto-Rodríguez, Manuel Olalla-Herrera, Jesús Lozano-Sánchez, Rafael Giménez-Martínez

Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada, España

La fermentación es el proceso mediante el cual, haciendo uso de microorganismos, se produce la conversión de materias primas en productos de valor agregado <sup>(1)</sup>. En los últimos 20 años, los alimentos fermentados han experimentado una gran popularidad <sup>(1)</sup>.

En este trabajo se han medido las concentraciones de los minerales hierro (Fe) y magnesio (Mg) en diferentes muestras de leches fermentadas de vaca, cabra, oveja y soja mediante espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP – OES), previa digestión ácida en horno microondas, y se han estudiado las semejanzas y diferencias entre ellas.

El grupo que presentó las mayores concentraciones de ambos minerales fue el de soja (0,0046 mg Fe/g y 0,1439 mg Mg/g). En cuanto al hierro, las diferencias fueron significativas con respecto a los 3 grupos animales. En cambio, para el magnesio, no hubo diferencias significativas con respecto al grupo de cabra.

Al comparar los tres grupos animales del estudio, vemos que el que más hierro tiene es el de vaca (0,0011 mg/g), seguido por el de cabra (0,0007 mg/g) y, en último lugar, el de oveja (0,0006 mg/g). No se encontraron diferencias significativas. En cambio, para el magnesio, el grupo animal que más concentración tiene es el de cabra (0,1332 mg/g), seguido por el de oveja (0,1249 mg/g) y el de vaca (0,1072 mg/g). Las diferencias fueron significativas, excepto entre cabra y oveja.

### Bibliografía:

1. Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., de Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 196–208). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>

Agradecimientos: este trabajo se ha podido desarrollar gracias a la ayuda mediante los proyectos C-CTS-080-UGR23 y B-CTS-252-UGR20.

## ESTUDIO DE LOS MACROMINERALES CALCIO, POTASIO Y FÓSFORO EN LECHE FERMENTADAS COMERCIALES

Amanda Fernández-Vázquez, Beatriz Nieto-Rodríguez, Manuel Olalla-Herrera, Jesús Lozano-Sánchez, Rafael Giménez-Martínez

Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada, España

La fermentación es el proceso mediante el cual, haciendo uso de microorganismos, se produce la conversión de materias primas en productos de valor agregado <sup>(1)</sup>. En los últimos 20 años, los alimentos fermentados han experimentado una gran popularidad <sup>(1)</sup>.

En este trabajo se han medido las concentraciones de los minerales mayoritarios calcio (Ca), potasio (K), y fósforo (P) en diferentes muestras de leches fermentadas de vaca, cabra, oveja y soja mediante espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP – OES), previa digestión ácida en horno microondas, y se han estudiado las semejanzas y diferencias entre ellas.

Los mayores niveles de calcio y fósforo se encontraron en las leches fermentadas de oveja (1,1997 mg Ca/g y 0,8714 mg P/g). Los menores niveles de ambos minerales estaban en las leches fermentadas de soja (0,6065 mg Ca/g y 0,6468 mg P/g). Las diferencias encontradas fueron significativas. Para el caso del calcio, en segundo lugar estaban las leches fermentadas de cabra con 0,9946 mg/g, y, en tercero, las leches fermentadas de vaca con 0,9317 mg/g. Las diferencias encontradas no fueron significativas. Para el caso del fósforo fue al contrario. En segundo lugar estaban las leches fermentadas de vaca (0,7689 mg/g) y, en tercero, las de cabra (0,7574 mg/g). Las diferencias encontradas no fueron significativas. Para el potasio, las leches fermentadas de vaca fueron las que tenían la mayor concentración (1,1926 mg/g), seguidas por las de cabra (1,1062 mg/g). Las diferencias encontradas no fueron significativas. En tercer lugar estaban las leches fermentadas de oveja (0,8026 mg/g), y, en último lugar, las de soja con 0,7546 mg/g. Las diferencias encontradas no fueron significativas.

### Bibliografía:

1. Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., de Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 196–208). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>

Agradecimientos: este trabajo se ha podido desarrollar gracias a la ayuda mediante los proyectos C-CTS-080-UGR23 y B-CTS-252-UGR20.

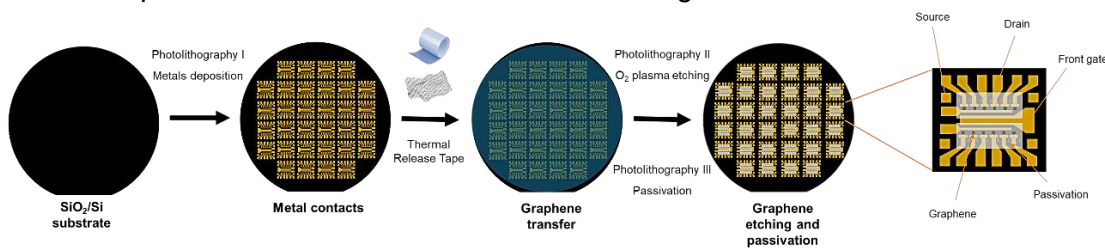
## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GRAPHENE-BASED BIOSENSOR PLATFORM FOR EARLY DISEASE DIAGNOSIS

E. Fuente-Zapico<sup>1,2</sup>, P. Martínez-Mazón<sup>1,2</sup>, C. Márquez<sup>1,2</sup>, A. Martínez-García<sup>1</sup>, P. Fernández-Martínez Rey<sup>1</sup>, V. Millán-Calvellido<sup>1</sup>, F. Gámiz<sup>1,2</sup>.

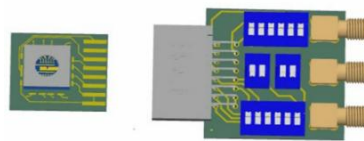
<sup>1</sup> Graphene and 2D Materials Laboratory, Nanoelectronics Group, Department of Electronics, CITIC-UGR, University of Granada, Spain. <sup>2</sup> Biosanitary Research Institute of Granada ibs.GRANADA, 18012, Granada, Spain.

Given graphene's excellent properties, such as high conductivity and sensitivity<sup>[1,2]</sup>, this material is being widely studied for the development of graphene field-effect transistors (GFETs) to facilitate the early detection of molecules in biological samples<sup>[3]</sup>. In this study, the fabrication process of such devices has been optimized (*Figure 1*), and a portable measurement system is being developed (*Figure 2*). Additionally, a microfluidic model is being designed to functionalize the sensors with liquid samples, and machine learning algorithms will be applied to evaluate the results.

The described fabrication process yields functional devices that, when measured electrically, generate current-voltage curves with a characteristic V shape. The vertex, or point of lowest conductivity, represents the Dirac point, whose position strongly depends on the composition of the sample being analyzed. For small analyte concentrations, its shift is proportional to the biomolecule concentration in the fluid. The next step involves functionalizing the sensors to evaluate graphene's sensitivity to antigen binding on immobilized molecules on its surface, as well as multiplexing them for the simultaneous detection of different antigens. Since these measurements exhibit significant variability, it will be necessary to apply machine learning algorithms to analyze them and obtain meaningful results, enabling the reliable discernment of the presence or absence of the molecule sought.



**FIGURE 1. DIAGRAM OF THE BIOSENSOR MANUFACTURING PROCESS.**



**FIGURE 2. PRINTED CIRCUIT BOARD FOR SENSOR ELECTRICAL CHARACTERIZATION.**

### References:

- [1] Jiang, Z., Feng, B., Xu, J., Qing, T., Zhang, P., & Qing, Z. (2020). Graphene biosensors for bacterial and viral pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 166, 112471.
- [2] Cabral, P. D., Domingues, T., Machado Jr, G., Chicharo, A., Cerqueira, F., Fernandes, E., ... & Borme, J. (2020). Clean-room lithographical processes for the fabrication of graphene biosensors. *Materials*, 13(24), 5728.
- [3] Liu, X., Ye, C., Li, X., Cui, N., Wu, T., Du, S., ... & Lin, C. T. (2018). Highly sensitive and selective potassium ion detection based on graphene hall effect biosensors. *Materials*, 11(3), 399.

## IMPACTO DEL GEN *FSHR* EN EL ÉXITO DE LA TESE EN CASOS DE INFERTILIDAD MASCULINA SEVERA: UN ENFOQUE GWAS

Vera Fuentes-Moreno <sup>1</sup>, Andrea Guzmán-Jiménez <sup>1,2</sup>, Sara González-Muñoz <sup>1,2</sup>, Miriam Cerván-Martín <sup>3</sup>, Nicolás Garrido <sup>4</sup>, José A. Castilla <sup>2,5</sup>, M. Carmen Gonzalvo <sup>2,6</sup>, Ana Clavero <sup>2,6</sup>, Marta Molina <sup>2,6</sup>, Lluís Bassas <sup>7</sup>, Susana Seixas <sup>8,9</sup>, João Gonçalves <sup>10,11</sup>, Alexandra M. Lopes <sup>9,12</sup>, Sara Larriba <sup>13</sup>, Rogelio J. Palomino-Morales <sup>2,14</sup>, F. David Carmona <sup>1,2</sup>, Lara Bossini-Castillo <sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Genética e Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; <sup>3</sup> Institute of Parasitology and Biomedicine López-Neyra (IPBLN), CSIC, Granada, Spain; <sup>4</sup> IVIRMA Global Research Alliance, IVI Foundation, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain; <sup>5</sup> Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Spain; <sup>6</sup> Unidad de Reproducción, UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Granada, Spain; <sup>7</sup> Laboratory of Seminology and Embryology, Andrology Service-Fundació Puigvert, Barcelona, Spain; <sup>8</sup> i3S—Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal; <sup>9</sup> Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal; <sup>10</sup> Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal; <sup>11</sup> ToxOmics—Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, Nova Medical School, Lisbon, Portugal; <sup>12</sup> CGPP-IBMC – Centro de Genética Preditiva e Preventiva, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal; <sup>13</sup> Human Molecular Genetics Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; <sup>14</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada, Granada, Spain.

El receptor de la hormona folículo estimulante (*FSHR*) es una proteína clave en la regulación de la espermatogénesis, mediando los efectos de su ligando en las células de Sertoli. Estas células, que forman parte del nicho espermatogénico, responden a la hormona folículo estimulante (FSH) regulando procesos fundamentales como la transcripción de genes de la meiosis, la formación de la barrera hematotesticular y el mantenimiento del microambiente necesario para la diferenciación de la línea germinal. Alteraciones en la señalización FSH-*FSHR* pueden comprometer la función de las células de Sertoli y, por ende, la producción espermática. En un esfuerzo por identificar las variantes genéticas subyacentes a la infertilidad masculina, especialmente en fenotipos extremos, nuestro grupo realizó un estudio de asociación de todo el genoma (GWAS) en una cohorte europea de 1274 pacientes con infertilidad masculina y 1951 controles fértiles de la Península Ibérica y Alemania. Este análisis reveló variantes asociadas con la infertilidad, siendo el polimorfismo rs186420734, del gen *FSHR* uno de los más relevantes ( $P = 2.95E-08$ ,  $OR = 11.34$ ) en la cohorte ibérica (Cerván-Martín et al., 2022, *Commun Biol*). Para validar y reforzar estos resultados, ampliamos el estudio mediante la inclusión de una nueva cohorte ibérica de 242 pacientes junto con 500 controles fértiles de la Península Ibérica, incrementando así la potencia estadística de nuestro análisis. Los datos obtenidos confirmaron la señal de *FSHR*, siendo significativa en esta nueva cohorte ( $P = 3.14E-02$ ,  $OR = 5.278$ ). Un hallazgo clave de nuestro estudio fue que la *FSHR* se asoció con el fracaso en la extracción de espermatozoides testiculares (TESE), una intervención crucial en algunos pacientes de infertilidad masculina, puesto que puede ser el único recurso disponible para la ser padres biológicos. Esta técnica sigue representando un reto clínico importante dado que, aunque es esencial, no garantiza resultados favorables en muchos de los casos, subrayando la necesidad de biomarcadores genéticos que mejoren la precisión diagnóstica. Por lo tanto, este tipo de estudios pueden ser de gran utilidad en el manejo de pacientes de infertilidad masculina extrema, permitiendo un enfoque más personalizado en el tratamiento de la infertilidad, especialmente en aquellos que dependen de técnicas invasivas como la TESE, cuyo éxito es incierto.

## “ANÁLISIS DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE POMPE”

A. Gamez-Gamez<sup>1,\*</sup>, L. Martínez-Ruiz<sup>1,3,\*</sup>, A. Aguilar-Gonzalez<sup>2,3,6</sup>, I. Ramos-Hernandez<sup>3,5</sup>, F. Martín-Molina<sup>3,4,6</sup>, F.J. Molina-Estevez<sup>3,5,6</sup>, P. Muñoz-Fernandez<sup>1,3,6</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular (Facultad de Ciencias), Universidad de Granada. <sup>2</sup> Departamento de Química Médica y Orgánica y Unidad de Investigación de Excelencia de "Química aplicada a la Biomedicina y al Medio Ambiente" (Facultad de Farmacia), Universidad de Granada. <sup>3</sup> GENyO- Centro de Genómica e Investigación Oncológica: Pfizer / Universidad de Granada / Junta de Andalucía. <sup>4</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología (Facultad de Medicina), Universidad de Granada. <sup>5</sup> Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental (FIBAO). <sup>6</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA).

\* Ambas autoras comparten 1ª autoría del trabajo presentado

La enfermedad de Pompe es una rara condición monogenética resultante de la disfunción de la enzima alfa-glucosidasa ácida (GAA), encargada de descomponer el glucógeno en glucosa en los lisosomas. La falta o baja actividad de esta enzima provoca la acumulación de glucógeno en diversos tejidos, especialmente en los músculos esquelético y cardíaco. El tratamiento principal es la Terapia de Reemplazo Enzimático (ERT), que consiste en administrar la enzima recombinante de GAA (rhGAA) de manera externa. No obstante, no todos los pacientes responden bien a este tratamiento, enfrentándose a problemas inmunológicos contra el GAA externo, altos costos por paciente y otras complicaciones. La terapia génica surge como una alternativa prometedora para tratar enfermedades monogénicas sin tratamiento efectivo, y la enfermedad de Pompe se considera un modelo ideal para aplicar estas nuevas estrategias terapéuticas. Dentro de las posibilidades que ofrece la terapia génica, en la investigación desarrollada en este trabajo, nos enfocamos en la terapia *ex vivo*, que se caracteriza por el empleo de células madre progenitoras hematopoyéticas (HSPCs) modificadas mediante vectores lentivirales (VLs). En el análisis de las diferentes células transducidas en nuestro laboratorio se pretende evaluar la expresión del transgén en las propias células; si las proteínas sintetizadas también son secretadas; y si las proteínas son captadas a través del mecanismo de corrección cruzada por células diana no transducidas, para la reversión del fenotipo Pompe.

Las herramientas génicas que hemos diseñado contienen un péptido señal (GA) y la secuencia de la proteína GAA optimizada, cuya expresión se realiza bajo diferentes promotores: SFVV, CD68, CD11b y PGK. Para un primer abordaje y estudio de los VLs generados, utilizamos la proteína verde fluorescente (GFP). Obtuvimos resultados favorables en términos de expresión y secreción del gen reportero, destacando el promotor viral SFVV y el promotor fisiológico mielóide CD68 a través del cual se consiguen niveles de GFP en el sobrenadante casi comparables a los del promotor viral. Por consiguiente, el promotor CD68 podría ser un buen candidato para su uso en TG *ex vivo* para el tratamiento de la enfermedad de Pompe. Basándonos en todos resultados recabados y su interpretación, es esencial realizar análisis comprobar si las proteínas producidas pueden ser captadas por células diana para su uso para revertir el fenotipo de la enfermedad. Para ello, emplearemos las construcciones con los promotores CD68 y SFVV que codifican para la enzima GAA.

## IMMUNOLOGICAL PROFILE OF NOVEL BIOGENIC ACELLULAR CONDUITS FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Óscar Darío García-García<sup>1,2</sup>, Jesús Chato-Astrain<sup>1,2</sup>, Ricardo Fernández-Valadés<sup>2,3</sup>, María del Carmen Sánchez-Quevedo<sup>1,2</sup>, Paula Ávila-Fernández<sup>1,2</sup>, Fernando Campos<sup>1,2</sup>, Miguel Etayo-Escanilla<sup>1,2</sup>, Víctor Carriel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Histology and Tissue Engineering Group, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> Division of Pediatric Surgery, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

To meet the therapeutic needs of severe conditions affecting the human vascular, urinary or nervous structures, tissue engineering has developed and analyzed a wide range of bioengineered conduits made from synthetic or natural materials. However, replicating the extracellular matrix structural and biochemical complexity is challenging when conventional biofabrication is used. This study is aimed to create bioartificial conduits *in vivo* by triggering a fibrotic response via implanting non-resorbable material in animal models. Decellularization and chemical cross-linking were used to enhance the immunological and biomechanical properties of these novel biomaterials.

To achieve this, 20 adult Wistar rats had silicone tubes implanted subcutaneously to promote the formation of connective tissue around the tubes, creating bioconduits. These bioconduits were harvested after 8 weeks and decellularized using a chemoenzymatic protocol previously applied to nerve tissues [1]. To enhance their mechanical properties and to decrease their degradation rate, the decellularized bioconduits were crosslinked with genipin (GP). Native (CTR), decellularized (D), and GP-crosslinked (DG) bioconduits underwent histological analysis, whereas their immunogenicity was assessed by performing polarization analyses on the macrophage cell line RAW264.7.

Histological analysis confirmed the effective decellularization of these bioconduits using the proposed method, with no noticeable alterations in overall tissue structure following decellularization or GP crosslinking. The phenotypic macrophage polarization after indirect contact with the substitutes denoted non remarkable morphology changes as compared with controls, and it was quantitatively confirmed by the CD206/86 rate obtained by flow cytometry.

In conclusion, these findings indicate the suitability of our decellularization protocol for bioconduits, and the posterior crosslinking with GP do not alter the immunological profile, suggesting their potential as tubular substitute for tissue engineering applications. These novel tubular structures could be used as efficient substitutes of the human urethra, peripheral nerve and other tubular-shape organs.

Funded by the Spanish Plan *Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación*, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Instituto de Salud Carlos III, Grants FIS PI23/00337 and FIS PI22/00059. Co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo regional ERDF-FEDER European Union through the “*Una manera de hacer Europa*” program. Supported by Grant CPP2021-009070, Proyectos de colaboración público-privada MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and European Union - NextGenerationEU/PRTR.

[1] García-García ÓD, et al. Front. Bioeng. Biotechnol. 11:1162684

## PRELIMINARY STUDY OF CHARACTERIZATION AND STABILITY OF THE MEDICINAL PRODUCT VOXZOGO®: CONTROL SAMPLES

M. García Rodríguez<sup>1</sup>, A. Torrente Lopez<sup>2</sup>, P. Baena Álvarez<sup>1,3</sup>, L. Linde Ruiz<sup>1</sup>, A. Salmerón García<sup>3,4</sup>, J. Cabeza Barrera<sup>3,4</sup>, Susana Clemente Bautista<sup>5</sup>, Beatriz García Palop<sup>5</sup>, María Josep Cabañas Poy<sup>5</sup>, N. Navas Iglesias<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Analytical Chemistry Department, Science Faculty, University of Granada, Granada, Spain. <sup>2</sup> Center of Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center, Leiden Netherlands. <sup>3</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>4</sup> Pharmacy Service, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain. <sup>5</sup> Pharmacy Service, Maternal and Child Hospital, Val d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain.

Achondroplasia is a rare genetic disorder caused by a mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene, which result in its protein being overactive. VOXZOGO® (Fig.) is a biotechnological medicine that has shown good results in the treatment of this disorder, which the active product vosoritide is a therapeutic peptide produced in *Escherichia coli* cells by recombinant DNA technology. The problem with this medication is that treatment is expensive since the price of each vial is around 300 € and it must be administered daily for a long period of time, from 3 to 18 years old of the patient. In addition, it is indicated [1] low stability once reconstituted the lyophilized powder -only 3 hours-, producing important medication surplus that cannot be re-used.



Therefore, the development of methodologies and strategies are needed for the characterization of the physicochemical properties of the reconstituted vosoritide solutions in order to study stability of these surplus, to further evaluate the possibility of re-using them after the 3 hours of VOXZOGO® reconstitution.

In this research, triplicate analyzes have been carried out by Uv-vis, fluorescence (FS), dynamic light scattering (DLS), and size exclusion liquid chromatography (SEC) on two reconstituted solutions of VOXZOGO® (2mg/ml and 0.8 mg/ml vosoritide) that were considered as control samples.

These preliminary results indicate that the peptide exhibits random secondary structure and unfolded tertiary structure. The samples stand out for their high polydispersity, not only in expired samples, but also in fresh reconstituted VOXZOGO® samples (control samples), which could be related to self-assembly process that gives rise to high molecular species of around 1 nm. Also, the results suggest that the reconstitutions of VOXZOGO® samples at 0.8 mg/mL and 2 mg/mL are stable not only within the first 3 hours after reconstitution of the medicine product but up to the first 24 hours, since no modifications were detected on the secondary and tertiary structures, nor in the size exclusion chromatographic profile.

The main limitation of the research has been having only 2 samples of medication, so these results must be corroborated in the following studies using a greater number of reconstituted, non-expired samples.

[1] VOXZOGO® Technical Report, Annex I: SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20210826152503/anx\\_152503\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20210826152503/anx_152503_en.pdf)

## ¿ES LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA PREDICTORA DEL RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON CÁNCER DE COLON?

Cristian Garcia-Sanchez<sup>1</sup>, Manuel Fernandez-Escabias<sup>1</sup>, Sofia Carrilho-Candeias<sup>1,2,3</sup>, Andrea Orellana-Jaen<sup>1</sup>, Maria Tomas-Garcia<sup>1</sup>, Rodrigo Fernandez-Escabias<sup>1</sup>, Alberto Millan-Martin<sup>1</sup>, Emilia Iuliu<sup>4</sup>, Cristina González-Callejas<sup>5</sup>, Almudena Carneiro-Barrera<sup>6</sup>, Teresa Nestares<sup>7,8</sup> & Francisco J Amaro-Gahete<sup>1,9,10</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España. <sup>2</sup> Comprehensive Health Research Centre (CHRC), Universidad de Évora, Portugal. <sup>3</sup> Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental (FIBAO), Granada, España. <sup>4</sup> Instituto Mixto Universitario de Investigación en Deporte y Salud (iMUDS), Universidad de Granada, Granada, España. <sup>5</sup> Servicio de Cirugía, Hospital Universitario Clínico San Cecilio, Granada, Spain. <sup>6</sup> Departamento de Psicología, Universidad Loyola Andalucía, Sevilla, España. <sup>7</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España. <sup>8</sup> Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” (INYTA), Universidad de Granada, Granada, España. <sup>9</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs.Granada, Granada, España. <sup>10</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatológica de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

**Introducción:** El cáncer de colon se ubica como el quinto tipo de tumor más frecuente a nivel mundial. Estudios previos sugieren que los pacientes oncológicos enfrentan un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares desde el momento del diagnóstico, hecho que incide negativamente en el pronóstico de los mismos. La adherencia al patrón de Dieta Mediterránea se ha asociado con un menor riesgo cardiovascular en adultos sanos, un beneficio atribuido potencialmente a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. No obstante, se desconoce si esta relación está presente en pacientes recién diagnosticados de cáncer de colon. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es examinar la asociación entre la adherencia a la Dieta Mediterránea y el riesgo cardiovascular en pacientes recién diagnosticados con cáncer de colon.

**Métodos:** Se trata de un estudio transversal en el que se han incluido un total de 78 pacientes diagnosticados de cáncer de colon en estadio I o II ( $64.8 \pm 10.6$  años; 32.9% mujeres) reclutados en el ensayo controlado aleatorizado ONCOFIT. La adherencia a la Dieta Mediterránea se midió mediante el cuestionario validado de 14 ítems “*Mediterranean Diet Adherence Screener*”. El riesgo cardiovascular se evaluó mediante (i) la presión arterial, medida en el brazo derecho con un monitor automático (Omrom®HEM 705 CP) siguiendo las recomendaciones de la European Heart Society; (2) perfil glucémico (i.e., niveles de insulina y glucosa); y (3) perfil lipídico (i.e., colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baja densidad [LDL-C], colesterol de lipoproteínas de alta densidad [HDL-C] y triglicéridos [TG]). Ambos perfiles fueron determinados en plasma previa extracción sanguínea en ayunas.

**Resultados:** La adherencia a la Dieta Mediterránea se asoció negativamente con los niveles de TG ( $\beta = -11,921$ ;  $R^2 = 0,112$ ;  $p = 0,003$ ). No obstante, no se observó relación entre dicho patrón dietético y la presión arterial sistólica ( $\beta = 0,565$ ;  $R^2 = 0,004$ ;  $p = 0,565$ ), diastólica ( $\beta = 0,505$ ;  $R^2 = 0,012$ ;  $p = 0,342$ ), insulina ( $\beta = 0,108$ ;  $R^2 = -0,001$ ;  $p = 0,781$ ), glucosa ( $\beta = -3,353$ ;  $R^2 = 0,024$ ;  $p = 0,172$ ), colesterol total ( $\beta = -1,873$ ;  $R^2 = 0,005$ ;  $p = 0,555$ ), LDL-C ( $\beta = 0,650$ ;  $R^2 = 0,001$ ;  $p = 0,796$ ) y HDL-C ( $\beta = 0,877$ ;  $R^2 = 0,014$ ;  $p = 0,298$ ).

**Conclusión:** En resumen, los presentes hallazgos sugieren que la adherencia a la Dieta Mediterránea se asocia con un mejor perfil lipídico en pacientes recién diagnosticados de cáncer de colon. Se requieren futuros estudios que incluyan a un mayor número de individuos y métodos más precisos para medir la adherencia a la Dieta Mediterránea.



## USO DE GENES SUICIDAS COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE PULMÓN

Laura Garrido Martín<sup>1</sup>, Carmen Griñan<sup>1,2,3,4</sup>, Cristina Camacho Rubio<sup>2,3</sup>, Yaiza Jiménez Martínez<sup>1</sup>, Juan Marchal<sup>2,3,4,5</sup>, Florencio Quero<sup>6</sup>, Houria Boulaiz<sup>1,3,4,5\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA). Hospitales Universitarios de Granada-Universidad de Granada, 18012 Granada, España. <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada, 18071 Granada, España. <sup>3</sup> Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, E-18016 Granada, España. <sup>4</sup> Unidad de Investigación "Modelización de la Naturaleza" (MNat). Universidad de Granada, 18016 Granada, España. <sup>5</sup> Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, E-18012 Granada, España. <sup>6</sup> Departamento de Cirugía Torácica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España.

La incidencia del cáncer ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. En 2022, se registraron 9,7 millones de muertes a causa de esta enfermedad, según el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC). Ante este panorama, el desarrollo de nuevas terapias se ha vuelto crucial, especialmente aquellas que puedan mejorar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios. Las terapias convencionales contra el cáncer, aunque efectivas en algunos casos, suelen dañar células sanas debido a su falta de especificidad, lo que motiva la búsqueda de enfoques más innovadores. En este sentido, las terapias génicas basadas en genes suicidas han emergido como una opción prometedora, ya que inducen la muerte selectiva de las células tumorales, minimizando el daño a los tejidos sanos y eliminando la necesidad de profármacos. En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la eficacia antitumoral del gen hokD, originario de *Escherichia coli* K12, controlado por promotores específicos de tumor, en células de cáncer de pulmón, en comparación con células no tumorales.

Para llevar a cabo esta investigación, realizamos transfecciones en células tumorales diferenciadas de líneas celulares de cáncer de pulmón, así como en células madre cancerígenas (CSCs), que son esenciales para la recurrencia y metástasis del cáncer. Evaluamos la bioeficacia de la transfección de estos genes suicidas in vitro mediante técnicas de microscopía confocal, además de medir la eficacia de los mismos en la inhibición del crecimiento tumoral utilizando el lector multimodal EnSight™.

Los resultados obtenidos en los ensayos de monocapa en la línea celular establecida de cáncer de pulmón mostraron una inhibición de la proliferación superior al 80%, mientras que, en el modelo tridimensional, la inhibición fue superior al 50%. Además, logramos la disgregación total del modelo enriquecido en CSCs.

En conjunto, estos resultados sugieren que el gen hokD podría ser una herramienta terapéutica personalizada prometedora, apta para la administración sistémica y potencialmente eficaz tanto en tumores primarios como en metástasis a distancia, lo que abre la puerta a su futura aplicación clínica.

## ANALYSIS OF THE SHARED GENETIC COMPONENT BETWEEN SERTOLI CELL-ONLY SYNDROME AND AN IMMUNE-MEDIATED CONDITION

Sara González-Muñoz<sup>1,2</sup>, Francisco Javier Suárez-López<sup>1</sup>, Andrea Guzmán-Jiménez<sup>1,2</sup>, Miriam Cerván-Martín<sup>3</sup>, José A. Castilla<sup>2,4</sup>, M. Carmen Gonzalvo<sup>2,5</sup>, Ana Clavero<sup>2,5</sup>, Marta Molina<sup>2,5</sup>, Vicente Maldonado<sup>6</sup>, Nicolás Garrido<sup>7,8</sup>, Susana Seixas<sup>9,10</sup>, João Gonçalves<sup>11,12</sup>, Alexandra M. Lopes<sup>10,13</sup>, Sara Larriba<sup>14</sup>, Rogelio J. Palomino-Morales<sup>2,15</sup>, Lara Bossini-Castillo<sup>1,2</sup>, F. David Carmona<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Granada, Departamento de Genética e Instituto de Biotecnología, Granada, Spain. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria, IBS.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra', IPBLN-CSIC, PTS Granada, Granada, Spain. <sup>4</sup> Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Spain. <sup>5</sup> HU Virgen de las Nieves, Unidad de Reproducción UGC Obstetricia y Ginecología, Granada, Spain. <sup>6</sup> UGC de Obstetricia y Ginecología, Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Spain. <sup>7</sup> Health Research Institute La Fe, IVI Foundation, Valencia, Spain. <sup>8</sup> Hospital Universitari i Politècnic La Fe e Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Servicio de Urología, Valencia, Spain. <sup>9</sup> Universidade do Porto, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Porto, Portugal. <sup>10</sup> University of Porto, Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto IPATIMUP, Porto, Portugal. <sup>11</sup> Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Departamento de Genética Humana, Lisboa, Portugal. <sup>12</sup> Nova Medical School, ToxOmics – Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, Lisboa, Portugal. <sup>13</sup> CGPP-IBMC – Centro de Genética Preditiva e Preventiva, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal. <sup>14</sup> Bellvitge Biomedical Research Institute IDIBELL, Human Molecular Genetics Group, Barcelona, Spain. <sup>15</sup> Universidad de Granada, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Granada, Spain.

Non-obstructive azoospermia (NOA) is one of the most severe forms of male infertility, characterised by a complete absence of sperm in the ejaculate due to severe spermatogenic failure (SPGF). Among the histological patterns of NOA, Sertoli cell-only syndrome (SCO) represents the most extreme phenotype, marked by a complete absence of germ cells in the testes. A genome-wide association study (GWAS) of SPGF in a European cohort identified the major histocompatibility complex type II as the main genomic region associated with SCO [1], suggesting an immune-mediated component in its aetiology.

This study aimed to investigate the potential autoimmune nature of SCO by comparing its genetic profile to that of Celiac Disease (CD) using the polygenic risk score (PRS) methodology.

The PRSice-2 tool was utilised to analyse a European cohort comprising 214 SCO patients, 707 infertile men with histological patterns distinct from SCO, and 1,951 fertile controls. The PRS was calculated by summing the risk alleles (0, 1 or 2) for CD from a GWAS of this condition [2], weighted by the natural logarithm of its respective *odds ratio*.

Our results revealed a significant differentiation between the SCO patient group and both infertile men without SCO ( $P_{emp} = 2.09E-02$ ), and fertile controls ( $P_{emp} = 3.00E-03$ ). However, no significant segregation was observed between the latter two groups ( $P_{emp} = 3.75E-01$ ). These findings suggest a correlation between the genetic components of SCO and autoimmune conditions such as CD, supporting the hypothesis of an autoimmune component in the pathogenesis of SCO.

In conclusion, our genetic analysis provides evidence for an immune-mediated origin of SCO, improving our understanding of its underlying mechanisms and opening new avenues for future studies on immune-related therapeutic targets.

[1] Cerván-Martín, M. et al. Immune and spermatogenesis-related loci are involved in the development of extreme patterns of male infertility. *Commun Biol.* Nov 10;5(1):1220 (2022).

[2] Dubois, P.C. et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet.* Apr;42(4):295-302 (2010).

## OPTIMIZING EXOSOME PRODUCTION FROM CAR-T CELLS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

Autores: P Heredia <sup>5,6</sup>, K Pavlovic <sup>1,6</sup>, L Algeciras <sup>6</sup>, V Ronco <sup>6</sup>, MD Carmona <sup>1</sup>, J A Marchal <sup>2, 3, 4, 5</sup>, K Benabdellah <sup>6</sup>.

1: Cell Therapy Group, Maimonides Institute of Biomedical Research in Cordoba (IMIBIC), Cordoba, Spain 2: Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, University Hospitals of Granada – University of Granada, 18016 Granada, Spain 3: Excellence Research Unit “Modeling Nature” (MNat), University of Granada, 18016 Granada, Spain 4: Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Center for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, 18016 Granada, Spain 5: Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain 6: Department of Genomic Medicine, Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), Granada, Spain

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy has revolutionized immunotherapy, offering a promising approach for treating various conditions. However, significant challenges remain, including cytokine release syndrome and neuroinflammation, as well as complications like tumor lysis syndrome and graft-versus-host disease. Moreover, current CAR-T cells are not efficient for the treatment of solid tumors due to antigenic diversity, immune escape within the tumor microenvironment, and the challenge of achieving sufficient proliferation and infiltration.

Exosomes derived from CAR-T cells (EXO-CAR-T) can offer a complementary therapy due to the unique properties of extracellular vesicles (EVs). These EVs, including exosomes, are capable of mediating intercellular communication and carrying a repertoire of therapeutic molecules. By using EXO-CAR-T, we hypothesize that we can mitigate some of the limitations and side effects of traditional CAR-T cell therapy. Exosome-based therapies offer biocompatibility, low toxicity, high permeability, and stability in biological fluids, with the ability to cross biological barriers and be engineered for targeted drug delivery. However, the large-scale preparation of exosomes from CAR T cells is expensive, and the safety and immunogenicity of engineered exosomes need careful consideration.

Our research focuses on several key areas:

1. Exosome Biogenesis and Production: Through gene editing techniques, we aimed to improve the production yield of exosomes from CAR-T cells. Our preliminary data showed an increase in exosome output.
2. Safety and Immunogenicity: To address concerns regarding the safety and immunogenicity of engineered exosomes, we analyzed the effects of eliminating HLA-I expression to produce allogeneic EXO-CAR-T.

Our preliminary findings suggest that exosomes derived from CAR-T cells represent a promising complementary therapy for cancer treatment, particularly for solid tumors. By enhancing exosome production and engineering them to evade immune detection, we can potentially overcome many of the limitations associated with traditional CAR-T cell therapy.

## ASSESSMENT OF THE EFFICACY OF IL-18 INDUCIBLE 4TH GENERATION AHER2 CAR-T CELLS

A Hinckley Boned<sup>1</sup>, C Barbero-Jiménez<sup>2</sup>, P Justicia-Lirio<sup>3</sup>, J Ruiz-de Francisco<sup>1</sup>, C Panisello<sup>4</sup>, C Bueno<sup>4</sup>, P Menendez<sup>4</sup>, JR Rodríguez-Madoz<sup>2</sup>, F Prosper<sup>2</sup>, M Tristán-Manzano<sup>5</sup>, F Martín-Molina<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup> Gene and cell therapy group, Genyo, Granada, 18007, Spain. <sup>2</sup> Hemato-Oncology Program, Cima Universidad de Navarra, IdiSNA, Pamplona, Spain. <sup>3</sup> Program of Immunology and Immunotherapy, CIMA, Pamplona, Spain. <sup>4</sup> Tumor Immunology and Immunotherapy, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain. <sup>5</sup> Lentistem, Granada, 18007, Spain.

Pancreatic cancer remains one of the most challenging malignancies to treat, and new therapeutic strategies are urgently needed. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cell therapy is a revolutionary cancer treatment that involves engineering T cells to express a chimeric antigen receptor, enabling them to recognize and kill cancer cells. While CAR-T cells have shown remarkable success in treating blood cancers, their efficacy in solid tumors, such as pancreatic cancer, remains limited due to challenges posed by the tumor microenvironment.

In this study, we aimed to enhance the efficacy of anti-HER2 CAR-T cell therapy for pancreatic cancer by utilizing regulated IL-18 expression. We achieved high levels of CAR expression and IL-18 secretion using AWHER2 CAR-T cells in combination with an insulated, transactivator-free Tet-On lentiviral vector (LOP). Induction of IL-18 through doxycycline enhanced the cytotoxic capacity of CAR-T cells, significantly increasing their ability to kill HER2-positive MiaPaca2 tumor cells in 2D models. Extended doxycycline induction resulted in more enhanced cytotoxic activity in restrictive effector:target ratios. We generated spheroids with 4 HER2 expressing cell lines (with natural or transduced HER2 expression) and tested them for CAR killing. The spheroid models of HEK293T HER2++ and MiaPaca2 HER2++ cells further confirmed the IL-18-mediated improvement in CAR-T cell activity. While the improvements were notable, further model refinements are needed to fully assess the impact of doxycycline induction on tumor suppression and the ability of our CAR-T cells to polarize M2 macrophages. These results suggest that regulated IL-18 expression via the LOP system holds significant potential for enhancing the antitumor efficacy of AWHER2 CAR-T cells against pancreatic cancer.

## POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO DEL ÁCIDO ELÁGICO EN FIBROBLASTOS HUMANOS

Rebeca Illescas Montes<sup>1</sup>, Anabel González Acedo<sup>2</sup>, Lucía Melguizo-Rodríguez<sup>1</sup>, Ismael Loonsri Pizarro<sup>2</sup>, Olga García Martínez<sup>1</sup>, Javier Ramos Torrecillas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo TEC17-Biotejsalud. Instituto de Investigación ibs.GRANADA. <sup>2</sup> Grupo Biosanitario (BIO277). Departamento de Enfermería. Universidad de Granada.

**Introducción:** La cicatrización es un proceso que se desarrolla en cuatro fases principales: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (1,2). Sin embargo, se sabe que una inflamación sostenida puede impactar de forma adversa la proliferación y migración de distintas poblaciones celulares, incluyendo los fibroblastos. Este estudio tuvo como propósito evaluar el efecto antiinflamatorio del ácido elágico, un compuesto fenólico derivado de la granada, en fibroblastos humanos.

**Metodología:** Los fibroblastos CCD-1064Sk se expusieron a un entorno inflamatorio inducido por citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) o por lipopolisacáridos (LPS). Posteriormente, se trató a las células con ácido elágico en concentraciones de 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> M. Se llevaron a cabo análisis para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo MTT, evaluar la capacidad de migración con el *scratch* assay y medir los niveles de citoquinas proinflamatorias utilizando la técnica ELISA.

**Resultados:** Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la viabilidad de los fibroblastos cultivados en un ambiente inflamado con citoquinas proinflamatorias o con LPS cuando fueron tratados con ácido elágico en ambas dosis, en comparación con los controles. Asimismo, se observó un incremento en la migración celular a las 24 horas del tratamiento y una reducción sólo en los niveles de IL-1 $\beta$  (ambas dosis).

**Conclusión:** El ácido elágico posee propiedades antiinflamatorias, favoreciendo la viabilidad y migración de fibroblastos en entornos inflamatorios, además de disminuir los niveles de citoquinas proinflamatorias. Estos hallazgos indican que este compuesto fenólico podría tener un potencial terapéutico en la modulación de la inflamación y en la mejora del proceso de cicatrización en tejidos lesionados.

### Bibliografía

1. El Ayadi A, Jay JW, Prasai A. Current Approaches Targeting the Wound Healing Phases to Attenuate Fibrosis and Scarring. *Int J Mol Sci.* 7 de febrero de 2020;21(3):1105.
2. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science.* 09 de 2017;356(6342):1026-30.
3. Dreifke MB, Jayasuriya AA, Jayasuriya AC. Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering: C.* 1 de marzo de 2015;48:651-62.

## APROXIMACIÓN A LA ACTIVIDAD PROAPOPTÓTICA Y ANTIINFLAMATORIA DE COMPLEJOS ORGÁNICOS: DITERPENOS ENT-KAURENOS, HIDROXITRIMETIL ENT-KAURENO DERIVADO (D23-12)

Jorge Juárez-Moreno<sup>1</sup>, María Barbero-Martínez<sup>1</sup>, Cloe Biedma-López<sup>1</sup>, Sergio Gil-Peña<sup>1</sup>, Yass Kudhir Yasser<sup>1</sup>, Houda Zentar<sup>1,2</sup>, Daniel Gil Saldaña<sup>3</sup>, José M. Botubol Ares<sup>3</sup>, Rachid Chahboun<sup>2\*</sup>, Fernando J. Reyes Zurita<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad de Granada. <sup>2</sup> Departamento de Química Orgánica. Universidad de Granada. <sup>3</sup> Departamento de Química Orgánica. Universidad de Cádiz.

En este estudio se evaluó la actividad proapoptótica de varios ent-kaurenos en dos líneas celulares cancerígenas humanas: adenocarcinoma de colon HT29 y hepatocarcinoma HepG2. Estos análisis se realizaron mediante ensayos de citotoxicidad y citometría (apoptosis, ciclo celular y potencial de membrana mitocondrial).

El compuesto D23-12 mostró la citotoxicidad más elevada tanto en células HT29 ( $IC_{50} = 0,83 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ ) como en células HepG2 ( $IC_{50} = 0,64 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ ). Los estudios citométricos mostraron que esta inhibición en el crecimiento implicó en células HT29 la detención del ciclo celular en las fases G2/M a través de la activación de la vía apoptótica extrínseca y en células HepG2 la detención en las fases G0/G1 y G2/M a través de la activación de la vía apoptótica intrínseca. Además, se evaluó su actividad antiinflamatoria mediante su capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico en la línea celular de monocitos/macrófagos RAW 264.7 activados por LPS. Aunque todos los productos mostraron un alto potencial antiinflamatorio, el compuesto más activo que presentó una menor  $IC_{50}(\text{NO})$  fue el D23-23 ( $IC_{50}(\text{NO}) = 8,86 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$ ).

Nuevos estudios serán necesarios para evaluar a nivel molecular los compuestos ensayados con el objetivo de dilucidar los mecanismos o vías de señalización que subyacen a sus actividades proapoptóticas y antiinflamatorias, lo cual podría contribuir al desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos y/o antiinflamatorios.

## RESPONSE SURFACES MODEL FOR DESIGNING DEXAMETHASONE AND DOXYCYCLINE-DOPED NANOPARTICLES TO IMPROVE DENTIN-RESIN INTERFACES

Halana Lessa Brito<sup>1\*</sup>, Fátima S. Aguilera<sup>1,2</sup>, Manuel Toledano<sup>1,2</sup>, Raquel Osorio<sup>1,2</sup>, Carol Cifuentes<sup>1</sup>, Rafael Bailón<sup>3</sup>.

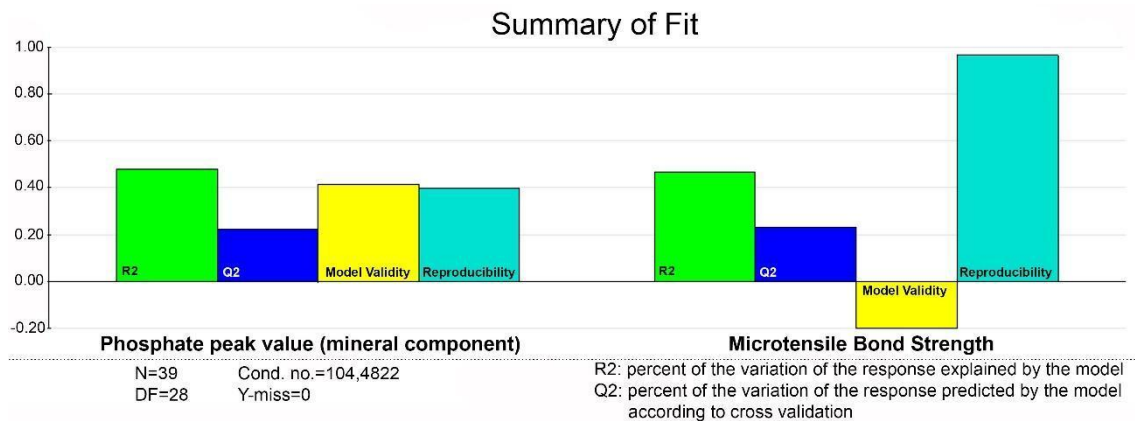
<sup>1</sup> Facultad de Odontología, Universidad de Granada. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA). Granada. <sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Granada.

\* Estudiante de Posgrado, Universidad de Granada

**Objective:** To design a response surfaces model (RSM) able to analyze the Microtensile Bond Strength (MTBS) and mineral formation at the of dentin-resin interface after treatment with Doxycycline (Doxy) and Dexamethasone (Dexa) doped nanoparticles (NPs).

**Material and Methods:** A data matrix was created based on previous experimental published results. A quadratic predictive model with central composite design was built to evaluate the effect of the different influencing parameters (called factors) on MTBS and Raman phosphate peak value (mineral component of dentin) as *responses*, with RSM accurately. Their level of effectiveness has been evaluated using the software for statistical design and optimization of experiments, MODDE GO®.

**Results:** The summary of fit for the responses Phosphate peak value and MTBS are shown in the Figure.



**Conclusions:** The percentage of variation of both responses (mineral component and MTBS) explained by the model, parameter R2, is adequate. A high model statistical validity is obtained for Phosphate peak value, but not for MTBS despite its reproducibility. RSM proves to be a reliable tool to analyze *in vitro* tests and to predict the results of different experimental designs.

**Acknowledgements:** Grant C-CTS-189-UGR23 funded by Consejería de Universidad, Investigación e Innovación and by ERDF Andalusia Program 2021-2027.

## MODELO DE PEZ CEBRA *coq5*<sup>L229X</sup> PARA LA INVESTIGACIÓN DE TERAPIAS EN ATAXIA CEREBELOSA ASOCIADA A UNA ENFERMEDAD ULTRA-RARA

Sergio López-Herrador<sup>1,2</sup>, Julia Corral-Sarasa<sup>1,2</sup>, Inmaculada Gallego-López<sup>1</sup>, Adrián Ruiz-Moreno<sup>1</sup>, Luis C. López<sup>1</sup>, ME Diaz-Casado<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Área o Departamento de Fisiología, Universidad de Granada, Granada, España. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, España

**Introducción/Objetivos:** Las deficiencias primarias en Coenzima Q10 (CoQ10) son enfermedades mitocondriales hereditarias caracterizadas por una gran heterogeneidad clínica. Al menos 17 genes participan en la biosíntesis de CoQ10, y mutaciones en estos genes están asociadas con diversas patologías (Alcázar-Fabra M et al., 2013). En particular, las mutaciones en el gen *COQ5*, que codifica para la etapa de C-metilación en la vía biosintética de CoQ10, causan ataxia cerebelosa en pacientes (Dawidziuk M et al., 2023). El mecanismo exacto mediante el cual estas mutaciones inducen los síntomas clínicos aún no se comprende completamente, y el tratamiento actual se limita a la administración de CoQ10 exógena, cuyos efectos son generalmente modestos. En los últimos años, ha surgido el uso de análogos del ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB) como una estrategia terapéutica prometedora para mutaciones en ciertos genes, mostrando resultados prometedores en modelos *in vivo* (Corral-Sarasa J et al., 2024). Sin embargo, su uso en el contexto de la mutación *COQ5* no ha sido evaluado. Este estudio tiene como objetivo caracterizar el modelo de pez cebra *coq5*<sup>L229X</sup> y evaluar posibles tratamientos, realizando una comparación con células de un paciente con mutaciones en heterocigosis compuesta para *COQ5* (*COQ5*<sup>c.681+1G>A; p.Gly118Ser</sup>).

**Metodología:** El modelo *coq5*<sup>L229X</sup> se caracterizará mediante la medición de niveles de CoQ10 y proteínas de la ruta biosintética, análisis morfométricos, estudios histológicos, evaluación de la supervivencia y pruebas de motilidad. Se evaluará la eficacia de tratamientos con CoQ10 y análogos del 4-HB (ácido β-resorcílico, ácido vanílico y ácido 4-hidroxi-2-metilbenzoico). Además, se aplicarán los mismos tratamientos a células derivadas del paciente *COQ5*<sup>c.681+1G>A; p.Gly118Ser</sup>.

**Resultados y discusión:** Los peces mutantes *coq5*<sup>L229X</sup> muestran unos niveles residuales de CoQ10 del 30%, alteraciones notables en su motilidad y desarrollo, evidenciando un retraso en el crecimiento corporal y una esperanza de vida reducida. La administración exógena de CoQ10 resultó en un incremento significativo de los niveles de CoQ10, mejorando las características fenotípicas y prolongando la supervivencia, a diferencia de los análogos del 4-HB, que no produjeron efectos similares. Los ensayos *in vitro* realizados con células derivadas del paciente replicaron estos resultados, confirmando la efectividad del tratamiento con CoQ10 *in vitro*.

**Conclusiones:** El modelo de pez cebra *coq5*<sup>L229X</sup> refleja la presentación clínica cerebelosa de la deficiencia primaria de CoQ10 y constituye una herramienta valiosa para investigar los mecanismos fisiopatológicos y evaluar posibles tratamientos.



## INTRATUMORAL MELATONIN TREATMENT, A NOVEL CLINICAL APPROACH TO OVERCOME CISPLATIN RESISTANCE IN HEAD AND NECK CANCER

Alba López-Rodríguez<sup>1,2,3</sup>, Laura Martínez-Ruiz<sup>1,2</sup>, Fabiola Bermejo Casares<sup>4</sup>, Javier Granados Fernández<sup>1,2</sup>, Víctor Carriel Araya<sup>4</sup>, Darío Acuña-Castroviejo<sup>1,2,3</sup>, Germaine Escames<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Granada, España. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (Ibs.Granada), Granada, España. <sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERfes), Madrid, España. <sup>4</sup> Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España.

**Introduction.** While novel therapeutic modalities like immunotherapy are emerging, pre- or post-surgical chemotherapy remains the mainstay of systemic cancer treatment. However, its efficacy is hampered by the development of drug resistance and subsequent tumor relapse. Multiple mechanisms have been elucidated for acquired chemoresistance, with the overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters being a pivotal factor in multidrug resistance (MDR). These transmembrane proteins act as efflux pumps, actively transporting anti-cancer drugs out of the cell and thereby reducing their intracellular concentration.

Recent research has shed light on the mitochondrial metabolic plasticity during chemotherapy. These findings suggest a correlation between ABC transporter overexpression and enhanced mitochondrial metabolism to supply the ATP demand.

In this context, in tumor cells, high melatonin concentrations synergizes chemotherapy to enhance cytotoxicity. Mechanistically, melatonin increases apoptosis in a dose- and time-dependent manner within tumor cells, likely due to modification of mitochondrial function. Therefore, this project **aims** to investigate the oncostatic effect of melatonin in resistant cancer cells *in vivo*.

**Materials & method.** This study was conducted using athymic (nu/nu) nude mice. We performed CAL27 and CAL27/ABCB1 xenografts and animals were treated with intratumoral melatonin at 3% each day, cisplatin at 4mg/kg once a week and the combination of both. After 35 days animals we carried out the magnetic resonance experiments, histological analyses and electron microscopy analyses.

**Results.** The results show that the overexpression of ABCB1 gene produces resistance to CDDP and intratumoral melatonin administration overcomes it. In the resistant cells the number of mitochondrias and the distance to the nucleus increase with the cisplatin treatment to supply the high demand of ATP to efflux the drug, but the treatment with melatonin or combined treatment reduces it compared to cisplatin treatment. Thus, the histological analyses reveal melatonin potentiates the effect of cisplatin and increases the apoptosis and collagen capsule and reduces the proliferation and adenocarcinomatous areas.

**Conclusion.** These data suggest that ABCB1 overexpression alters the response to cisplatin treatment. Additionally, intratumoral melatonin administration potentiates CDDP-induced cytotoxicity, overcoming drug resistance, particularly in reducing tumor growth, promoting collagen capsule formation and modifying mitochondrial parameters. This suggests a potential clinical strategy to enhance the efficacy of existing anticancer therapies against MDR.

## INFLUENCE OF BIOFABRICATION VARIABLES ON EPITHELIAL THICKNESS OF TISSUE ENGINEERED ORAL MUCOSA SUBSTITUTES: A META-ANALYSIS STUDY

Miguel-Ángel Martín-Piedra<sup>1,2</sup>, Manuel Albendin-Moreno<sup>1</sup>, Adriana Olivares-Abril, Adriana<sup>1</sup>, Sara Valentina Paez-Yepes<sup>1</sup>, David Sanchez-Porras<sup>1,2</sup>, Ismael A. Rodríguez<sup>1,2,3</sup>, Mario A. Rodríguez<sup>1,2,3</sup>, Miguel Alaminos<sup>1,2</sup>, Ingrid Garzon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Histology and Tissue Engineering Group, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> Department of Histology, Faculty of Dentistry, National University of Cordoba, Cordoba, Argentina.

Tissue engineering of oral mucosa has emerged as a promising approach for oral lesions reconstruction [1]. This systematic review and meta-analysis evaluated advancements in the biofabrication process of artificial oral mucosa, focusing on *in vitro* studies. A comprehensive search of MEDLINE, Embase, and Web of Science Core Collection databases identified 57 eligible studies, with 40 included in the quantitative analysis. The meta-analysis revealed an average epithelial thickness of 69.87  $\mu\text{m}$  and an overall epithelial maturation score of 5.13 out of 6 points for *in vitro* studies. Subgroup analyses were conducted to assess the impact of methodological variables on epithelial development. Tissue-engineered oral mucosa containing a cellularized stroma achieved higher epithelial thickness (77.60  $\mu\text{m}$ ) compared to acellular stromas (58.90  $\mu\text{m}$ ), representing a 31.75% increase, although the difference was not statistically significant ( $p = 0.126$ ). Similarly, epithelial thickness was higher in tissue-engineered oral mucosa based on decellularized scaffolds (74.36  $\mu\text{m}$ ) as compared to artificial tissues generated with bioengineered scaffolds (66.01  $\mu\text{m}$ ), without reaching statistical significance ( $p = 0.543$ ). The use of custom signaling molecules tended to be associated with increased epithelial thickness (77.15  $\mu\text{m}$ ) as compared to commercial signals (57.92  $\mu\text{m}$ ), although differences were not statistically significant ( $p = 0.133$ ). These findings provide insights into the factors influencing epithelial outcomes in tissue-engineered oral mucosa and highlight potential strategies for optimizing biofabrication techniques. Further research is needed to validate these trends and explore their implications for clinical applications in oral tissue regeneration.

Supported by the Spanish “Plan Estatal de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica” (I+D+i) of the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (Instituto de Salud Carlos III), Grants FIS PI21/00980, FIS PI24/00006 and ICI19/00024 (BIOCLEFT). Cofinanced by the European Regional Development Fund (FEDER/ERDF) through the “Una manera de hacer Europa” program, European Union.

1. Izumi K, et al. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res* 2000;79:798-805

## INNOVATIVE PLATFORM FOR DIRECT PROFILING OF CIRCULATING CELL-FREE RNA IN BIOFLUIDS

Ismael Martos-Jamai <sup>1,2,3</sup>, Mónica Rodríguez Segura <sup>1,2,3</sup>, Agustín Robles- Remacho <sup>1,2,3</sup>, Antonio Marin Romero <sup>4</sup>, Mavys Tabraue <sup>4</sup>, Francisco Javier Lopez- Delgado <sup>4</sup>, Juan Jose Guardia-Monteagudo <sup>4</sup>, Victoria Cano-Cortes <sup>1,2,3</sup>, Rosario M. Sánchez Martín <sup>1,2,3</sup>, Salvatore Pernagallo <sup>4</sup>, Juan José Díaz Mochón <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>2</sup> GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Avda. Ilustración 114,18016 Granada, Spain. <sup>3</sup> 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. <sup>4</sup> DestiNA Genomica S.L. 18016 Granada, Spain.

Circulating cell-free ribonucleic acids (cfRNAs), present in biofluids such as blood and urine, are emerging as powerful biomarkers for non-invasive diagnostics and personalized medicine. Despite their potential, current methods for cfRNA analysis face significant challenges, including complex sample preparation, high costs, and inconsistent detection. Addressing these barriers, we introduce an advanced platform designed to directly profile cfRNAs with high sensitivity and throughput, streamlining the workflow by reducing extensive preprocessing. Our novel approach integrates innovative molecular techniques and nanotechnology to capture, amplify, and sequence cfRNAs directly from biofluids, minimizing sample loss and contamination. This innovation not only simplifies cfRNA analysis but also expands its applicability to various clinical contexts, such as early cancer detection, infectious disease diagnostics, and monitoring therapeutic responses.

This initiative is supported by diaRNAgnosis (<https://www.diarnagnosis.com>), a multidisciplinary, EU-funded consortium uniting experts in nanotechnology, materials science, and clinical oncology as well as small and medium-sized enterprises (SMEs) with proprietary technologies. The project's primary focus is to develop a reliable liquid biopsy platform targeting cfRNAs as biomarkers for testicular germ cell tumours (TGCT) and prostate cancer (PCa). Through collaborative efforts between academic researchers, clinicians, and industry partners, diaRNAgnosis represents a transformative step toward realizing the full potential of cfRNAs as biomarkers, offering non-invasive, next-generation solutions for disease diagnosis and management.

**Acknowledgements:** This research was supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie actions (MSCA-RISE-101007934, diaRNAgnosis), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (PID2019.110987RB.I00 and PDC2022.133913.I00); the Andalusian Regional Government cofinanced by European Regional Development Funds (FEDER) (PT18-TP-4160, A-FQM-760-UGR20); the FEDER/Andalusian Regional Ministry of Economy and Knowledge (CV20-77741). Our team are members of the NANOCARE 2.0 network (Grant RED2022-134560-T funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033).

## **DESARROLLO Y EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE POR COMPETENCIAS EN ALUMNOS DE SEXTO GRADO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

Ana M.<sup>a</sup> Matas Lara<sup>1,\*</sup>, Antonio Cárdenas Cruz<sup>2,3</sup>, Francisco M. Parrilla Ruiz<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Servicio de Urgencias del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada, Granada, España. <sup>2</sup> Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España. <sup>3</sup> Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España.

\* Autor de correspondencia: anamatas@ugr.es

Entre los objetivos de la formación universitaria médica, además de la adquisición de los conocimientos teóricos, debe encontrarse la preparación necesaria para la consecución de habilidades prácticas y conductuales para atender a una población cada vez más diversa. En un campo tan exigente como la atención médica urgente, el aprendizaje basado en competencias se ha consolidado como un enfoque pedagógico fundamental en la formación de los profesionales de la salud y es el esquema dominante en educación médica actualmente. En la Universidad de Granada, la enseñanza de la Medicina de Urgencias se realiza mediante dos asignaturas, una optativa en quinto curso y otra en sexto curso, obligatoria y eminentemente práctica que se basa en el aprendizaje por competencias.

El objetivo principal de este trabajo ha sido describir y analizar las competencias adquiridas por los alumnos de sexto de grado de Medicina tras realizar su estancia formativa en el Servicio de Urgencias hospitalarias en hospitales adscritos a la universidad.

Desde el punto de vista metodológico, se diseñó un estudio multicéntrico observacional prospectivo en el que se estableció como población diana a 270 estudiantes de Grado de Medicina de la Universidad de Granada que realizaron prácticas clínicas tuteladas en el Servicio de Urgencias del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada, del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y del Hospital Universitario Poniente de El Ejido (Almería) a lo largo de los cursos académicos 2021/22, 2022/23 y 2023/24 y a 37 tutores pertenecientes al Hospital Universitario Clínico San Cecilio.

Se diseñaron dos cuadernos de recogida de datos que fueron cumplimentados por el tutor clínico: uno referente al alumno basado en las competencias establecidas por la Facultad de Medicina para superar el Practicum y otro referente al propio tutor clínico.

Los resultados del estudio revelan que tras la realización del prácticum el 98,9% de los alumnos realizan la anamnesis, el 99,3% la exploración física, el 94,1% interpreta el hemograma, el 93,7% interpreta la bioquímica básica de urgencias, el 90% interpreta la coagulación básica, el 94,8% interpreta una radiografía convencional de tórax en dos posiciones, el 82,2% realiza la lectura básica del electrocardiograma, el 54,4% toma las constantes vitales de forma adecuada, el 28,9% aplica de forma correcta medicación por vía intramuscular y subcutánea, el 87,4% establece de forma correcta la relación médico – paciente, el 50% recepciona, valora, explora y actúa de forma adecuada ante una urgencia, el 41,1% conoce las técnicas de soporte vital, el 59,6% conoce el funcionamiento del área de urgencias, el 54,4% utiliza de forma correcta los equipos de protección individual y el 74,4% conoce los principios activos de los fármacos más utilizados.

Este estudio permite concluir que el grado de adquisición de competencias (cognitivas, procedimentales y actitudinales) dentro de las urgencias hospitalarias por parte de los alumnos de sexto de Grado de Medicina en el modelo actual es alto y el programa formativo se encuentra adaptado de manera genérica a las recomendaciones nacionales e internacionales existentes para la formación de los alumnos.

## ESTUDIO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN YOGURES COMERCIALES

Beatriz Nieto-Rodríguez, Amanda Fernández-Vázquez, Manuel Olalla-Herrera, Jesús Lozano-Sánchez, Rafael Giménez-Martínez

Departamento de Nutrición y Bromatología, Campus de Cartuja, Universidad de Granada, 18001, Granada, España.

En los últimos años, numerosas investigaciones han puesto el foco en los polifenoles, metabolitos secundarios de las plantas, resaltando sus efectos prometedores para la salud asociados a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, antiadipogénicas y neuroprotectoras<sup>1</sup>. De igual modo, existe una amplia evidencia que respalda los beneficios para la salud de las leches fermentadas, entre ellas el yogur<sup>2</sup>. Sin embargo, considerando la falta de estudios sobre el perfil fenólico de estos productos, este ensayo se centró en la determinación de la composición fenólica de yogures disponibles en el mercado español.

Se analizaron un total de 25 yogures comerciales, elaborados con leche de vaca (n=10), cabra (n=8) y oveja (n=7), en sus versiones entera y desnatada. La composición fenólica de las muestras se evaluó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento espectrometría de masas en tándem con electrospray (HPLC-ESI-MS-MS), previa extracción de los compuestos. Este método permitió la identificación y cuantificación de 15 compuestos fenólicos, entre ellos, cuatro ácidos hidroxibenzoicos, cinco ácidos hidroxicinámicos, tres flavonoides, un estilbeno, un fenol simple y un secoiridoide.

Los resultados mostraron que el ácido vanílico es el compuesto fenólico mayoritario en los yogures, independientemente del tipo de leche. El ácido 4-hidroxifenilacético, es el segundo mayoritario, destacando su contenido en los yogures de cabra enteros (0,12- 1,46 ug/100 g), seguidos de los de oveja desnatados (0,808-0,951 ug/100 g). Cabe señalar, que son varios los polifenoles que se han identificado solo en algunas muestras de vaca y cabra, sin encontrarse en las de oveja, entre ellos, el hidroxitirosol y oleuropeína, característicos de las hojas de olivo, lo que sugiere que la dieta del animal ha sido suplementada con ellas. Estos hallazgos son significativos debido a las diversas actividades biológicas asociadas a estos compuestos, tales como propiedades antioxidantes, antiaterogénicas y antiinflamatorias, entre otras.

En conclusión, este estudio pone de manifiesto que el yogur, además de su elevado valor nutricional, presenta compuestos bioactivos, entre ellos los polifenoles. Incorporar estos productos en la dieta de la población es una estrategia eficaz para promover su salud y prevenir enfermedades.

### Referencias

1. Yerlikaya O. A review of fermented milks: potential beneficial effects on human nutrition and health. *Afr Health Sci.* 2023 Dec;23(4):498-507. DOI: 10.4314/ahs.v23i4.54.
2. Hadjimbei E, Botsaris G, Chrysostomou S. Beneficial Effects of Yoghurts and Probiotic Fermented Milks and Their Functional Food Potential. *Foods.* 2022 Sep 3;11(17):2691. DOI: 10.3390/foods11172691.

## EVALUACIÓN DEL CONTENIDO EN COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN KÉFIRES COMERCIALES

Beatriz Nieto-Rodríguez, Amanda Fernández-Vázquez, Manuel Olalla-Herrera, Jesús Lozano-Sánchez, Rafael Giménez-Martínez

Departamento de Nutrición y Bromatología, Campus de Cartuja, Universidad de Granada, 18001, Granada, España.

El kéfir es un producto lácteo fermentado que se obtiene por fermentación de la leche con granos de kéfir, una simbiosis de bacterias lácticas y levaduras en una matriz compleja de polisacáridos y proteínas. Se ha asociado a beneficios para la salud por ser probiótico y presentar moléculas con actividad biológica, con potencial antioxidante (1). Actualmente, es bien conocido que el estrés oxidativo contribuye significativamente al riesgo de desarrollar enfermedades como las cardiovasculares y el cáncer. Dietas ricas en antioxidantes naturales pueden ayudar a reducir este riesgo. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue comparar el contenido de compuestos fenólicos en muestras de kéfir comerciales elaborados con leche de vaca y cabra, respaldando las afirmaciones sobre sus beneficios saludables y funcionales para los consumidores.

Un total de 11 muestras de kéfir fueron seleccionadas de supermercados de la ciudad de Granada, incluyendo 6 de leche de vaca (entera y desnatada), y 5 de leche de cabra (entera). La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo usando cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas en tándem con electrospray (HPLC-ESI-MS-MS) que permitió la detección de 10 compuestos fenólicos, pertenecientes a los grupos de los ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, estilbenos y fenoles simples.

En el presente trabajo, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de polifenoles en el kéfir respecto a su contenido graso ( $p > 0,05$ ). El compuesto fenólico más abundante en todas las muestras fue el ácido vanílico (al que se han atribuido propiedades cardioprotectoras), con una concentración ligeramente superior en el kéfir de vaca entero (1,52-2,45  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) frente al de cabra (1,17-2,03  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ); seguido del ácido 4-hidroxifenilacético, con concentraciones muy similares para el kéfir de vaca entero (0,21  $\pm$  0,09  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ); desnatado (0,20  $\pm$  0,03  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ); y de cabra (0,22  $\pm$  0,08  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ). La rutina, el hidroxitirosol y la luteolina solo se detectaron en algunas muestras de kéfir de vaca y cabra enteras, lo cual podría explicarse por el origen vegetal de los polifenoles, de modo que su presencia en la leche se ve influenciada por la alimentación del animal.

En conclusión, las leches fermentadas como el kéfir juegan un papel fundamental en la nutrición humana, por ser buenas fuentes de macronutrientes y micronutrientes. Además de eso, contienen compuestos bioactivos como polifenoles. Esto hace que el kéfir sea un complemento valioso en la dieta de la población.

### Referencias

1. Baniyadi M, Azizkhani M, Saris PEJ, Tooryan F. Comparative antioxidant potential of kefir and yogurt of bovine and non-bovine origins. *J Food Sci Technol.* 2022 Apr;59(4):1307-1316. DOI: 10.1007/s13197-021-05139-9.

Esta investigación se ha desarrollado gracias a la financiación de los proyectos C-CTS-080-UGR23 y B-CTS-252-UGR20.

## COMPOSICIÓN FENÓLICA DE ESPECIALIDADES DE SOJA FERMENTADA COMERCIALES. INTERÉS EN LA ALIMENTACIÓN

Beatriz Nieto-Rodríguez, Amanda Fernández-Vázquez, Manuel Olalla-Herrera, Jesús Lozano-Sánchez, Rafael Giménez-Martínez

Departamento de Nutrición y Bromatología, Campus de Cartuja, Universidad de Granada, 18001, Granada, España.

Actualmente, existe un creciente interés por los productos de soja, entre ellos, las especialidades de soja fermentada, principalmente en personas con intolerancia a la lactosa, alergia a la proteína de la leche y población vegetariana por ser una alternativa a la leche y los productos lácteos. Por otro lado, es ampliamente conocido que el estrés oxidativo que se produce en el organismo contribuye al desarrollo de diversas enfermedades(1). En este contexto, los compuestos fenólicos, presentes en los alimentos de origen vegetal, son ampliamente valorados por sus propiedades antioxidantes. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar el perfil en compuestos fenólicos de una muestra de especialidades de soja fermentada disponibles en el mercado español, con la finalidad de establecer su papel antioxidante.

Se adquirieron 8 muestras de especialidades de soja fermentada en los principales supermercados españoles para el análisis de los compuestos fenólicos. La cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas en tándem con electrospray (HPLC-ESI-MS-MS) fue elegida como técnica analítica, y permitió identificar y cuantificar un total de ocho compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos) y flavonoides.

Los resultados obtenidos señalaron que los ácidos fenólicos fueron el grupo predominante de compuestos fenólicos identificados en las muestras de especialidad de soja fermentada analizadas. El ácido vanílico, al que se le han atribuido propiedades hepato y cardioprotectoras, presentó el mayor valor medio, con 3,17  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (ND-4,01  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). Dentro de los ácidos hidroxicinámicos, se destacó el contenido de ácido cumárico (0,903-4,137  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), interesante por su potencial protector contra enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer, así como el ácido siríngico (0,33-5,02  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). La rutina se detectó únicamente en una de las muestras.

En conclusión, este estudio ha demostrado la presencia de compuestos fenólicos en las especialidades fermentadas de soja disponibles en supermercados españoles. Junto con su ya conocido valor nutricional (fuente de proteínas de alta calidad y fibra dietética), éstas se presentan como una buena alternativa a los lácteos fermentados para aquella población que no pueda consumirlos.

### Referencias

1. Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. Infect Disord Drug Targets. 2020;20(1):16-26. DOI: 10.2174/1871526518666180628124323.

### Agradecimientos

Esta investigación se ha desarrollado gracias a la financiación de los proyectos C-CTS-080-UGR23 y B-CTS-252-UGR20.

## DESARROLLO DE MODELOS CELULARES HER2+ COMO HERRAMIENTAS IN VITRO PARA LA MEJORA DE INMUNOTERAPIAS CAR-T CONTRA TUMORES SÓLIDOS

S. Núñez-Morales<sup>1,2,6</sup>, M. Reina-Vázquez<sup>1,2,6</sup>, A. I. Marcos-Castilla<sup>1,2,6</sup>, C. Blanco-Benítez<sup>1,2,5</sup>, M. Parelló<sup>1</sup>, L. Morata-Giménez<sup>1,2</sup>, N. Aptsiauri<sup>3</sup>, M. Cuadros<sup>3</sup>, M. Tristán-Manzano<sup>4,5</sup>, F. Martín<sup>2,3,5</sup>, V. Ayllón<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. <sup>2</sup> Laboratorio de Terapia Génica y Celular. Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO). Granada, España. <sup>3</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España. <sup>4</sup> LentiStem Biotech, Granada, España. <sup>5</sup> Grupo TEC-16 ibs.GRANADA, Granada, España. <sup>6</sup> Co-primeras autoras

La inmunoterapia basada en células CAR-T ha supuesto una revolución en el tratamiento de leucemias y linfomas CD19+, y más recientemente también se ha aplicado a pacientes con mieloma múltiple BCAM+. Sin embargo, en el contexto de los tumores sólidos las células CAR-T tienen que enfrentarse a diferentes condiciones adversas que reducen su actividad citotóxica y que provocan que el tratamiento no sea eficaz, entre las que destacan la dificultad para la infiltración del tumor y un microambiente tumoral hostil. Estas condiciones adversas generan el agotamiento de las células CAR-T y por tanto una deficiencia en su actividad citotóxica y antitumoral.

Nuestro objetivo es generar modelos tridimensionales de tumores HER2+ que mimeticen lo mejor posible la estructura y el microambiente característicos de los tumores sólidos, y que sirvan para estudiar la capacidad citotóxica de las células CAR-T en este ambiente hostil y de difícil acceso a la célula diana. Para ello, hemos usado vectores lentivirales que portan los genes reporteros eGFP-NanoLuciferasa para generar líneas tumorales transgénicas HER2+ de adenocarcinoma pancreático (PANC-1, BxPC3), ovario (A2780) y melanoma (ESTDAB-112). Estas líneas tumorales HER2+ GFP-NanoLuc+ mantienen la expresión del antígeno tumoral HER2 contra el que está dirigido el CAR, así como los niveles de expresión de HLA y PDL1 (proteínas de gran relevancia en la capacidad de reconocimiento y respuesta citotóxica de las células T). Además se han puesto a punto las condiciones para realizar cultivos tridimensionales homotípicos o esferoides con las líneas de adenocarcinoma pancreático ductal PANC-1 y BxPC3. Estos esferoides demuestran un crecimiento continuado durante al menos 20 días, con alta viabilidad celular.

Una vez establecidos estos organoides homotípicos, nuestro siguiente objetivo a corto plazo es generar organoides heterotípicos, en los que combinaremos las líneas tumorales HER2+ GFP-NanoLuc+ con otros tipos celulares del tumor sólido, tales como fibroblastos asociados a tumores. Estos organoides representarán un mejor sistema *in vitro* en el que evaluar la capacidad citotóxica de las células CAR-T anti-HER2, comparado con los ensayos citotóxicos realizados en cultivos bidimensionales.



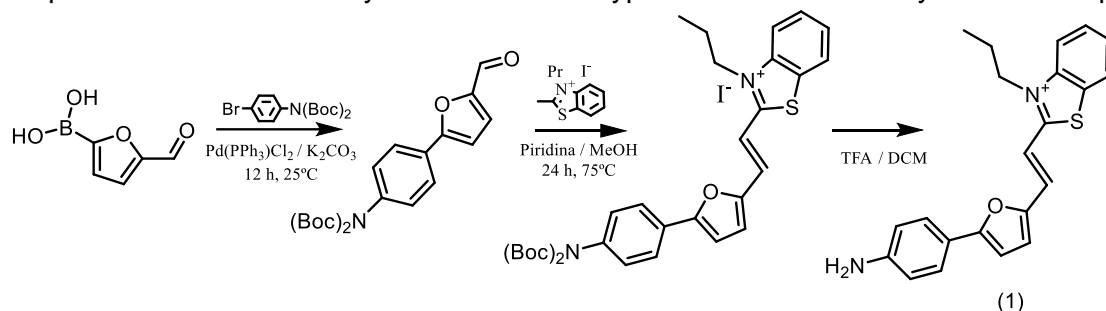
## SYNTHESIS OF A NEAR-INFRARED FLUORESCENT (NIR) DYE FOR BIOANALYTICAL APPLICATIONS

María Ortiz-Bueno<sup>1</sup>, Javier Valverde-Pozo<sup>1</sup>, José Manuel Paredes Martínez\*<sup>1</sup>, Eva María Talavera-Rodríguez\*<sup>1</sup> and María Eugenia García-Rubiño<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja, S/N, 18071 Granada, Spain.

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

Fluorescent dyes are key molecular tools in biomedical research due to their high sensitivity, versatility, and non-destructive analytical capabilities [1]. This study introduces the organic synthesis of a new NIR fluorescent dye. This dye, designed for bioanalytical applications, possesses properties that could make it useful in probe-based detection systems for certain types of cancer with enzymatic overexpression.



**Figure 1:** Synthesis pathway for obtaining the fluorescent dye.

The synthesis involves a multi-step approach to form a functionalized heterocyclic compound. Nucleophilic substitution under basic conditions is followed by cyclization with a strong base, yielding a key intermediate. Condensation with an organic catalyst produces the final product (1). Despite promising results, optimization is needed to improve yields. The synthesized dye (Figure 1) emits in NIR region with high quantum yield, offering advantages like reduced autofluorescence and deeper tissue penetration, ideal for bioimaging, cancer diagnosis, and biomarker detection.

**ACKNOWLEDGMENTS:** PID2023-149650NB-(MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y FEDER, UE) and C-CTS-147-UGR23 (Proyectos Plan Operativo FEDER Andalucía 2021-2027).

### BIBLIOGRAPHY:

[1] Berezin, M. Y., *et al.* (2010). Fluorescence lifetime and imaging. *Chemical Reviews*, 110(5), 2641–2684. <https://doi.org/10.1021/cr900343z>

## IN VIVO EVALUATION OF CROSSLINKED TISSUE-LIKE COLLAGEN MEMBRANES FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Miriam Pareja-Malagón <sup>1</sup>, Jesús Chato-Astrain <sup>1,2</sup>, Paula Ávila-Fernández <sup>1,2</sup>, Miguel Etayo-Escanilla <sup>1,2</sup>, Ricardo Fernández-Valadés <sup>1,2,3</sup>, Ismael Ángel Rodríguez <sup>4</sup>, Mario Aníbal Rodríguez <sup>4</sup>, Miguel Alaminos <sup>1,2</sup>, Ingrid Garzón <sup>1,2</sup>, Fernando Campos <sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Department of Histology and Tissue Engineering Group, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> Division of Pediatric Surgery, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain. <sup>4</sup> Department of Histology, Faculty of Dentistry, National University of Cordoba, Cordoba, Argentina.

Chemically crosslinked collagen membranes using genipin offer a promising alternative in urethra, nerve, cornea, and oral mucosa tissue engineering due to their enhanced biocompatibility and structural stability (1). However, their integration and immunomodulatory effects require *in vivo* evaluation to confirm their clinical potential.

Decellularized collagen membranes crosslinked with 0.01% Genipin (cMB GP0.01%) were evaluated in an immunocompetent murine model (BALB/cJrj). Four experimental groups (surgical control, non-crosslinked membrane, crosslinked membrane, and non-operated control) were analyzed at 10- and 30-days post-implantation. Hematological, macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses were performed to assess biocompatibility, biodegradation, and immune response.

Firstly, Genipin-treated membranes demonstrated non-adverse effects at the local and systemic levels, showing no significant systemic hematological or histological alterations among groups. Moreover, cMB GP0.01 % exhibited reduced biodegradation rate at 30 days compared to non-crosslinked membranes. Histologically, a very thin pseudocapsule was found surrounding each biomaterial, and a higher proportion of pro-regenerative macrophages (CD163+) was observed in the cMB GP0.01% group.

Genipin crosslinking enhanced the structural stability of the membranes and modulated the immune response towards a pro-regenerative profile. This effect may be attributed to sustained polarization of macrophages into the M2 phenotype, supporting tissue regeneration and reducing the risk of chronic inflammation or rejection.

Collagen membranes crosslinked with 0.01% Genipin exhibit high biocompatibility, stability, and immunomodulatory capacity in *in vivo* models. These characteristics suggest their potential application in regenerative medicine for different tissues, including urethra, nerve, cornea, and oral mucosa.

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministry of Science, Innovation and Universities, grants FIS PI23/00335, FIS PI23/00337, FIS PI22/00059 and FIS PI18/00331. Cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) through the “*Una manera de hacer Europa*” program.

(1) Berasain J, et al. Genipin crosslinking promotes biomechanical reinforcement and pro-regenerative macrophage polarization in bioartificial tubular substitutes. *Biomed Pharmacother.* 2024;174:116449. doi:10.1016/j.biopha.2024.116449.

## CREATING UNIVERSAL ANTI-CD19 CAR T CELLS WITH A MEMORY PHENOTYPE THROUGH PRECISION CRISPR/Cas9 EDITING

K Pavlovic<sup>1 2</sup>, MD Carmona-Luque<sup>2</sup>, GI Corsi<sup>3</sup>, N Maldonado-Pérez<sup>1</sup>, FJ Molina-Estévez<sup>1</sup>, M Cortijo-Gutiérrez<sup>1</sup>, P Justicia-Lirio<sup>4</sup>, M Tristán-Manzano<sup>4</sup>, V Ronco-Díaz<sup>1</sup>, A Ballesteros-Ribelles<sup>2</sup>, A Millán-López<sup>2</sup>, P Heredia-Velázquez<sup>1 5</sup>, C Fuster-García<sup>6</sup>, T Cathomen<sup>6</sup>, SE Seemann<sup>3</sup>, J Gorodkin<sup>3</sup>, F Martín<sup># 1 7 8</sup>, C Herrera<sup># 2 9</sup>, K Benabdellah<sup># 1</sup>

<sup>1</sup> Department of Genomic Medicine, Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), Granada, Spain. <sup>2</sup> Cell Therapy Group, Maimonides Institute of Biomedical Research in Cordoba (IMIBIC), Cordoba, Spain. <sup>3</sup> Department of Veterinary and Animal Sciences, Center for non-coding RNA in Technology and Health, University of Copenhagen, Thorvaldsensvej, Denmark. <sup>4</sup> LentiStem Biotech, Granada, Spain. <sup>5</sup> Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, Spain. <sup>6</sup> Center for Chronic Immunodeficiency, Medical Center - University of Freiburg, Germany. <sup>7</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology III and Immunology, University of Granada, Spain. <sup>8</sup> Biosanitary Research Institute of Granada, (ibs.GRANADA) University of Granada, Spain. <sup>9</sup> Department of Hematology, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain. #Contributed equally.

Chimeric antigen receptor-expressing T cells (CAR T cells) have revolutionized the treatment of cancer, particularly in B cell malignancies. Despite their success, CAR T cell therapy faces significant limitations due to the reliance on autologous T cells, which can lead to increased costs, variable efficacy, and adverse effects related to cell phenotype. To overcome these challenges, we have developed a novel strategy to generate universal and safe anti-CD19 CAR T cells characterized by a defined memory phenotype.

Our approach utilizes CRISPR/Cas9 technology for the precise elimination of the B2M and TRAC genes. This genetic modification reduces the risk of both graft-versus-host disease (GVHD) and host-versus-graft rejection. Additionally, we select for less differentiated T cells to enhance the stability and persistence of the universal CAR T cells, thereby improving their therapeutic potential.

To ensure the safety and efficacy of our CAR T cells, we conducted comprehensive transcriptomic and genomic analyses. These evaluations provided robust evidence of successful gene knockout and confirmed the absence of unintended off-target effects on gene expression and overall transcriptome integrity. Our findings underscore the importance of thorough genomic and transcriptomic assessments in validating the safety of genome-edited cell therapies.

In vitro studies demonstrated that our memory universal CAR T cells exhibit potent cytotoxic activity against tumor cells while maintaining a more controlled cytokine secretion profile. This balance is crucial for reducing potential side effects associated with excessive cytokine release, a common complication in CAR T cell therapies.

In conclusion, we have established an effective and scalable pipeline for the production of safe universal CAR T cells with a favorable memory phenotype. This advancement holds promise for enhancing the accessibility, efficacy, and safety of CAR T cell therapies, potentially extending their benefits to a broader patient population. Our work underscores the potential of CRISPR/Cas9 technology in developing next-generation cell therapies and highlights the importance of rigorous safety evaluations in the context of genome editing.

## MECANISMOS MOLECULARES DE LA SARCOPENIA: EFECTO PROTECTOR DEL EJERCICIO Y LA MELATONINA EN UN MODELO DE RATÓN KNOCKOUT PARA *Bmal1*

Yolanda Ramírez-Casas<sup>1,2,\*</sup>, José Fernández-Martínez<sup>1,2,\*</sup>, Paula Aranda-Martínez<sup>1,2</sup>, Germaine Escames<sup>1,2,3</sup>, Darío Acuña-Castroviejo<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Granada, España. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (Ibs.Granada), Granada, España. <sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERfes), Madrid, España.

\*Ambos autores han contribuido igualmente a este trabajo.

La sarcopenia se caracteriza por la pérdida de masa, fuerza y función muscular en el envejecimiento. Los tratamientos actuales son limitados debido a la incompreensión de los mecanismos subyacentes que dan lugar a la aparición de esta enfermedad. El estudio en el modelo de ratón knockout para *Bmal1* inducible y específico de músculo esquelético (iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup>) demostró que la ausencia de este gen provoca sarcopenia, dando lugar a alteraciones en la estructura muscular, desregulación en el ritmo de actividad, disminución de la capacidad oxidativa y daño mitocondrial. Estos cambios se revirtieron con los tratamientos de ejercicio y/o melatonina independientemente de la ausencia de *Bmal1*.

El análisis molecular reveló cambios en la miogénesis, indicando disfunción en la proliferación y diferenciación muscular, que fue restaurada por los tratamientos. Aunque, los ratones iMS-*Bmal1*<sup>-/-</sup> no presentaron cambios en la OCR, se ve afectada por el ejercicio y mejorada por la melatonina a través del complejo I. Además, se identificaron cambios en la dinámica mitocondrial, incluyendo los procesos de biogénesis, fusión, fisión y mitofagia, que también fueron restaurados por los tratamientos. Por último, la pérdida de *Bmal1* comprometió la defensa antioxidante, produciendo alteraciones en la inflamación, y afectando el metabolismo muscular.

Estos resultados destacan la importancia de *Bmal1* en la homeostasis muscular y posicionan al ejercicio y la melatonina como estrategias prometedoras para prevenir o tratar la sarcopenia.

Este estudio ha sido financiado por el Instituto Carlos III: PI19-01372.

## INSERTION OF THE DONOR CASSETTE INTO CX3CR1 ENABLES EPIGENETIC REGULATION OF A CONSTITUTIVE PROMOTER IN HEMATOPOIETIC STEM CELLS, LEADING TO ITS ACTIVATION DURING MYELOID DIFFERENTIATION

Iris Ramos-Hernández<sup>1, 2</sup>, Carla Fuster-García<sup>3, 4, 5</sup>, María L Lozano-Vinagre<sup>6</sup>, Guillermo Guenechea-Amurrio<sup>6</sup>, Manuel AFV Gonçalves<sup>7</sup>, Toni Cathomen<sup>3, 4, 5</sup>, Pilar Muñoz<sup>2, 8, 9</sup>, Francisco J Molina-Estévez<sup>1, 2, 9, \*</sup>, Francisco Martín<sup>2, 9, 10, \*</sup>

<sup>1</sup> Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria en Andalucía Oriental Alejandro Otero (FIBAO), Avenida de Madrid, 15, Beiro, 18012 Granada, Spain. <sup>2</sup> GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer, University of Granada, Andalusian Regional Government PTS Granada, Avenida de la Ilustración 114, 18016 Granada, Spain. <sup>3</sup> Institute for Transfusion Medicine and Gene Therapy, Medical Center—University of Freiburg, 79106 Freiburg, Germany. <sup>4</sup> Center for Chronic Immunodeficiency (CCI), Medical Center—University of Freiburg, 79106 Freiburg, Germany. <sup>5</sup> Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany. <sup>6</sup> Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) and Advanced Therapies Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD, UAM), Madrid, Spain. <sup>7</sup> Leiden University Medical Center, Department of Cell and Chemical Biology, Einthovenweg 20, 2333 ZC, Leiden, The Netherlands. <sup>8</sup> Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, 18071 Granada, Spain. <sup>9</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>10</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Avda. de la Investigación 11, 18071 Granada, Spain.

\* Share senior authorship

To improve *ex vivo* gene therapy approaches targeting hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), we propose a novel knock-in strategy called KI-Ep. This method aims to harness natural epigenetic modifications for precise regulation of the inserted transgene. To test this concept, we selected *CX3CR1* (a gene myeloid-specific and epigenetically poised at HSPCs) as a safe harbor site for generating KI-Ep HSPCs. Our results show that inserting a constitutive expression cassette into intron 4 of the *CX3CR1* gene (*CX3CR1-I4*) leads to minimal transgene expression in primitive HSPCs, but strong expression in differentiated HSPC populations, particularly in myeloid cells, both *in vitro* and *in vivo*. We further demonstrated that the promoter of the inserted cassette acquires epigenetic marks characteristic of poised genes in HSPCs, which transition to active marks upon differentiation. In conclusion, we present the KI-Ep strategy as a novel approach that allows for dynamic epigenetic regulation of the transgene, remaining repressed in stem cell stages and becoming activated upon differentiation.

## TOWARDS A HUMANIZED MOUSE MODEL OF POMPE DISEASE

Iris Ramos<sup>1,3</sup>, Laura Martínez<sup>1,2</sup>, Lucía Méndez<sup>4</sup>, Patricia Hernández-Carabias<sup>5</sup>, Francisco Martín<sup>1,2,6</sup>, Manuel A. Sánchez<sup>4,5</sup>, Pilar Muñoz<sup>1,2</sup>, Francisco Javier Molina-Estévez<sup>1,3,6</sup>.

<sup>1</sup>Centro Pfizer – Universidad de Granada – Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (Genyo). Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Av. de la Ilustración 114, 18016 Granada; Spain. <sup>2</sup>Department of Cellular Biology, Faculty of Sciences. University of Granada (UGR). Campus Fuentenueva, 18071, Granada, Spain. <sup>3</sup>Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental (FIBAO). Avd. de Madrid, 15. Pabellón de Consultas Externas, 2ª Planta, 18012, Granada, Spain <sup>4</sup>Instituto de investigación biomédica de Salamanca (IBSAL) Salamanca, Spain <sup>5</sup>Servicio de Transgénesis. Universidad de Salamanca (USAL). Salamanca, Spain. <sup>6</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain.

\*These authors contribute equally to this work.

Pompe Disease (PD) is a lysosomal storage disorder (LSD) with significant unmet medical needs. This inherited condition leads to the progressive degeneration of multiple tissues, including the heart, diaphragm, skeletal muscles, and liver. PD is caused by a deficiency of the lysosomal glycogen-debranching enzyme, acid alpha-glucosidase (GAA), due to mutations in the *GAA* gene. More than a hundred mutations have been linked to decreased enzyme activity and the severity of the disease in patients. Despite disease severity, the only standard of care available, enzyme replacement therapy (ERT), involves recurrent intravenous infusions of a recombinant enzyme. While ERT can slow disease progression, it is not curative and only offers a therapeutic window of 5 to 10 years in the best responders.

While gene therapy has shown success in treating other LSDs, a major limitation in advancing curative treatments for Pompe Disease lies in the inadequacies of current murine *Gaa* knockout (KO) models for investigating human cellular therapies.

To address this challenge, we aim to leverage our expertise in CRISPR/Cas9-based cellular modeling of Pompe Disease to generate a humanized mouse model. Specifically, we identified a highly efficient guide RNA (gRNA) targeting mouse *Gaa* exon 2, capable of introducing indels that result in early GAA peptide truncations analogous to human infantile-onset PD mutations, specifically two infantile-onset Pompe Disease mutations (IOPD) c.483dupT and c.525delT. In collaboration with Dr. Sanchez Martín's laboratory, we introduced these mutations into mouse embryos, and we have successfully generated two novel *Gaa* KO mouse models in the DBA/2J strain. These mutations were confirmed through Sanger sequencing, and a stable colony has been established.

Ongoing work is focused on rederiving these IOPD *Gaa* mutations into the NSG mouse strain to create a humanizable model of Pompe Disease, which will advance the study of cellular gene therapies.

## CANCER THERAPEUTIC APPLICATION OF INTRACELLULAR NANOCATALYSTS

Monica Rodriguez Segura<sup>‡ 1,2,3</sup>, Jose Francisco Lopez Delgado<sup>‡ 4</sup>, Maria Victoria Cano-Cortes<sup>1,2,3</sup>, Juan Jose Diaz-Mochon<sup>1,2,3</sup>, Rosario M. Sanchez-Martin<sup>‡ 1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Avda. Ilustración 114, 18016 Granada, Spain. <sup>2</sup> 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, Granada, Spain. <sup>3</sup> Instituto de investigación biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), University Hospitals of Granada-University of Granada, Granada, Spain. <sup>4</sup> DestINA Genomica SL, PTS Granada, Av. de la Innovación, 1, 18100 Granada, Spain.

‡ These authors have contributed equally to this work

\*E-mail: rmsanchez@go.ugr.es

Click chemistry reactions were introduced in the early 20th century by Sharpless, and in the early 2000s Bertozzi took the concept a step further by developing a new field called bioorthogonal chemistry. The most important of these reactions is the copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), for which Sharpless, Meldal and Bertozzi were awarded the Nobel Prize in Chemistry in 2022.

However, the use of copper in biological systems presents significant challenges. The structure and oxidation state of copper complexes can influence their bioavailability, ligand transfer, cellular uptake and toxicity. In addition, reactive oxygen species (ROS) generated by copper catalysts can make the CuAAC reaction less suitable for biological applications. To overcome these obstacles, Bertozzi introduced the copper-free bioorthogonal reaction for in vivo applications, using the cyclooctyne ring to favour the reaction and achieve suitable click chemistry without copper. Despite this success, there are still many open-alkyne precursors that would benefit from CuAAC reactions in living systems, highlighting the need for copper compounds with reduced biotoxicity.

In this context, heterogeneous copper catalysts have emerged as a less toxic version compared to homogeneous copper catalysts used in azide-alkyne cycloaddition processes in biological systems. In this work, we have developed a nanocatalyst based on copper metallofluorescent nanoparticles capable of catalysing cytoplasmic in vitro CuAAC reactions, providing a new tool in the set of non-biotoxic heterogeneous copper catalysts.

## ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE TNSALP SOBRE EL INFLASOMA EN PACIENTES CON HPP

Paula Rodríguez Lozano <sup>1</sup>, Carlos Martín Villegas <sup>1</sup>, Luis Martínez Heredia <sup>2,3</sup>, Beatriz García Fontana <sup>2,3,4</sup>, Cristina García Fontana <sup>2,3,4</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Universidad de Granada, Granada, 18016, España. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), Granada, 18012, España. <sup>3</sup> Instituto de Salud Carlos III, CIBER de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Madrid, 28029, España. <sup>4</sup> Unidad de Endocrinología y Nutrición, Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada, 18016, España.

**Introducción:** La hipofosfatasa (HPP), es una enfermedad genética rara. Esta enfermedad está basada en el mal funcionamiento de una enzima conocida como fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP) debido a mutaciones de pérdida de función en el gen responsable de su codificación (ALPL). Esta enzima se caracteriza por hidrolizar enlaces monoéster generando fosfato inorgánico, teniendo un papel fundamental en el metabolismo óseo, por ello algunos de los síntomas principales de esta enfermedad ocurren a nivel óseo y dental. Algunos de los sustratos conocidos son pirofosfato inorgánico, piridoxal 5-fosfato, ATP o lipopolisacáridos bacterianos (LPS).

El inflamasoma, es un complejo multiproteico implicado en el proceso de respuesta inmunitaria, que se forma por el reconocimiento de patrones moleculares de daños (DAMPs) y patógenos (PAMPs) dando lugar a una cascada de activación que desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias. Varios estudios han recogido que existe una alteración significativa de la cascada de activación en algunas enfermedades inflamatorias inmunomediadas como la psoriasis, lupus, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o dermatitis. Estudios recientes han observado una prevalencia de enfermedades inflamatorias inmunomediadas de hasta el 45% en pacientes afectados por HPP. Nuestra hipótesis es que la pérdida de función de TNSALP podría estar afectando a la vía de activación del inflamasoma.

**Materiales y métodos:** Se realizará la construcción de plásmidos lentivirales (pLVX) con variantes del gen identificadas en pacientes con HPP. Se generarán lentivirus a partir de células HEK293. Además, se llevará a cabo la transducción de las variantes del gen ALPL en líneas celulares de linfocitos T (jurkat), macrófagos (U937) y neutrófilos (HL-60). Se llevarán a cabo ensayos de actividad de TNSALP mediante la inducción de la vía del inflamasoma mediante ATP, LPS, nigericina e ionomicina. Se estudiará la activación de las vías de inflamación mediante determinación de citoquinas IL-6, IL-8 entre otras. Por otra parte, se determinará la expresión de caspasa 1, IL-1 $\beta$ , mediante inmunofluorescencia, qPCR, así como mediante estudios de cambio fenotípico mediante citometría de flujo. Por último, se realizaron ensayos de migración celular.

**Perspectivas a futuro:** La confirmación de nuestra hipótesis evidenciando la relación entre TNSALP e inflamasoma, supondría encontrar nuevas dianas terapéuticas para pacientes con HPP con problemas inmunitarios e inflamatorios, pues estas condiciones se ven desfavorecidas cuando el inflamasoma se ve alterado. Actualmente, existen terapias que actúan directamente sobre esta cascada inmunológica por lo que dichas terapias podrían ser afectivas para estos pacientes afectados por HPP mejorando las comorbilidades asociadas al déficit de TNSALP y mejorando sustancialmente su calidad de vida.



## GENERATION AND IN VITRO CHARACTERIZATION OF A NOVEL 3D-PRINTED TUBULAR MESH FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Sara Román-Ceballos<sup>1,2</sup>, Miguel Etayo-Escanilla<sup>1,2</sup>, Noelia Campillo<sup>3</sup>, Ingrid Garzón<sup>1,2</sup>, Ricardo Fernández-Valadés<sup>1,2</sup>, María del Carmen Sánchez-Quevedo<sup>1,2</sup>, Fernando Campos<sup>1,2</sup>, Óscar García-García<sup>1,2</sup>, Víctor Carriel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Histology and Tissue Engineering Group, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> REGEMAT 3D, Granada, Spain.

Tubular or cylindrical organs, such as nerves, blood vessels or urethra require advanced fabrication techniques to replicate their complex structure and biomechanics [1]. In this sense, this study explores the potential of an innovative four-axis 3D-printing technique to fabricate hollow, meshed tubular scaffolds, and evaluates their suitability for tissue engineering applications. Selected materials include polycaprolactone (PCL) and novel ion-enriched PCL filaments incorporating hydroxyapatite (PCL-5%HA) and (PCL-15%HA).

The selected biomaterials were subjected to printability tests using the four-axis 3D printer. Five tubular scaffold configurations of the different biomaterials were designed (varying in pore size and endpoint density), and subsequently subjected to mechanical characterization to identify the optimal structure. In this regard, the mechanical properties, including Young's modulus, strain, and fracture resistance were assessed for each configuration. Finally, the tubular scaffolds were subjected to *in vitro* cell-biomaterials interaction analyses. Human neural SK-N-AS cells were directly or indirectly cultured on the generated scaffolds and cell viability and metabolic activity was determined by Live/Dead and WST-1 assays after 7 days of cell culture.

All the tested biomaterials exhibited great resolution and shape-fidelity according to the printability tests. However, when the different configurations were evaluated, the 10 endpoints/0.5-line verticality (P10V0.5) configuration was identified as the optimal design, in terms of biomechanical behavior and porosity as compared to other designs. Furthermore, higher HA concentrations improved strength and fracture resistance. *In vitro* cell-biomaterial interaction analyses revealed that materials enriched with HA, showed similar cell viability, adhesion and metabolic activity over time as compared to PCL alone.

The four-axis 3D printing technique has been demonstrated to be an effective method to produce 3D tubular meshes allowing for precise control over geometry, pore architecture, and mechanical properties that could be useful in tissue engineering of the human nerves, blood vessels or urethra. These developments address critical challenges in replicating the complexity of tubular tissues, such as blood vessels, nerves or urethra, which represent a significant advancement in tissue engineering. HA-enriched PCL scaffolds showed promising *in vitro* biocompatibility, promoting cell growth and proliferation. However, further *in vivo* studies will be necessary to validate these findings and evaluate scaffold performance in biological environments.

This work was financed by the Spanish Plan Estatal de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica" (I+D+i) of the Ministry of Science and Innovation of Spain (Instituto de Salud Carlos III Grants FIS PI23/00337 and FIS FIS PI22/00059), co-financed by FEDER funds (European Union); Funded by "Proyectos de colaboración público-privada, Plan de Investigación Científica, Técnica y de innovación 2021–2023 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and European Union-NextGenerationEU/PRTR) (Grant CPP2021-009070).

[1] van Kampen KA, et al. (2021). Controllable four axis extrusion-based additive manufacturing system for the fabrication of tubular scaffolds with tailorable mechanical properties. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111472

## MELATONIN ACTIVATES HUMAN SKELETAL MUSCLE CALCIUM-DEPENDENT THERMOGENESIS IN VITRO: ROLE OF MELATONIN RECEPTOR 2

Clara Rubio García<sup>1</sup>, Diego Salagre<sup>1</sup>, Rocío Haro López<sup>1</sup>, Juan Sanjuan Hidalgo<sup>2</sup>, Pedro Pablo Medina<sup>2</sup>, Ahmad Agil<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, BioHealth Institute (ibs.GRANADA), and Neurosciences Institute "Federico Olóriz", Biomedical Research Center (CIBM), School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain. <sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Sciences, University of Granada, and GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain.

Melatonin, apart from being a circadian regulator, regulates metabolism through specific nuclear (ROR $\alpha$ ) and plasma membrane receptors (MT1 and MT2) exhibiting different pathway activation. Obesity have become a global health problem and melatonin is gaining importance because of its regulatory function in lipid and glucose metabolism. Previous works showed that melatonin improves obesity by inducing non-shivering thermogenesis in adipose and skeletal muscle (SKM) tissues in rodents, but the clinical effects of melatonin on human weight loss are very scattered and inconclusive, possibly because of the large number of allelic variants of the MT2 gene. Here, we aim to study the role of MT2 in human melatonin-activated SKM thermogenesis.

A protein-protein interaction (PPI) network and functional enrichment analysis were performed using String, showing that MTNR1B is related to metabolism regulation in obesity and diabetes, being so close to other thermogenic genes such as UCP1, PGC1 $\alpha$ , and PPARG. Primary human SKM cells (hSKMC) were seeded and cultured in DMEM supplemented with L-glutamine (2 mM), 10% fetal bovine serum (FBS), and 1% penicillin/streptomycin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> 3 days before transfection. Transfection with an siRNA mix against the MTNR1B gene was performed using Lipofectamine 2000 and opti-MEM following manufacturer protocol. After 3 days transfections, hSKMC were treated with 1mM melatonin for 48 hours. MTNR1B knockdown was confirmed by q-PCR with a reduction in MT2 expression of more than 70%. Furthermore, MT2 was found to be the melatonin receptor involved in human skeletal muscle calcium-dependent thermogenesis by SERCA-SLN uncoupling after Western-Blot analysis.

In conclusion, melatonin effects in human SKM thermogenesis are induced by MT2 activation, which could help in the design of more effective melatonergic drugs against diabetes and predict their effects on patients depending on their allelic variant of the MTNR1B gene.

This study was supported by grant PID2021-125900OB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and, by ERDF "A way of making Europe".

## DEVELOPMENT OF A NOVEL VHH-BASED CAR-T CELL THERAPY AGAINST EpCAM+ TUMORS

J Ruiz de Francisco<sup>1</sup>, C Barbero-Jiménez<sup>2,5</sup>, P Justicia-Lirio<sup>3</sup>, A Hinckley Boned<sup>1</sup>, M Tristán-Manzano<sup>4</sup>, A Linde-Rodríguez<sup>5</sup>, JA García-Salcedo<sup>5</sup> and F Martín-Molina<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Gene and Cell Therapy Group, GENYO, Granada, Spain. <sup>2</sup> Hemato-Oncology Program, CIMA Universidad de Navarra, Pamplona, Spain. <sup>3</sup> Program of Immunology and Immunotherapy, CIMA Universidad de Navarra, Pamplona, Spain. <sup>4</sup> Lentistem Biotech, Granada, Spain. <sup>5</sup> Biology of non-canonical DNA Structures Group, GENYO, Granada, Spain.

Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) has emerged as a compelling target for CAR-T cell therapy due to its high expression on the surface of various epithelial-derived cancers and its limited presence in normal tissues. EpCAM plays a critical role in cell adhesion, proliferation, and differentiation, making it a hallmark of tumor progression and metastasis in many solid tumors. Its consistent overexpression across multiple cancer types, positions EpCAM as a potential candidate in immunotherapy, specially for precise and effective CAR-T cell-mediated tumor targeting. However, while EpCAM is overexpressed in many cancers, it is also present in normal epithelial tissues. Targeting EpCAM could result in on-target/off-tumor activity. Moreover, high levels of EpCAM in tumor cells may lead to continuous activation of EPCAM-targeted CAR-T cells, which can result in tonic signaling, causing cell exhaustion or dysfunction. This underscores the need to develop new CAR designs with improved safety and efficacy.

Single domain antibodies (Nbs)-based CAR-T therapy offers several potential advantages due to the smaller size, better tumor penetration, high specificity and lower tonic signaling of the recognition domain. In the present study, we developed EpCAM-targeting Nbs, selecting 4 candidates that were characterized in terms of affinity, binding kinetics and epitope conformation. Results indicated that all Nbs are capable of binding EpCAM, remarkably with varying degrees of affinity. Consequently, we designed CAR constructs following the clinical gold standard (2<sup>nd</sup> generation, EF1 $\alpha$  promoter, 4-1BB costimulatory domain), incorporating the Nb sequences as the recognition domain. Moreover, we designed the CARs to achieve the co-expression of a truncated version of the elongation growth factor receptor (EGFRt), allowing efficient *in vivo* CAR-T cell elimination upon Cetuximab administration, thereby providing a functional safety switch. Primary evaluation of each NbCAR in a Jurkat reporter cell line demonstrated highly specific activation through the two most relevant CAR-T cell activation pathways (NFAT and NF $\kappa$ B) with minimal tonic signaling. For future cytotoxicity and antitumoral efficacy studies—currently underway—we have evaluated and generated a range of cellular models based on EpCAM expression levels.

## GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS GAA KNOCK-OUT COMO MODELO PARA LA ENFERMEDAD DE POMPE

Elena Ruiz Robles<sup>1,2\*</sup>, L. Martínez-Ruiz<sup>1,2\*</sup>, A. Aguilar-Gonzalez<sup>2,3,6</sup>, I. Ramos-Hernandez<sup>2,5</sup> F. Martín-Molina<sup>2,4,6</sup>, P. Muñoz-Fernandez<sup>1,2,6</sup> F.J. Molina-Estevéz<sup>2,5,6</sup>

1: Departamento de Biología Celular (Facultad de Ciencias), Universidad de Granada 2: GENyO- Centro de Genómica e Investigación Oncológica: Pfizer / Universidad de Granada / Junta de Andalucía 3: Departamento de Química Médica y Orgánica y Unidad de Investigación de Excelencia de "Química aplicada a la Biomedicina y al Medio Ambiente" (Facultad de Farmacia), Universidad de Granada 4: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología (Facultad de Medicina), Universidad de Granada 5: Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental (FIBAO) 6: Grupo TEC16, ibs.GRANADA Instituto de Investigación Biosanitaria

\* *Ambas autoras comparten autoría.*

La enfermedad de Pompe (PD) es un trastorno autosómico recesivo grave caracterizado por presentar mutaciones en el gen codificante para la enzima alfa glucosidasa ácida (GAA). La función de la enzima consiste en degradar el glucógeno en los lisosomas por lo que su deficiencia provoca una acumulación de este en diversos tejidos, siendo el más afectado el tejido muscular cardíaco y esquelético. El único tratamiento aceptado para tratar a los pacientes Pompe actualmente es la terapia de reemplazo enzimático, basada en la administración de enzimas funcionales exógenas. No obstante, este tratamiento no asegura la cura y además presenta ciertas limitaciones que disminuyen su eficacia. Por ello se han buscado alternativas como la terapia génica, en la que se enfoca este trabajo. Este trabajo se centra en la creación y caracterización de nuevos modelos celulares humanos que mimeticen el fenotipo Pompe con el fin de desarrollar y analizar con ellos nuevas herramientas terapéuticas de edición génica. Para ello, se han editado células mieloides THP-1 mediante tecnología CRISPR/Cas9 a fin de introducir mutaciones idénticas a las de pacientes Pompe. La descripción de dichos modelos se ha hecho a partir de estudios sobre su genoma, la expresión de la enzima GAA y su actividad, mediante técnicas de biología celular y molecular. En varios clones THP-1 GAA-KO hemos podido confirmar tanto la edición del Exón 2, una menor expresión de la proteína GAA y unos niveles de actividad similares a los esperados en pacientes de Pompe. Con este nuevo modelo celular se facilita la investigación y ensayos con nuevos fármacos a fin de desarrollar mejores tratamientos de la enfermedad de Pompe que consigan aumentar la calidad de vida de los pacientes.

## BIOIMPRESIÓN DE TUMORES EN DISPOSITIVOS METASTASIS-ON-A-CHIP: ¿EL FUTURO DE LA MEDICINA PERSONALIZADA?

Jesús Ruiz-Espigares<sup>1,2,3,4</sup>, Gema Jiménez<sup>1,2,3,4\*</sup>, Juan Antonio Marchal<sup>1,2,3,4\*</sup>

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

Durante décadas, se han llevado a cabo numerosos intentos para desarrollar modelos miméticos destinados al estudio de la metástasis, la principal causa de mortalidad asociada al cáncer. Estos esfuerzos buscan resolver las muchas incógnitas que aún rodean esta compleja enfermedad. Para entender mejor el proceso de diseminación celular, resulta indispensable contar con modelos más realistas que repliquen de manera precisa y completa el microambiente tumoral (TME). En este contexto, han surgido recientemente herramientas innovadoras conocidas como tumor-on-a-chip y metastasis-on-a-chip. Estas tecnologías combinan sistemas microfluídicos y cámaras de cultivo a pequeña escala, permitiendo recrear fielmente el TME gracias a la bioimpresión 3D.

En este trabajo, se presenta una revisión bibliográfica centrada en las distintas etapas del proceso metastásico, los interrogantes aún sin resolver y el uso de nuevos modelos para estudiar esta enfermedad. El objetivo es ofrecer una visión integral del estado actual de la investigación y destacar el enorme potencial de estos sistemas en el ámbito de la investigación traslacional *in vitro*, específicamente en el estudio de las bases moleculares de la patología. Además, estas herramientas abren el camino hacia una medicina personalizada, permitiendo generar chips a partir de muestras tumorales de pacientes. Esto posibilitará un cribado farmacológico más preciso, facilitando el diseño de protocolos de tratamiento optimizados para cada individuo.

## ORGANELLE-MOLECULAR MECHANISMS OF MUSCLE NON-SHIVERING THERMOGENESIS IN RESPONSE TO MELATONIN IN OBESE DIABETIC ZDF RATS

Diego Salagre <sup>1</sup>, Carmen María Claro-Cala <sup>2</sup>, Marina Villalón Mir <sup>3</sup>, Miguel Navarro Alarcón <sup>3</sup>, Ahmad Agil <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, BioHealth Institute (ibs.GRANADA), and Neurosciences Institute "Federico Olóriz", Biomedical Research Center (CIBM), School of Medicine, University of Granada, Spain. <sup>2</sup> Department of Pharmacology, Pediatric and Radiology, School of Medicine, University of Sevilla, Spain. <sup>3</sup> Department of Nutrition and Bromatology, School of Pharmacy, University of Granada, Spain

Obesity is a multifactorial chronic disease with global affection. Experimental data have revealed that melatonin limits obesity and its complications, partially mediated by the activation of brown and beige adipose tissue non-shivering thermogenesis (NST) in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. However, both mechanisms alone appear to be insufficient to justify the reduction in body weight observed. Recent studies showed that NST also occurs in skeletal muscle by uncoupling of sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) by sarcolipin (SLN) increasing mitochondrial biogenesis. This prompted us to investigate whether melatonin is a SERCA-SLN uncoupling enhancer and to further investigate the pathway involved in this process.

At 5 weeks of age, male and female ZDF rats and lean littermates (ZL) were subdivided into two groups: control (C) and those treated with oral melatonin (M) in the drinking water (10 mg/kg/day) for 12 weeks. Rats were weighed twice a week and SERCA-SLN uncoupling was measured by Western-Blot. Mitochondriogenesis was also measured. Finally, structure and lipid accumulation in skeletal muscle were evaluated by histological analysis.

Melatonin reduced mean weight gain in obese rats in both sexes. Melatonin restored vastus lateralis (VL) muscle temperature decreased in obese rats and sensitized the thermogenic effect of acute cold exposure in all obese treated groups. Moreover, in VL, melatonin induced an increase in protein levels of sarcolipin (SLN), and the expression and activity of SERCA2 isoform, one of the muscle pumps involved in heat production. Melatonin increased mitochondrial mass and preserved the structure of the skeletal muscle partially by decreasing lipid accumulation in VL from both sex ZDF rats.

In conclusion, melatonin increases VL heat production by SERCA2-SLN uncoupling raising the mitochondrial biogenesis and preserving the skeletal muscle structure by decreasing lipid accumulation in both sex obese diabetic ZDF rats.

This study was supported by grant PID2021-125900OB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and, by ERDF "A way of making Europe".

## MICROGLIA REDUCE ASTROCYTE VIABILITY IN THE AUTO-IMMUNE DISEASE NEUROMYELITIS OPTICA

María José Sánchez Garriguez<sup>1\*</sup>, Ana Isabel Sánchez-Castillo<sup>1\*</sup>, M. Rosario Sepúlveda<sup>1</sup>, Miguel-A. Cuadros<sup>1</sup>, José Luis Marín-Teva<sup>1</sup>, Carmen Infante Duarte<sup>2</sup>, Friedemann Paul<sup>2</sup>, Veronika E. Neubrand<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Cell Biology Dept., Facultad de Ciencias, University of Granada, Spain. <sup>2</sup> Experimental and Clinical Research Center, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany.

\*These authors have contributed equally to this work

Neuromyelitis Optica (NMO) and its spectrum disorders (NMOSD) are autoimmune diseases of the central nervous system (CNS). The auto-antibodies detected in most of the patients target the aquaporin-4 water channel (AQP-4), which is highly expressed in astrocytes, one of the glial cell types in the CNS. Consequently, the immune system attacks astrocytes, leading to astrocyte loss and neurodegeneration mainly in the optic nerve and spinal cord. The CNS-resident immune cell is another type of glial cell, namely microglia, representing the first line of defense of the CNS. Thus, it is likely that these cells participate in the molecular and cellular mechanism of NMOSD. To shed light on this, we co-cultured primary astrocytes and microglia from mouse, adding anti-AQP4 antibodies (anti-AQP4) and inflammatory stimuli. This treatment led to reduced astrocyte numbers which could be reversed by depleting microglia, indicating that microglia might play a key role in the etiology of this disease.

This work is supported by research grants from the Guthy-Jackson-Charitable Foundation (GJCF), USA; The Sumaira Foundation (TSF\_SPARK\_2022\_01), USA; the University of Granada (PPJIA2022.29), Spain; and the *Consejería de Universidad, Investigación e Innovación* and by the European Regional Development Fund (ERDF) Andalusia Program 2021-2027 (EXP.272.UGR23), Spain.

## EFFECT OF DOXYCYCLINE AND DEXAMETHASONE NANOPARTICLES ON SHEAR BOND STRENGTH TO DENTIN AFTER COLLAGENASE CHALLENGING

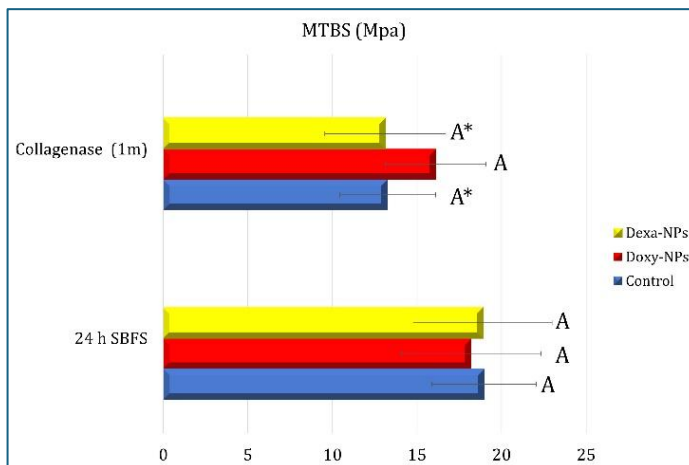
Fátima S. Aguilera<sup>1,2</sup>; Enrique Fernández-Romero<sup>1\*</sup>; Estrella Osorio<sup>1,2</sup>; Manuel Toledano<sup>1,2</sup>; Raquel Osorio<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Facultad de Odontología, Universidad de Granada. <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria. Granada. \* Estudiante de Posgrado

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

**Material and Methods:** Flat dentin surfaces from sound third molars were randomly assigned to 3 experimental groups based on the NPs that were applied: 1) Control -No NPs-, 2) Doxy-NPs and 3) Dexa-NPs. Bonded interfaces were created with an etch-and-rinse adhesive system (Single Bond -SB-) and stored for 24 h in SBFS. Specimens were divided in two subgroups: a) sectioned into beams, after 24 h storage in simulated body fluid solution (SBFS) and b) immersed in a collagenase solution for 1 month. The resin-dentin interface was evaluated through microtensile bond strength. 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; MPa: Megapascals; SBFS: simulated body fluid solution; NPs: nanoparticles; Doxy: Doxycycline; Dexa: Dexamethasone  
 Same letter indicates no significant differences between treatment groups within the same storage method ( $p < 0.05$ ).  
 \* indicate no significant differences between the storage method (24h SBFS or 1 month in Collagenase) in the same treatment group ( $p < 0.05$ ).

### Conclusions

At 24 h of analysis, no damaging effect on MTBS was observed when Doxy and Dex-NPS were applied. The incorporation of nanoparticles during bonding protocol maintains stable bonding to dentin after collagenase challenging in the Doxy-NPs group.

### Acknowledgements

Grant C-CTS-189-UGR23 funded by Consejería de Universidad, Investigación e Innovación and by ERDF Andalusia Program 2021-2027.



## CONSTRUCTION OF A BIOLOGICAL SUBSTITUTE OF THE HUMAN URETHRA TUNICA ALBUGINEA BY TISSUE ENGINEERING

David Sánchez-Porras<sup>1,2</sup>, Ingrid Garzón<sup>1,2</sup>, Miguel Etayo-Escanilla<sup>1,2</sup>, Miguel-Ángel Martín-Piedra<sup>1,2</sup>, Antonio Campos<sup>1,2</sup>, Pascual Vicente Crespo<sup>1,2</sup>, María del Carmen Sánchez-Quevedo<sup>1,2</sup>, Ricardo Fernández-Valadés<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Department of Histology and Tissue Engineering Group, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> Division of Pediatric Surgery, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

**Introduction:** Smooth muscle tissue is a subvariety of muscle tissue responsible for involuntary contraction, allowing the transport and excretion of substances through different tubular systems such as blood vessels, glands, digestive, urinary and reproductive systems. Smooth muscle cells, or leiomyocytes, can associate to form large sheets that perform coordinated contractions. At the level of the human urethra, this structure facilitates urine excretion through the urethra and forms a specialized tissue layer called tunica albuginea. Reparation of damage affecting this tunica is complex. In most cases, surgical repair use different types of extra-urethral grafts, such as the oral mucosa, with the problems of morbidity in the donor area and risk of stenosis [1]. Tissue engineering has emerged as an alternative allowing the efficient generation of artificial substitutes with clinical potential.

**Methods:** Artificial tunica albuginea substitutes were generated by encapsulating human leiomyocytes in fibrin-agarose hydrogels following biofabrication protocols standardized by the research group [2]. Histoarchitecture and the expression of key molecules of the basal lamina and cytological markers of smooth muscle were evaluated by histological and immunohistochemical techniques during 14 days of development.

**Results:** Hematoxylin-eosin histological analysis of the albuginea substitutes revealed the initial presence of large-diameter rounded cells, with morphological changes being appreciated in later days, showing long, spindle-shaped leiomyocytes distributed throughout the hydrogel. In addition, these cells demonstrated the ability to pericellularly synthesize collagen type IV, the main component of the basal lamina, surrounding native leiomyocytes. Cells were positive for the cytologic markers smooth muscle actin and smoothelin, which are normally present in smooth muscle cells with contractile capacity.

**Conclusions:** These results demonstrate the possibility of combining leiomyocytes with fibrin-agarose hydrogels to generate a biological substitute of a tissue layer containing smooth muscle cells, such as the tunica albuginea. However, future studies should determine the contractile capacity of these structures.

**Acknowledgments:** Supported by the Spanish Plan *Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación*, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Instituto de Salud Carlos III, Grant FIS PI22/00059. Co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo regional ERDF-FEDER European Union through the “*Una manera de hacer Europa*” program.

[1] Faridi MS, et al. Tunica albuginea versus buccal mucosa graft urethroplasty for anterior urethral stricture: A prospective randomised pilot study. *Asian Journal of Urology*. 2023;10(2):189-194

[2] Alaminos M, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47(8):3311-3317

## FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF A TISSUE-ENGINEERED URETHRAL CONSTRUCT

David Sánchez-Porras<sup>1,2</sup>, Ingrid Garzón<sup>1,2</sup>, Miguel-Ángel Martín-Piedra<sup>1,2</sup>, Paula Ávila-Fernández<sup>1,2</sup>, Víctor Carriel<sup>1,2</sup>, Jose Manuel García<sup>1,2</sup>, María del Carmen Sánchez-Quevedo<sup>1,2</sup>, Ricardo Fernández-Valadés<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Department of Histology and Tissue Engineering Group, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. <sup>3</sup> Division of Pediatric Surgery, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain. <sup>4</sup> Department of Histology, Faculty of Dentistry, National University of Cordoba, Cordoba, Argentina.

**Introduction:** The urethra is a conduit that connects the bladder with external environment, allowing the transport of urine and semen. Histologically, the urethral lumen is covered by a mucosa tissue layer (MT) consisting of an urinary epithelium that can be transitional or stratified, and plays an important protective role, and a collagen-rich stromal tissue. The second layer of the urethra is the corpus spongiosum (CE), containing multiple blood vessels that prevent collapse of the lumen during erection, whereas the most external layer is the tunica albuginea (TA), mostly consisting of a smooth muscle tissue with contractile capacity. Trauma, congenital defects, tumors, scar defects and other pathologies can cause stenosis and/or loss of urethral function, with a consequent reduction in the quality of life of these patients [1]. Tissue engineering is a promising regeneration alternative able to overcome some of the drawbacks associated with current treatment of severe urethral conditions [2]. In the present work, we generated a complete urethral substitute by combining fibrin-derived hydrogels and native cells of each urethral layer (MT, CE, TA).

**Methods:** First, we generated a MT layer by using fibrin-agarose hydrogels with fibroblasts cultured within and urothelial cells subcultured on the surface to generate an epithelial substitute. Then, the CE substitute was fabricated with microvascular cells encapsulated in fibrin hydrogels. Finally, the TA layer was produced by mixing fibrin-agarose with cultured leiomyocytes. Each layer was maintained in culture for 14 days and evaluated in terms of viability and histological analyses were carried out using specific markers.

**Results:** The artificial substitutes of each urethral layer showed to be biocompatible, as cell viability was high in each tissue layer. Histological analyses revealed the active synthesis of proteoglycans and several cell markers of each tissue layer. At the morphological level, we found that the MT layer showed a stratified epithelium able to express several types of cytokeratins. CE displayed high percentages of CD34 positive cells while TA was highly positive for the cytoskeletal protein smooth muscle actin.

**Conclusions:** Tissue engineering demonstrated to be a promising tool to generate artificial substitutes of each urethral layer *ex vivo*. Our results showed proper maturation process of each type of tissue, with expression of specific features and markers of each urethral layer. However, *in vivo* experiments are needed to elucidate the regenerative potential of the substitutes generated in the present work.

**Acknowledgments:** Supported by the Spanish Plan *Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación*, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Instituto de Salud Carlos III, Grant FIS PI22/00059. Co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo regional ERDF-FEDER European Union through the “*Una manera de hacer Europa*” program.

[1] Pastorek D, et al. Tissue engineering of the urethra: from bench to bedside. *Biomedicines*. 2021;9(12):1917

[2] Chepelova N, et al. The search for an optimal tissue-engineered urethra model for clinical application based on preclinical trials in male animals: A systematic review and meta-analysis. *Bioeng Transl Med*. 2024 Jul 23;9(6):e10700

## TORSIONAL WAVE ELASTOGRAPHY AS A DIAGNOSTIC TOOL FOR SKIN CANCER: AN ACCURACY ASSESSMENT

Hirad Shamimi<sup>1,2,4</sup>, Jose Luis Martin Rodriguez<sup>6</sup>, Inas. H. Faris<sup>1,2,4</sup>, Jose Manuel Cortes<sup>1,2,4</sup>, Aurelio Martin Castro<sup>6</sup>, Ricardo Ruiz-Villaverde<sup>5,6</sup>, Husein Husein-El Ahmed<sup>6</sup>, Guillermo Rus<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Ultrasonics Lab UGR-TEP959. <sup>2</sup> Biomechanics Group IBS-TEC12. <sup>3</sup> MNat Scientific Unit of Excellence UGR. <sup>4</sup> Dpt. Structural Mechanics, University of Granada. <sup>5</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria, Granada, Spain. <sup>6</sup> Hospital Universitario Clínico San Cecilio, Granada, Spain

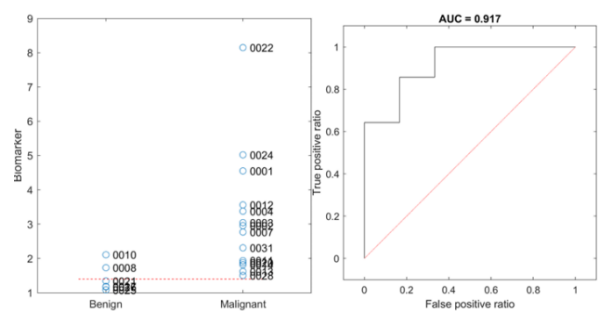
**Introduction:** A novel elastography method, known as Torsional Wave Elastography (TWE), is introduced and investigated for non-invasive diagnosis of skin cancer and characterization of the mechanical properties of the skin. This technique incorporates three biomarkers viscosity, anisotropy, and elasticity to facilitate the diagnosis of skin-related diseases. A Torsional Wave Elastography (TWE) device has been developed with the objective of characterizing the mechanical properties of the skin. Capable of generating and receiving shear elastic waves within the frequency range of 0.2 to 2 kHz. This device has been subjected to pilot testing on individuals exhibiting skin lesions suspected to potentially signify various types of skin cancers. The results obtained are then validated against histopathology, considered the gold standard in evaluating the robustness of this technique for the diagnosis of skin cancer.

**Materials and Methods:** A novel Torsional Wave Elastography (TWE) device designed for diagnosing skin cancer is developed, drawing inspiration from a previously fabricated TWE device used for assessing the mechanical properties of the cervix [1]. This hand-held device comprises an emitter generating shear elastic waves and a sensor capable of receiving waves in the frequency range of 50 Hz to 20 kHz. The study involved 31 patients with skin lesions suspected of malignancy, and their participation was subject to inclusion/exclusion criteria, approval from the ethics committee and obtaining informed consent. Out of 31 patients, only 20 patients without the history of any pre-surgical therapy and recurrence of the cancer were selected for the tests.

In the initial phase, the assessment of the affected tissue's stiffness involved measuring the velocity of shear waves within frequencies ranging from 0.4 to 1 kHz. Subsequently, for a comparative analysis with healthy tissue, tests were conducted on the healthy tissue located on the symmetrical side of the body or in the region adjacent to the suspected pathology. The obtained results were subsequently compared to the histopathology examination performed on the same lesion following the surgical excision.

**Results:** The results obtained from both the pathological tissue and the healthy tissue were assessed. The classification of the lesion as benign or malignant was determined based on the changes in the velocity of the shear wave in the pathological tissue compared to the healthy tissue.

**Discussion:** This novel method was applied to individuals with different types of skin cancer, demonstrating alterations in the shear wave velocity of the skin when diseased tissue was present. Moreover, this method possesses a distinctive advantage in that it can characterize the behavior of soft tissue when subjected to various frequencies within a single measurement.



[1]. Callejas et al, "Kelvin–Voigt Parameters Reconstruction of Cervical Tissue-Mimicking Phantoms Using Torsional Wave Elastography", *Sensors*, vol. 19, 3281, 2018.

## EARLY DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER THROUGH MIRNA BIOMARKER ANALYSIS

Bahareh Soleimanpour<sup>a-d</sup>; Mavys Tabraue Chavez<sup>a</sup>; Juan Jose Guardia Monteagudo<sup>a</sup>; Barbara Lopez Longarela<sup>a</sup>; Francisco Javier Lopez Delgado<sup>a-c</sup>; Rosario Maria Sanchez-Martin<sup>b-d</sup>; Juan J. Diaz-Mochon<sup>b-d</sup>; Salvatore Pernagallo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> DESTINA Genomica S.L. Parque Tecnológico Ciencias de la Salud (PTS), Avenida de la Innovación 1, Edificio BIC, 18016, Granada, Spain <sup>b</sup> NanoChemBio Group. Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Unidad de Excelencia de Química Aplicada a Biomedicina y Medioambiente, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Campus Cartuja, Granada 18071, Spain <sup>c</sup> GENYO Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government. PTS Granada, Avenida de la Ilustración, 114, Granada 18016, Spain <sup>d</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain.

Colorectal cancer (CRC) is a significant global health problem where early detection is critical for successful treatment outcomes<sup>1</sup>. Recent research has highlighted the potential of circulating cell-free RNAs (ccfRNAs), particularly microRNAs (miRNAs), as promising non invasive biomarkers found in body fluids, useful for the diagnosis of CRC<sup>2</sup>. However, their clinical application is being delayed by the lack of accurate and efficient detection methods. Current techniques, such as RT-qPCR, are often complex, time-consuming and likely to be imprecise, limiting the full diagnostic potential of miRNAs<sup>3</sup>. To address these challenges, our team has developed Dynamic Chemical Labelling (DCL) technology to directly detect and quantify miRNAs in body fluids<sup>4</sup>. DCL uses a dynamic chemical reaction involving novel biotin-labelled SMART bases and modified abasic peptide nucleic acid (PNA) capture probes (DGL probes). When hybridised to target miRNA sequences, the biotinylated SMART base forms a covalent bond with the backbone of the DGL probe, creating a stable chemical 'lock-up'. This complex is then detected using a reporter molecule that binds to the biotin tag, providing highly sensitive and specific readouts<sup>5</sup>. DCL offers significant advantages over traditional methods, such as improved sensitivity, accuracy and speed, while eliminating the need for miRNA extraction, transcription and amplification<sup>6</sup>. In this study, DCL was integrated with Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup> technology to develop PCR-free tools for the assessment of novel miRNA biomarkers in CRC<sup>7</sup>.

### Keywords

Colorectal Cancer (CRC); MicroRNA (miRNA); Dynamic Chemical Labeling (DCL); Liquid Biopsy; PCR-Free Detection; Bead-Based Platforms; Cancer Diagnostics.

### Acknowledgments

This project has received funding from the European Union's Horizon Europe research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie Doctoral Network with Grant Agreement ID: 101072448. Bahareh Soleimanpour is a PhD student in the Biomedicine program at the University of Granada.

<sup>1</sup> Letter To and T H E Editor, 'World Journal of Gastroenterology', 30.20 (2024), 2726–30.

<sup>2</sup> Kyriacos Felekis and Christos Papanephytous, 'International Journal of Molecular Sciences', 2024, 25, 3403.

<sup>3</sup> Vivek Priy Dave et.al, 'Laboratory Investigation', Volume 99, Issue 4, April 2019, Pages 452-469 .

<sup>4</sup> Carmen Martín-sierra et.al, Biosensors and Bioelectronics 230 (2023) 115268.

<sup>5</sup> Antonio Marín-romero, Juan José Díaz-mochón, and Salvatore Pernagallo, Sensors & Diagnostics, 2022, 1243–51.

<sup>6</sup> Antonio Marín-romero et.al, Talanta, 2020, 121265.

<sup>7</sup> Antonio Marín-romero and Salvatore Pernagallo, Analytical Methods, 2023, 6139–49.

## INNOVATIVE METHOD BASED ON PANCREATIC PROENZYMES TO DISRUPT TUMOR SUPPORT FROM CANCER-ASSOCIATED FIBROBLASTS IN THE MICROENVIRONMENT OF PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA

Belén Toledo<sup>1,2</sup>, Juan Antonio Marchal<sup>3,4,5\*</sup> and Macarena Perán<sup>1,3,5\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Health Sciences, University of Jaén, Jaén E-23071, Spain. <sup>2</sup> Department of Medical Oncology, Cancer Center Amsterdam, Amsterdam UMC, VU. University Medical Center (VUmc), Amsterdam, The Netherlands. <sup>3</sup> Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Centre for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada E-18100, Spain. <sup>4</sup> Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada. E-18016, Spain. <sup>5</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA), University of Granada, Granada E-18071, Spain.

Cancer continues to be one of the leading causes of death despite recent advances in treatment. Tumor formation and progression are influenced by two key factors: genetic/ epigenetic changes in tumor cells and the reorganization of the components of the tumor microenvironment (TME), which mainly consists of immune cells, mesenchymal stem cells (MSCs), and cancer-associated fibroblasts (CAFs). CAFs are the primary cell type found in the TME and play a crucial role in the structure of the extracellular matrix (ECM), tumor metabolism, immunity with an impact on adaptive chemoresistance, and the promotion of tumor cell motility. Studies have shown that the CAF population contains different subtypes based on the expression of marker proteins, with the ability to either promote or inhibit cancer. Thus, although CAFs have been extensively shown to promote tumor growth, survival, and dissemination through improved functionality and an altered secretome, they can also delay tumorigenesis during the early stages through largely unknown mechanisms. CAFs have therefore evolved from being considered mere physical support to key players in all stages of tumorigenesis, from tumor initiation to the final step of inducing the pre-metastatic niche. Here, we specifically focus on key questions regarding how fibroblasts acquire a CAF phenotype, their heterogeneity and plasticity, their multiple origins, the functional diversity that contributes (or not) to disease progression, and the therapeutic challenges encountered in eliminating and reducing CAFs, or at least reversing their deleterious phenotype.

We evaluated a formulation based on pancreatic proenzymes (Trypsinogen and Chymotrypsinogen A) called PRP in a model of PDAC-CAFs dynamics. Our findings demonstrated the multifaceted effects of PRP, including: (i) inhibition of the acquisition of a pro-tumoral phenotype by healthy fibroblasts; (ii) enhanced expression of E-cadherin and decreased expression of genes associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT); (iii) blockade of the crosstalk between CAFs and cancer cells, resulting in a reduction in the proliferation and migration rate of pancreatic cancer cells; (iv) modulation of the alterations induced by CAFs in endothelial cells; (v) induction of Meflin expression, linked to a less pro-tumoral phenotype; (vi) inhibition of the TGF- $\beta$  pathway, reducing the activation of Smad2/3 proteins involved in fibroblast malignification; (vii) selective induction of apoptosis in CAFs by PRP, as evidenced by increased expression of the BAX biomarker; (viii) impaired formation of fibrotic tissue, as tested in an *in vivo* model of PDAC, by reducing the population of CAFs within the TME and lowering tumor growth.

Collectively, these results underscore the potential of PRP as a therapeutic candidate for disrupting the intricate interactions within the PDAC-TME. Further research and clinical investigations are necessary to validate the translational potential of PRP as an adjuvant therapy for PDAC.

## CAN A SIMPLE TEST SUCH AS HANDHELD DYNAMOMETRY BE ASSOCIATED WITH TEMPORAL SUMMATION OF PAIN IN CHRONIC PRIMARY LOW BACK PAIN? THE HEALTHYBACK PROJECT

Tsjarleston G<sup>1,2,3</sup>, Pavón-Muñoz R<sup>3</sup>, López-Fernández MD<sup>1,2,4</sup>, Aguilera-García I<sup>4</sup>, Segura-Jiménez V<sup>1,2,5,6</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, <sup>2</sup>UGC Medicina Física y Rehabilitación, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, <sup>3</sup>Physical Activity and Health Promotion (PA-HELP) research group, Department of Physical Education and Sports, Faculty of Sport Sciences, University of Granada, <sup>4</sup>Faculty of Health Sciences, University of Granada, <sup>5</sup>GALENO research group, Department of Physical Education, Faculty of Education Sciences, University of Cádiz, <sup>6</sup>Instituto de Investigación e Innovación Biomédica de Cádiz (INIBICA).

**Background:** Temporal summation of pain (TSP) reflects the amplification of pain signals by the central nervous system when repeated stimuli are applied. The aim of this study was to explore the associations of upper-body muscle strength with TSP in individuals with chronic primary low back pain (CPLBP).

**Methods:** A total of 71 individuals (40 women) aged  $51.5 \pm 10.6$  participated in this cross-sectional study. Upper-body muscle strength was measured bilaterally with a handgrip dynamometer (TKK 5101). Pain intensity was measured bilaterally on the lower back and tibialis anterior muscles with a manual standard pressure algometer (FPK 20). Baseline pain intensity was measured by applying a single stimulus for 1 second. Subsequently, 10 repeated stimuli were applied at the same regions with 1-second intervals, and patients reported the pain intensity for each stimulus on a Visual Analogue Scale. The mean pain intensity across the 10 repeated stimuli (average pain rating across repeated stimuli, APRARS) was calculated. The TSP was determined by subtracting the baseline pain intensity from APRARS. Linear regression analysis was used to study the association between upper-body muscle strength, APRARS and TSP. Age, use of medications for pain, anxiety and depression, education level, relative body fat, baseline pain, and pain after the handgrip test were included as covariates using a 'stepwise' method.

**Results:** Greater upper-body muscle strength was associated with lower APRARS ( $b = -0.11$ ; 95% confidence interval (CI)  $-0.15, -0.07$ ;  $\beta = -0.48$   $p < 0.001$ ) and TSP ( $b = -0.04$ ; 95% CI  $-0.08, -0.007$ ;  $\beta = -0.28$   $p = 0.019$ ) in the tibialis anterior. The associations between upper-body muscle strength and the APRARS ( $b = -0.04$ ; 95% CI  $-0.09, 0.003$ ;  $\beta = -0.19$   $p = 0.069$ ) and TSP ( $b = -0.03$ ; 95% CI  $-0.065, 0.001$ ;  $\beta = -0.23$   $p = 0.054$ ) in the lower back were borderline.

**Conclusion:** The findings showed that greater upper-body muscle strength is associated with lower APRARS and TSP in the anterior tibialis muscles in individuals with CPLBP, but not in the lower back. Whether improving upper-body muscle strength may help the nervous system diminish pain in this population, warrants further experimental research.

**Acknowledgement:** Participants are deeply acknowledged for their collaboration. This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (CP20/00178, PI22/01791) co-funded by European Social Fund. GT was supported by the Instituto de Salud Carlos III through the PFIS contract (FI23/00034) co-funded by the European Social Fund+.

## PREDICCIÓN DEL COLOR DE MATERIALES CAD-CAM DE ESPESORES VARIABLES SOBRE SUSTRATOS DE DIFERENTES COLORES

Rafa Vázquez-Conejo<sup>1,2</sup>, Maria Tejada-Casado<sup>1,2</sup>, Bruno Arruda Mascaro<sup>3</sup>, Renata Garcia Fonseca<sup>3</sup>, José Maurício dos Santos Nunes Reis<sup>3</sup>, María M. Pérez<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Óptica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva, s/n 18071 Granada, España. [rafaconejo@ugr.es](mailto:rafaconejo@ugr.es); [mariatejadac@ugr.es](mailto:mariatejadac@ugr.es); [mmperez@ugr.es](mailto:mmperez@ugr.es); <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain; <sup>3</sup> Departamento de Materiales Dentales y Prosthodoncia, Universidad Estatal de São Paulo (UNESP), Facultad de Odontología, Araraquara, 14801-903, São Paulo, Brasil. [bruno.arruda-mascaro@unesp.br](mailto:bruno.arruda-mascaro@unesp.br); [jm.reis@unesp.br](mailto:jm.reis@unesp.br); [renata.fonseca@unesp.br](mailto:renata.fonseca@unesp.br)

**Objetivo:** Desarrollar un modelo predictivo del comportamiento del color de materiales CAD-CAM de alta translucidez superpuestos sobre sustratos de diferente color, utilizando algoritmos de inteligencia artificial.

**Material y Métodos:** Se prepararon discos de color A2 de 7,5 mm de diámetro en tres espesores: 0,5; 1,0 y 1,5 ± 0,05 mm (n=3/grupo), de dos materiales CAD-CAM de alta translucidez: Lava Ultimate (LU) y VITA Enamic (VE), así como discos de nueve sustratos de resina coloreados (ND1-ND9, IPS Natural Die Material, Ivoclar Vivadent). La reflectancia espectral de todas las muestras, sobre fondos blanco y negro estándar y sobre cada uno de los 9 sustratos fue medida utilizando un espectrorradiómetro PR-670, en el rango de 380–780 nm usando geometría iluminación/medida CIE 45°/0°. Los valores de reflectancia espectral se convirtieron en coordenadas de color CIE-L\*a\*b\* utilizando el Observador Estándar de 2° y el Iluminante Estándar D65. Se construyó un algoritmo de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) utilizando dos enfoques: uno donde los datos se separaron por material y otro donde se subdividen los datos por material y espesor, utilizando para las divisiones en conjuntos de entrenamiento y test un procedimiento de validación cruzada (leaving-one-out). Por último, se calcularon las diferencias de color  $\Delta E_{00}$  entre los valores medidos y estimados y se evaluó el rendimiento de los algoritmos de acuerdo con los correspondientes umbrales de aceptabilidad y perceptibilidad 50:50% (AT<sub>00</sub> y PT<sub>00</sub>).

**Resultados:** En el primer enfoque, donde los datos se separaron por material, los modelos lograron diferencias de color medias  $\Delta E_{00}$  de 1,01 para LU y 1,10 para VE, respectivamente. En el segundo enfoque, que subdividió aún más los datos por material y espesor, los valores de  $\Delta E_{00}$  para LU fueron de 0,68, 0,51 y 0,33, mientras que para VE fueron de 1,00, 0,37 y 0,38 para los espesores de 0,5 mm, 1,0 mm y 1,5 mm, respectivamente.

**Conclusiones:** Los modelos predictivos desarrollados en este estudio lograron diferencias de color medias por debajo del umbral de aceptabilidad en todos los casos. Además, en el segundo enfoque, los modelos arrojaron valores de  $\Delta E_{00}$  por debajo del umbral de perceptibilidad, demostrando el potencial de estas metodologías para una predicción precisa y clínicamente relevante del color en materiales restauradores CAD-CAM, al ser utilizados sobre sustratos de diferente color.

## UNA NOVEDOSA APROXIMACIÓN PARA EVALUAR LA INMUNIDAD CELULAR MEDIADA POR CÉLULAS T USANDO VESÍCULAS EXTRACELULARES

Fabián Vergara Rubio<sup>2,3</sup>, Bernardino Alcázar Navarrete<sup>2,4</sup>, Francisco Gabriel Ortega Sánchez<sup>2,4</sup>, Laura Rosa Fernández Castro<sup>2,3</sup>, Marta García Cerezo<sup>2,3</sup>, Teresa Valero Griñán<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Química Medicinal y Orgánica y Unidad de Investigación de Excelencia de “Química aplicada a la Biomedicina y al Medio Ambiente”, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, España; <sup>2</sup> GENYO, Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Pfizer/Universidad de Granada/Junta de Andalucía, PTS Granada, Avda. Ilustración 114, 18016 Granada, España; <sup>3</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA), Granada, España; <sup>4</sup> Unidad de Neumología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España.

La inmunidad celular mediada por células T juega un papel fundamental en procesos infecciosos, autoinmunes, oncológicos y degenerativos (1). Sin embargo, a menudo, no se analiza en la clínica, debido a que los métodos convencionales (*ELISPOT*, *FLUOROSPOT* o *kits* de citometría de flujo) son complejos, requiriendo muestras frescas, cultivo celular, equipamiento y personal especializados (2). El objetivo de este trabajo de investigación es evaluar esta inmunidad aprovechando la unión específica de un péptido antigénico a su receptor de células T, para el aislamiento selectivo de vesículas extracelulares (en inglés *EVs*) derivadas de estas células T con memoria a dicho antígeno. Se evaluarán respuestas celulares específicas a la infección o vacunación por *SARS-CoV-2*.

Se recogieron muestras de plasma de tres cohortes distintas: (i) *cohorte 1*: 5 muestras de donantes obtenidas en 2019; (ii) *cohorte 2*: 5 donantes recuperados de *COVID-19* (menos de un mes después de la recuperación); (iii) *cohorte 3*: 5 donantes vacunados contra dicha enfermedad. Esferas poliméricas magnéticas se funcionalizaron con un *pool* de péptidos de la subunidad 2 de la proteína *spike* del *SARS-CoV-2* (3). Se aislaron *EVs* a partir del plasma y, para su captura, se incubaron con las *beads* funcionalizadas. La unión específica de las *EVs* al péptido antigénico se confirmó por *TEM*, siendo cuantificadas por un método colorimétrico *ELISA*, con *CD81* como la proteína que se cuantificó (4). Por último, se compararon los resultados de las tres cohortes.

Se demostró una funcionalización exitosa de las *beads* magnéticas, con unión específica de las *EVs* a aquellas previamente funcionalizadas con respecto a los controles, lo que se confirmó por *SEM*. La cuantificación de las *EVs* capturadas fue significativamente mayor en las muestras de pacientes que habían estado en contacto con el virus que en aquellas obtenidas en 2019 antes de la aparición de éste.

Este innovador enfoque de evaluación inmunológica mejoraría la velocidad, eficacia y versatilidad en comparación con los métodos convencionales, convirtiéndose en una herramienta valiosa para investigar respuestas inmunitarias específicas en contextos clínicos variados.

1. Moss P. *The T cell immune response against SARS-CoV-2*. *Nat Immunol*, 2022, 23(2): 186-93;
2. Plebanski M, Katsara M, Sheng KC, Xiang SD, Apostolopoulos V. *Methods to measure T-cell responses*. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(6):595-600;
3. Zuo J, Dowell AC, Pearce H, Verma K, Long HM, Begum J, et al. *Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection*. *Nat Immunol*, 2021, 22(5):620-6;
4. Ricklefs FL, Maire CL, Reimer R, Dührsen L, Kolbe K, Holz M, et al. *Imaging flow cytometry facilitates multiparametric characterization of extracellular vesicles in malignant brain tumours*. *J Extracell vesicles*, 2019, 8(1):1588555.



Este programa y libro de Abstracts del V Simposio de Terapias Avanzadas y Tecnologías Biomédicas del  
ibs.GRANADA, se encuentra en la siguiente dirección: <https://doi.org/10.5281/zenodo.14514308>