

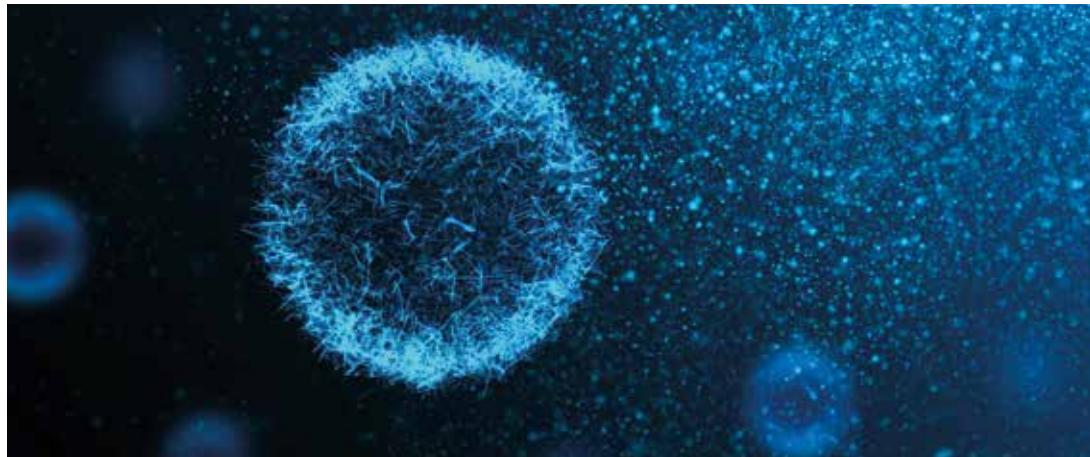
INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA MATERIA

El principal objetivo de la Fundación Ramón Areces consiste en el fomento de la investigación científica, particularmente en aquellas áreas que presentan un especial interés por su inmediata repercusión en la salud y en el bienestar de nuestra sociedad. En este sentido, la Fundación Ramón Areces convoca cada dos años a la comunidad científica española a presentar proyectos de especial relevancia en determinadas áreas científicas que requieren una atención especial por su posible repercusión en el progreso de nuestro país y en la mejora de la salud.

Esta Memoria recoge los proyectos correspondientes a las dos últimas convocatorias (XVII y XVIII) de Ayudas a la Investigación Científica y Técnica. En el ámbito de la biomedicina, se han propuesto temas de enorme actualidad, unos relacionados con la investigación básica y otros directamente relacionados con la investigación traslacional clínica. Entre estos últimos destaca el de las “**Enfermedades raras**” que, aunque denominadas así por su escasa prevalencia, tienen una extraordinaria importancia, puesto que en su conjunto representan un grupo de enfermedades de carácter grave, que afectan a los recién nacidos y que, en muchos casos, carecen de tratamiento. Los proyectos pre-

sentados en esta sección abarcan desde el estudio de la etiología molecular de estas enfermedades hasta el diseño de nuevos tratamientos. Es necesario destacar que la Fundación Ramón Areces tiene un especial interés en el estudio de este tipo de enfermedades, dado el dolor humano que representa el padecimiento de cualquiera de estas dolencias.

Asimismo, las enfermedades frecuentes, sobre todo aquellas de alto impacto en nuestra sociedad, tales como el **cáncer** y las **enfermedades neurodegenerativas**, han sido también objeto de estos concursos. En este sentido, se han propuesto los temas de “Inmunoterapia y cáncer” y “Medicina de precisión y cáncer”, dado que están desarrollándose nuevos métodos para vencer esta enfermedad mediante inmunoterapia dirigida o a través de la medicina personalizada. Las enfermedades neurodegenerativas se han abordado en los temas de “Reprogramación tisular y organoides”, como nuevas aproximaciones terapéuticas en las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. A modo de ejemplo, algunos de los proyectos vigentes tratan de reprogramar las células progenitoras neurales, con objeto de reparar el tejido nervioso dañado por las enfermedades neurodegenerativas.



En otras áreas de la **biomedicina**, la investigación básica de carácter traslacional está representada en los mencionados concursos bajo el tema “Interactoma: implicaciones patológicas”. El concepto de interactoma engloba todos aquellos mecanismos de interacción que regulan el comportamiento de nuestras células, lo que permite una visión holística de las funciones celulares.

La seguridad alimentaria es uno de los principales problemas con los que se enfrenta nuestra sociedad actual, cada vez más obligada a consumir alimentos preelaborados. Por esta razón, la Fundación Ramón Areces ha propuesto, en los últimos cuatro concursos de Ayudas, el tema “Seguridad alimentaria y biotecnología”. De hecho, la seguridad alimentaria es un problema que preocupa profundamente, pues a pesar de los controles exhaustivos que se llevan a cabo de forma consuetudinaria, con frecuencia aparecen brotes inesperados de toxicidad alimentaria que alarman a la sociedad y provocan graves problemas económicos. Estos problemas son especialmente relevantes en España, dado que nuestro país posee una de las industrias

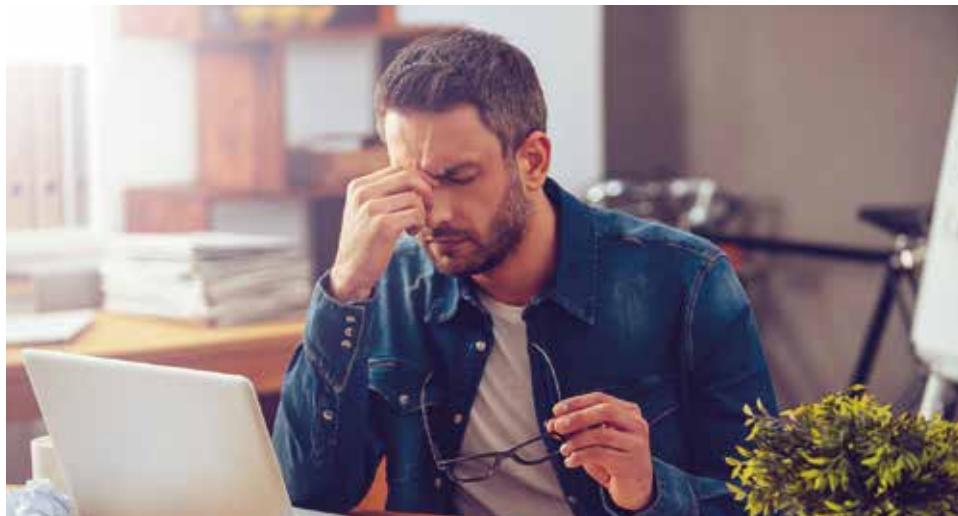
alimentarias más importantes de Europa. Por esta razón, la Fundación Ramón Areces tiene interés en el desarrollo de métodos que permitan la rápida identificación de los problemas, así como su solución inmediata. En este sentido, la biotecnología ha revolucionado esta materia al permitir la detección precoz de agentes contaminantes, incluso antes de que alcancen concentraciones tóxicas.

En los temas dedicados a las **ciencias de la materia** destacan aquellos relacionados con el desarrollo sostenible, tales como “Energía renovable: materiales y procesos”, “Materiales superconductores de alta temperatura” y “Grafeno, átomos, clusters y nanopartículas metálicas. Fundamento y aplicaciones”. Estas materias están relacionadas entre sí, pues la primera trata de buscar métodos para la obtención de energía no contaminante y las dos restantes la utilización eficiente de la misma. En este sentido, destacan los proyectos relacionados con nuevos agentes catalíticos, nuevos sistemas de captación de CO₂, fotosíntesis artificial, etc. Por otro lado, el grafeno constituye una de las áreas más importantes del desarrollo de la química actual.

XVII CONCURSO NACIONAL

De 7 de abril de 2015 a 7 de abril de 2018

1. ENFERMEDADES RARAS



Rastreo del daño tisular y de la respuesta adaptativa en las hemocromatosis hereditarias raras para la identificación de dianas terapéuticas específicas

Investigador Principal: José Manuel Bautista Santa Cruz

Centro de Investigación: Instituto de Investigación: Hospital 12 de Octubre. Madrid.



La hemocromatosis hereditaria (HH) es un trastorno en el que se desregula el metabolismo del hierro. Una consecuencia principal es una mayor oxidación molecular por el incremento de especies reactivas de oxígeno que alteran la homeostasis celular y la adaptación de la respuesta metabólica. Los objetivos del presente proyecto han sido la identificación y caracterización de biomarcadores y mecanismos moleculares inducidos por estrés oxidativo y/o hierro por la sobrecarga de este metal en diferentes tejidos y que definen el daño tisular específico en HH raras. Para ello, se ha recurrido a modelos animales portadores de polimorfismos equivalentes a los que generan HH raras para estudiar la fisiopatología de la enfermedad mediante aproximaciones de rastreo global de inmunómica, de proteómica redox, de respuesta inmunológica y de respuesta a estrés oxidativo. Los resultados más significativos incluyen: (1) Identificación de los parámetros tisulares (bazo, hígado, duodeno, páncreas, corazón y cerebro) y hematológicos causados por la deposición de hierro en modelos murinos, observándose un aumento de los reticulocitos en hembras HH en sangre periférica. (2) Tipificación de las alteraciones de la respuesta inmune en modelos de ratón, demostrando que las hembras HH poseen déficit de células dendríticas esplénicas y maduración acelerada de linfocitos B. (3) Análisis de expresión de citoquinas y enzimas que modulan el estrés oxidativo en órganos diana demostrando cambios significativos relativos al daño oxidativo y alteraciones de respuesta proinflamatoria celular. (4) Identificación del daño tisular molecular en ratones HH mediante proteómica.

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

6

Comunicaciones en congresos nacionales

mica redox a lo largo del crecimiento, indicativo de una acumulación oxidativa en tejidos sensibles, que progresan con la edad, y con dianas proteicas específicas modificadas oxidativamente en HH. (5) Identificación de cinco dianas oxidativas específicas del daño en eritrocitos humanos de pacientes HH. (6) Selección de biomarcadores para el seguimiento del progreso, del daño tisular y de la terapéutica de HH.

Respuesta celular a roturas de ADN bloqueadas y su papel en la patogénesis de la Ataxia Telangiectasia

Investigador Principal: Felipe Cortés Ledesma

Centro de Investigación: Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Sevilla.



La Ataxia-Telangiectasia (A-T) está causada por mutaciones en el gen ATM y constituye un paradigma para una serie de síndromes genéticos humanos ligados a defectos en la señalización y reparación de roturas en el ADN. La sintomatología de la A-T incluye ataxia cerebelar progresiva, inmunodeficiencia, radiosensibilidad y una mayor incidencia de cáncer. El papel de ATM como el regulador maestro de la respuesta celular a roturas en el ADN está muy bien definido y caracterizado con bastante detalle. Sin embargo, su impacto en el proceso de reparación en sí ha estado tradicionalmente sujeto a un alto grado de controversia.

Nuestro laboratorio ha demostrado que ATM sí juega un papel fundamental en la reparación de roturas en el ADN, pero sólo cuando estas contienen extremos bloqueados. Además, esta ruta dependiente de ATM contribuye a la supervivencia celular y el mantenimiento de la estabilidad genómica, lo que sugiere que las roturas de ADN bloqueadas pueden ser un factor importante en la patogénesis de la enfermedad. Para determinar la función específica de ATM en la reparación de roturas de ADN bloqueadas e identificar otros factores que puedan estar implicados en el proceso, hemos realizado un escrutinio genético mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Hemos encontrado que la función de una serie de nucleasas de ADN se hace particularmente relevante para la viabilidad celular cuando se inducen de forma específica roturas de ADN bloqueadas. Hemos caracterizado en detalle el papel de estas nucleasas en el proceso de reparación en sí, así como su relación funcional entre ellas y con ATM. Nuestras conclusiones apuntan a un modelo en el que ATM facilita, de forma general, el acceso de diversos factores nucleolíticos que pueden procesar los extremos de la rotura de forma redundante.

Caracterización de MORC2, nexo de unión de neuropatías hereditarias sensitivo-motoras

Investigadora Principal: Carmen Espinós Armero

Centro de Investigación: Centro de Investigación Príncipe Felipe. Valencia.



Tras la identificación en nuestro laboratorio de mutaciones en el gen MORC2 en 3 familias afectadas por CMT2 (Sevilla, Lupo et al. Brain, 2016) se han descrito un total de 33 familias y se conocen 10 mutaciones clínicas, creando así un nuevo subtipo de CMT2: CMT2Z. De entre todas las mutaciones, la más frecuente es p.R252W, identificada en

17 familias. Por otro lado, la gravedad clínica es dispar y presenta unos rasgos fenotípicos distintos que se asocian a cada tipo de mutación.

Desde el principio del presente proyecto se ha estado investigando en profundidad la función de la proteína en nervio periférico. De este modo, se ha estudiado el patrón de expresión de MORC2 en sistema nervioso central y periférico murino, se ha establecido la isoforma predominante de MORC2 en sistema nervioso periférico humano y se han realizado estudios bioquímicos para dilucidar la afectación proteica causada por las mutaciones clínicas más frecuentes. Asimismo, por primera vez se ha llegado a relacionar la expresión de una de las mutaciones de MORC2 (p.S87L) con el aumento de inflamación axonal en cultivos de neuronas sensoriales de rata.

Producción Científica

2

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

6

Comunicaciones en congresos nacionales

4

Comunicaciones en congresos internacionales

Durante este último año y en colaboración con grupos de Rep. Checa, Suecia y Australia, hemos incorporado los datos ómicos de expresión génica de fibroblastos derivados de biopsias de piel de pacientes portadores de mutaciones en MORC2 y de neuronas sensitivas de rata humanizadas con dichas mutaciones. Los hallazgos que se derivan de esta investigación, reflejan ciertos grupos de genes cuya expresión está desregulada, pudiendo producir cambios patológicos o mecanismos compensatorios en los pacientes con mutaciones en MORC2. Así, utilizando todo el conjunto de datos obtenidos en los últimos años, hemos elaborado un manuscrito describiendo posibles vías alteradas en la fisiopatología de CMT2Z.

Terapia molecular para Laminopatías

Investigadora Principal: Ana María González García

Centro de Investigación: Centro Nacional de Biotecnología (CNB). CSIC. Madrid.



El síndrome de envejecimiento prematuro de Hutchinson-Gilford (HGPS o progeria) es una enfermedad que se presenta con baja frecuencia, pero cuyas consecuencias son devastadoras, con un alto índice de mortalidad en las primeras décadas de la vida. La progeria se debe a la aparición de ciertas mutaciones bien en el gen de LMNA (lamina A) que impiden el correcto procesamiento y maduración de la proteína o bien en la proteasa encargada de dicho procesamiento. Asimismo, mutaciones en proteínas asociadas a la lamina nuclear como BANF-1 también dan lugar a síndromes progeroides. Las células de los pacientes de progeria presentan alteraciones en la morfología del núcleo, incluyendo la aparición de núcleos más grandes y lobulados, la desorganización de los poros nucleares y la cromatina y el engrosamiento de la lamina nuclear. También aparecen alteraciones epigenéticas en las modificaciones presentes en la histonas y en la metilación del ADN y en general se observa una modificación de los patrones transcripcionales de estas células con respecto a células sanas. Todos estos defectos podrían contribuir a la fisiopatología de esta enfermedad. Las fosfatidilinositol-3-quinasas son quinasas lipídicas que fosforilan el anillo de inositol de los fosfoinosítidos de membrana. Estas enzimas son dímeros constituidos por una subunidad catalítica ($p110\alpha$, β o δ) y una subunidad reguladora ($p85\alpha$, $p85\beta$, o la isoforma específica de músculo $p55\gamma$). PI3K cataliza la formación de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) que estimula la activación de moléculas como Akt y m-TOR que participan en la división celular, la supervivencia y la migración. Nuestros estudios sugieren que $p110\beta$ participa en la regulación de la morfología y estructura nuclear de la célula. Hemos observado que $p110\beta$ se une a la lamina A y es necesaria para el correcto procesamiento y localización de esta proteína. Actualmente estamos examinando cuál de los pasos de la maduración de la lamina es regulado por $p110\beta$. También hemos observado que $p110\beta$ regula BANF-1, queremos determinar cómo esta regulación afecta a la replicación del DNA y a la formación de membrana nuclear en la célula tras la salida de mitosis.

Nuevos mecanismos de regulación de la respuesta inmune por lámina A/C y progerina: implicaciones en el síndrome de envejecimiento prematuro de Hutchinson-Gilford

Investigador Principal: José María González-Granado

Centro de Investigación: Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Madrid.



El síndrome de Hutchinson Gilford (HGPS) se caracteriza por un envejecimiento acelerado que provoca la muerte a una edad aproximada de 13 años sin que se conozca cura o tratamiento efectivo frente a sus devastadores síntomas.

Esta enfermedad rara (código OMIM 176670) afecta a 1 de cada 4-8 millones de niños y está causada por la acumulación del mutante de lamina A, progerina, mutante que también se acumula de forma fisiológica en individuos sanos durante el envejecimiento. La comprensión del papel de lamina A/C y los cambios moleculares y celulares asociados a la acumulación de progerina no solo es esencial para establecer los orígenes de la enfermedad sino también para

Producción Científica

2

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

5

Artículos generados en revistas

5

Comunicaciones en congresos nacionales

3

Comunicaciones en congresos internacionales

explicar algunas de las causas del envejecimiento natural.

Anteriormente, hemos publicado que la lamina A/C se sintetiza en linfocitos T tras el reconocimiento de un antígeno para potenciar la activación del linfocito. Sin embargo, se desconoce el efecto de la progerina en la activación de la célula T y el papel de la lamina A/C y la progerina en otras respuestas inflamatorias. Conocer estos efectos, son dos de los objetivos de este proyecto.

Adicionalmente, se pretende conocer el efecto de los tratamientos empleados o que se suponen como potencialmente interesantes para tratar los pacientes de HGPS en el sistema inmune de los pacientes. Nuestros resultados muestran que la lamina A/C favorece la diferenciación del linfocito T CD4+ a fenotipo Th1 en respuesta a virus y protozoos, efecto modulador del que parece carecer la progerina.

Además, los tratamientos empleados para tratar a los pacientes de HGPS no revierten el efecto diferencial sobre la diferenciación del linfocito T que existe entre la lamina A/C y la progerina. Con la consecución de los objetivos propuestos se pretende mejorar la vida de los pacientes de HGPS y entender el papel de la lamina A/C y la progerina en enfermedades inmunes donde estas proteínas pudieran tener un papel relevante.

Modelos para distrofias musculares congénitas: búsqueda de supresores fenotípicos

Investigador Principal: Enrique Martín Blanco

Centro de Investigación: Institut de Biología Molecular de Barcelona. CSIC.



Las distrofias musculares congénitas (CMD) son miopatías autosómicas, caracterizadas por debilidad temprana y retraso en el desarrollo motor. Algunas CMD también se asocian con anomalías del sistema nervioso. Todas las CMD comparten un mecanismo patogénico vinculado a la glicosilación anormal de alfa-distroglicano (a-DG). En particular, las mutaciones en POMT1 y POMT2 constituyen los marcadores más comunes de dos variantes de CMD, el síndrome de Walker-Warburg (WWS) y la distrofia muscular de las extremidades tipo 2K (LGMD2K). Estas enzimas son responsables de la síntesis de O-manosilglicano y están relacionadas con la reducción de las modificaciones de carbohidratos en a-DG y su incapacidad para unir los componentes de la matriz.

La naturaleza específica de las distroglicanopatías hace de este grupo de trastornos un buen modelo para comprender la relación entre la glicosilación de proteínas y la enfermedad. Nuestro objetivo fue caracterizar el fenotipo de la ausencia de proteínas POMT en *Drosophila* para identificar los defectos tempranos asociados a las CMD. Además, desarrollamos una búsqueda genética de supresores de una condición sensibilizada (pérdida de POMT en mutantes rotated abdomen (rt) en *Drosophila*) para identificar posibles blancos para intervención terapéutica.

Encontramos que durante la morfogénesis de la musculatura adulta de la mosca, los mioblastos preexistentes sufren una fusión estereotipada. Nuestros análisis descubrieron que esta fusión fallaba en mutantes rt, lo que conducía a músculos débiles con menos núcleos. Las arborizaciones nerviosas, por otro lado, parecen desarrollarse correctamente. Concluimos que el evento más importante en el desarrollo de la patología de la distrofia muscular puede ser un fallo parcial temprano de la fusión muscular.

Nuestras pruebas genéticas han identificado un promotor subconjunto de genes involucrados en la unión de matriz extracelular y el control del citoesqueleto de actina que modulan la fuerza y penetración del fenotipo rt. Además, también identificamos una serie de quinasas que en heterocigosis debilitan los efectos de la pérdida de la función POMT. Estas quinasas son blancos susceptibles para los exámenes de drogas dirigidos a mejorar las CMD.

Identificación de las funciones del gen Wt1 en la enfermedad de Huntington

Investigadora Principal: Ofelia M. Martínez Estrada

Centro de Investigación: Departamento de Biología Celular. Universitat de Barcelona.

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión repetida de poliglutamina en la proteína Huntingtina. El gen supresor de tumores

Producción Científica

3

Comunicaciones en congresos nacionales

2

Comunicaciones en congresos internacionales



de Wilms 1 (Wt1) codifica para un factor de transcripción que desempeña un papel fundamental en la formación de varios órganos durante el desarrollo embrionario y durante el mantenimiento de la integridad y el funcionamiento de múltiples tejidos adultos. Estudios recientes han reportado un aumento en la expresión de Wt1 en un modelo de ratón de la enfermedad de Huntington y en pacientes de la misma. Durante los últimos diez años se han identificado nuevas funciones de WT1 en diferentes tejidos, sin embargo las posibles funciones de este gen en el cerebro y en el desarrollo de la enfermedad de Huntington son desconocidas. Los principales objetivos de nuestro proyecto fueron identificar el papel de WT1 en el desarrollo del cerebro y comprender el significado funcional de la sobreexpresión del mismo observada en la enfermedad de Huntington. Nuestros datos demuestran que WT1 se expresa en el núcleo de las neuronas del córtex, del estriado y del hipocampo desde los estadios P1 hasta las etapas adultas en ratones. Además, el análisis de ratones Wt1KO neuronales reveló un posible papel de WT1 en la regulación de la expresión de Nestina y SOX2 en el neuroepitelio estriado durante el desarrollo cerebral.

Acidemia propiónica: estudio encaminado a la optimización de su tratamiento nutricional, control metabólico y calidad de vida

Investigadora Principal: Mercedes Martínez-Pardo Casanova

Centro de Investigación: CSUR (Centro de Referencia Nacional) de Enfermedades Metabólicas poco frecuentes. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.



Este proyecto tiene, como objetivos principales: 1. Encontrar aquellos parámetros clínicos y/o bioquímicos de mayor utilidad en el seguimiento de pacientes con PA. 2. Determinar la validez de estudios bioquímicos realizados en sangre (s) y orina (o) depositadas en papel S&S, frente a la metodología habitual efectuada en muestras líquidas, tomadas en situaciones clínicas diferentes. 3. Buscar nuevas terapéuticas. 4. Mejorar la calidad de vida de pacientes y familias: extrayendo menos sangre a los niños y evitando desplazamientos de pacientes y familiares.

En (s) se han efectuado: acilcarnitinas y aminograma: generando 18.954 datos, a estudio, comparados con plasma. No ha sido posible valorar OLCFA (119 datos) y CoQ10 (116 datos) en (s), precisando plasma y/o linfocitos.

En (o) se han efectuado: ácidos orgánicos y aminograma: generando 16.000 datos de ácidos orgánicos comparativos con orina líquida. Desde Agosto 2016 no se hace aminograma en (o) ni en orina líquida pues no aportan datos que lo justifique.

El estudio analítico y de toma de muestras finalizó en Septiembre de 2017, dando como resultados, en espera del resultado final estadístico de los datos que tenemos.

1. Los resultados de las muestras (s) y (o) tomadas en su domicilio para acilcarnitinas y aminograma son superponibles a las de plasma y orina líquida, por lo que creemos pueden ser utilizadas en el seguimiento.

2. Los OLCFA y CoQ10 de momento solo se pueden hacer en plasma y/o linfocitos.

3. El aminograma en (o) o en orina líquida no aporta datos que mejoren el seguimiento.

4. Los ácidos orgánicos en (o) son representativos de la situación metabólica del paciente. La relación Citrato/Metilcitrato en orina podría ser representativa.

5. Los pacientes PA precisan CoQ10 en su tratamiento y al darlo podemos mejorar la dieta.

Bases moleculares de la fisiopatología en ceguera hereditaria

Investigadora Principal: Ana Méndez Zunzunegui

Centro de Investigación: Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL). Barcelona.

El objetivo del proyecto es caracterizar los mecanismos de ensamblaje, organización, tráfico ciliar y modulación *in vivo* del complejo proteico RD3/RetGC1/GCAPs, y su relación con la ceguera hereditaria. Este complejo proteico juega un papel central en la respuesta a la luz y es esencial para la viabilidad de las células fotorreceptoras de retina. Durante esta anualidad nos hemos centrado en RD3. Mutaciones en RD3 conducen a una de las formas más severas

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales



de ceguera hereditaria, Leber Congenital Amaurosis (LCA12). Para estudiar la fisiopatología de esta enfermedad caracterizamos una cepa natural de ratones deficiente en RD3 funcional. Hipotetizamos, en base a resultados previos del laboratorio, que las proteínas GCAPs estarían mediando la patología en este modelo, en base al hecho de que la acumulación de GCAPs en su forma libre de Ca²⁺ en fotorreceptores es muy tóxica, y que una pérdida de función de RD3 resulta en una bajada prolongada en la concentración de Ca²⁺. Cruzamos los ratones rd3 con ratones doble knockout en GCAPI/GCAP2, buscando un rescate morfológico. Observamos que, efectivamente, la eliminación de las proteínas GCAP resultaba en la preservación de un 25% más de fotorreceptores, retrasando significativamente la degeneración retinal. El análisis ultraestructural de retinas rd3 reveló una vacuolización dramática, indicativa de un defecto en autofagia, que era rescatada en ausencia de GCAPs. Tres aproximaciones proteómicas independientes llevadas a cabo para identificar interactores de las proteínas GCAP en su forma libre de Ca²⁺, identificaron GABARPL2, una proteína clave en la maduración del autofagosoma. Experimentos en curso pretenden ahora confirmar la implicación de GABARPL2 en la patofisiología de LCA12 y su evaluación como posible diana terapéutica, potencialmente extensible a desórdenes genéticos conocidos como “equivalentes a daño por luz” causados por mutaciones genéticas de origen muy diverso que convergen en causar una bajada prolongada en la concentración de Ca²⁺.

Agenesia del cuerpo calloso. Mecanismos básicos y tratamiento

Investigadora Principal: Marta Nieto López

Centro de Investigación: Centro Nacional de Biotecnología (CNB). CSIC. Madrid.



La agenesia del cuerpo calloso (ACC) comprende una serie de enfermedades raras caracterizadas por la ausencia del tracto axonal que conecta los dos hemisferios cerebrales. Innovadores avances ponen de manifiesto el alto potencial terapéutico que reside en la plasticidad del sistema nervioso. Nuestras investigaciones revelan la importancia de la regulación de la excitabilidad intrínseca durante el establecimiento del CC, y ponen de manifiesto una plasticidad y una ventana de oportunidad para la intervención terapéutica.

El factor de transcripción Cux1 aparece como un determinante temprano de la formación del CC, regulando la expresión de los canales de potasio Kv1 y la respuesta de disparo de la neurona. La pérdida de Cux1, en las neuronas, resulta en la total eliminación de sus axones callosos, pero la activación de Cux1 o de ciertos canales iónicos es suficiente para restaurar estas conexiones, aun cuando se restituye Cux1 en individuos nacidos ya afectados (*Neuron* (2016) 89 (3), 494-506). Además, hemos contribuido a descifrar cómo estos mecanismos contribuyen al síndrome de espectro autista y han participado en la evolución humana (*Cell. Oct* 6;167(2):341-354).

Por otro lado, como resultado de una colaboración, hemos contribuido a comprender cómo la interacción del factor de transcripción Lhx2 con la actividad del circuito y la actividad sensorial es crítica para la formación de mapas corticales (*Cell Rep.* 2017 Jan 24;18(4):849-856). Además, hemos descrito nuevos protocolos que permiten un análisis detallado de la conectividad (*J. Vis. Exp.* 2017(120), e55139), y la función del receptor de IGF-1 en la polaridad neuronal (*Sci Rep.* 2017 Aug 9;7(1):7703). Estamos investigando vías farmacológicas y genéticas que aumenten la reparación del CC. Los resultados abrirán nuevas vías para la intervención y compensación de los síntomas de los pacientes de ACC y son de relevancia para otras enfermedades del cerebro.

Medicina de precisión en Inmunodeficiencias Primarias: desentrañando nuevas etiologías genéticas mediante aproximaciones “ómicas”

Investigadora Principal: Rebeca Pérez de Diego

Centro de Investigación: IdiPAZ, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz. Madrid.

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades infecciosas son las respon-

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

Producción Científica

5

Artículos generados en revistas

3

Comunicaciones en congresos nacionales

6

Comunicaciones en congresos internacionales



sables de la mayor tasa de mortalidad entre niños y adultos jóvenes. Si bien las inmunodeficiencias primarias (IDPs) han sido tradicionalmente definidas como enfermedades raras causadas por defectos del sistema inmune, hoy en día se sospecha que un elevado porcentaje de pacientes con infecciones graves en la infancia presentan defectos mendelianos innatos en su inmunidad. Los tratamientos y seguimientos médicos de estos pacientes, cuyo número se incrementa cada día, son altamente costosos y la calidad de vida de los mismos es limitada. Las IDPs se muestran fundamentales para la compresión de la inmunología humana, proporcionando el marco de estudio de la función de un gen fisiológicamente relevante en el contexto de nuestra especie. Hoy en día es relativamente sencillo el diagnóstico de genes conocidos causantes de IDPs. Con lo cual, el reto actual en el estudio de las IDPs pasa por encontrar nuevas etiologías genéticas. La aproximación genómica gracias a técnicas de secuenciación masiva nos permitirá encontrar nuevos defectos genéticos.

El objetivo del presente proyecto consiste en encontrar nuevas etiologías genéticas asociadas a pacientes con IDPs mediante técnicas de secuenciación masiva; estudios que irán seguidos de una exhaustiva caracterización celular y molecular del gen responsable de la patología y de su papel en el sistema inmunitario. El presente proyecto se enmarca en la medicina de precisión encaminada a acelerar el diagnóstico genético de las IDP, proporcionando así consejo genético a las familias y mejorando el manejo del paciente con IPD para definir las mejores opciones terapéuticas. Gracias a la financiación de este proyecto ha sido posible el estudio personalizado de hasta 29 pacientes y se han logrado caracterizar cuatro nuevos defectos genéticos. Además, con el objetivo de acelerar el diagnóstico de estos pacientes, se ha desarrollado una herramienta informática para automatizar la búsqueda de genes candidatos a partir del gran número de datos obtenido de la secuenciación exómica.

La lamina nuclear en la enfermedad de Huntington: papel en la fisiopatología y aplicaciones terapéuticas

Investigadora Principal: Esther Pérez-Navarro

Centro de Investigación: Universitat de Barcelona.



La enfermedad de Huntington (EH), una enfermedad neurodegenerativa causada por una mutación en el gen de la huntingtina, se caracteriza por la presencia de disfunción motora y cognitiva. Actualmente no existe una terapia eficaz, siendo necesaria la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

Nuestra hipótesis es que un aumento en los niveles de lamina B1, una proteína del envoltorio nuclear, podría participar en la fisiopatología de la EH y la modulación farmacológica de estos niveles podría ser una buena estrategia terapéutica. Hemos observado que los niveles de lamina B1 están aumentados en neuronas estriatales de proyección y en neuronas de la región CA1 del hipocampo en ratones R6/1 y en pacientes de la EH. Este aumento produce, en las neuronas afectadas, alteraciones en la morfología nuclear, en la permeabilidad de la membrana nuclear y en la transcripción. El tratamiento con ácido betulínico previene la aparición del déficit en la memoria espacial y de reconocimiento, y del aprendizaje motor. A nivel celular, este tratamiento previene el aumento de los niveles de lamina B1 en el hipocampo y en la corteza cerebral, y las alteraciones en la morfología nuclear y en la permeabilidad de la membrana nuclear, lo que puede explicar la mejora cognitiva en los ratones R6/1.

La detección de alteraciones en los niveles de lamina B1 a nivel periférico podría ser un buen biomarcador tanto del proceso neurodegenerativo como de la eficacia terapéutica de fármacos dirigidos a su modulación. Resultados preliminares obtenidos en leucocitos y fibroblastos de pacientes de EH muestran un aumento de los niveles de lamina B1 y alteraciones de la morfología nuclear dependiendo del número de repeticiones CAG pero no del estadio de la enfermedad. Actualmente, estamos realizando un estudio longitudinal en ratones R6/1 para intentar correlacionar los cambios que observamos en las distintas áreas cerebrales con los cambios que se producen en los leucocitos y fibroblastos. Además, hemos puesto a punto una técnica para determinar en qué tipo de leucocitos se producen las alteraciones de lamina B1.

Producción Científica

5

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

7

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

2

Comunicaciones en congresos nacionales

4

Comunicaciones en congresos internacionales

Análisis genómico y transcriptómico para identificar defectos de splicing y evaluación *in vivo* de la terapia antisentido

Investigadora Principal: Lourdes Ruiz Desviat

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.



Este proyecto se ha centrado en la caracterización de mutaciones de *splicing* y el testaje de aproximaciones terapéuticas dirigidas a corregir dichos defectos, como son el uso de oligonucleótidos antisentido que bloquean sitios crípticos de splicing y/o regiones silenciadoras que unen factores inhibitorios de splicing, o el uso de U1 snRNAs adaptados a secuencias mutantes.

Para las mutaciones intrónicas c.1199+17g>a y c.1199+20g>c en el gen PAH, identificadas en pacientes con fenilcetonuria, se demostró que generan exon skipping en un sistema de minigenes. El análisis combinado mediante técnicas bioinformáticas (predicción *in silico* de potenciadores y silenciadores de splicing), mutagénesis seriada en la región, estudios de afinidad a oligonucleótidos RNA, sobreexpresión de factores de splicing y de U1snRNA adaptados, ha permitido concluir que las mutaciones interfieren con la unión de U1 snRNP. La unión de U1 a esta región intrónica fuera del sitio donador 5' de splicing es necesaria para el correcto reconocimiento exónico y el defecto de unión puede ser corregido mediante el uso de U1 snRNAs adaptados perfectamente complementarios a la secuencia mutante.

Por otra parte, se ha evaluado la eficacia terapéutica *in vitro* de oligonucleótidos antisentido dirigidos a mutaciones intrónicas activadoras de pseudoexones en el gen PCCA, causantes de acidemia propiónica, y en el gen PTS, causante de un defecto en la síntesis de tetrahidrobiopterina. En ambos casos, se corrigió el defecto de splicing impidiendo la inclusión del pseudoexon en el mRNA, y se comprobó la recuperación de la proteína y la actividad enzimática en el caso de la mutación PCCA. En el gen PTS se corrigió asimismo en un sistema de minigenes el defecto de splicing causado por la mutación c.234+3A>G mediante el uso de U1 snRNA perfectamente complementario a la región 5' donadora de splicing del exon 4, lo que permite el correcto reconocimiento del mismo por la maquinaria de splicing.

Mecanismos moleculares del síndrome de Dravet

Investigador Principal: Francisco Zafra Gómez

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.



El Síndrome de Dravet (DS) es un tipo de epilepsia genética severa que debutá en la primera infancia. Un 75% de los pacientes presentan haploinsuficiencia del gen SCN1A (subunidad α -1 del canal de sodio Nav1.1) que controla la excitabilidad eléctrica de las neuronas en las que se expresa (principalmente de tipo GABA-érgico). Numerosos estudios han conseguido aclarar la patofisiología de muchas mutaciones de este gen que afectan a las características del canal iónico, pero hay un buen número de ellas que podrían afectar al tráfico y maduración intracelular y cuyos mecanismos patogénicos no están aclarados.

El objetivo de este proyecto es tratar de identificar las vías de tráfico y aquellas proteínas y mecanismos reguladores que pudieran afectar al movimiento del canal hacia y desde la membrana neuronal, tanto en su forma nativa como en los mencionados mutantes. Mediante métodos de cribado de una librería de quinasas pudimos determinar que la vía de señalización de AKT modifica la actividad del canal por fosforilación. Los estudios de electrofisiología en una línea que expresa de manera estable Nav1.1, indican que esta modificación del canal está asociada a una disminución en las corrientes de sodio mediadas por el canal, y a una variación en otros parámetros electrofisiológicos del mismo, así como en el tráfico del canal hasta la membrana. Además, hemos desarrollado un método de imagen para la detección de las neuronas en cultivo primario que expresan Nav1.1, y que permite medir la actividad del mismo en un sistema fisiológico. De esta manera hemos podido confirmar la modulación por AKT en dicho sistema. Dada la importancia de AKT en la transmisión de señales iniciadas por hormonas como la insulina, IGF-1 y otras proteínas señalizadoras, pensamos que esta vía puede ser relevante en los procesos epileptogénicos, en los pacientes DS y en otros tipos de epilepsias.

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

9

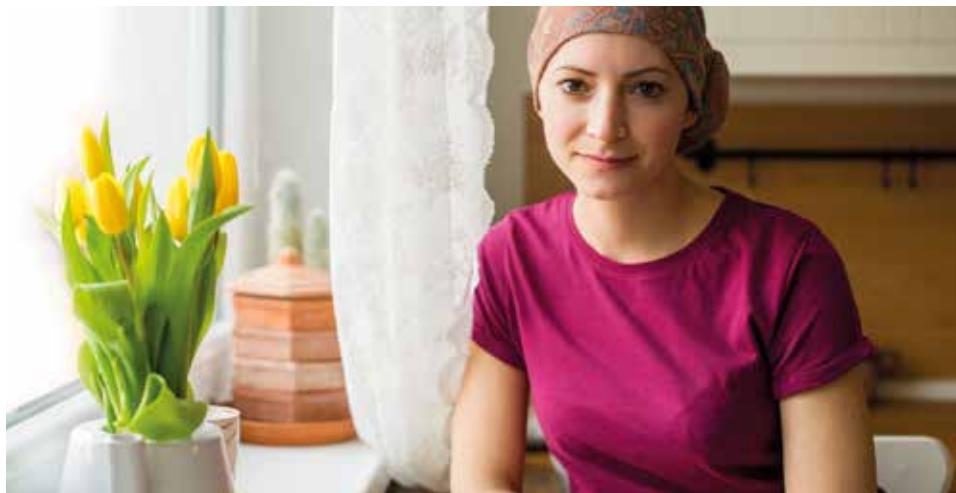
Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

2. METABOLISMO Y CÁNCER



Función oncogénica de IF1: el Inhibidor de la H⁺-ATP sintasa de la mitocondria

Investigador Principal: José Manuel Cuevaz Marcos

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.



La disfunción de la mitocondria está implicada en la génesis y/o progresión de muchas patologías. Un complejo proteico clave en la generación de energía en la mitocondria es la H⁺-ATP sintasa. Hemos descrito que el Factor Inhibidor 1 de la ATPasa (IF1) está sobre-expresado en carcinomas humanos lo que promueve la inhibición de la

H⁺-ATP sintasa contribuyendo a la reprogramación metabólica de la célula tumoral a una glucolisis más activa. Por otro lado, esta inhibición genera una señal de especies reactivas de oxígeno que activa programas de proliferación, invasión y de resistencia a muerte. Es decir, IF1 se configura como una proteína mitocondrial muy importante para definir el metabolismo energético, la homeostasis tisular y la progresión del cáncer.

El objetivo global del proyecto es profundizar en el conocimiento de la biología celular de IF1 y de su implicación en cáncer. Con el desarrollo del proyecto hemos demostrado que la actividad de IF1 está regulada por fosforilación de S39 mediada por una quinasa mitocondrial dependiente de cAMP lo que conduce a su inactivación como inhibidor de la sintasa. En los carcinomas más prevalentes IF1 se encuentra desfosforilado y, por tanto, activo. Hemos demostrado que la sobre-expresión de IF1 en hígado de ratones transgénicos induce un fenotipo metabólico que propicia la carcinogénesis. Por el contrario, en cáncer de mama una elevada expresión de IF1 es un marcador de buena prognosis para las pacientes porque previene la metástasis. El transgénico que sobreexpresa IF1 en intestino genera un fenotipo anti-inflamatorio consistente con la función hormética de IF1 en ese tejido. Hemos generado el ratón IF1-KO en intestino que evidencia un fenotipo pro-inflamatorio estando en fase de estudio su implicación en la génesis del carcinoma colorectal. Se ha identificado una molécula aprobada por la FDA que contribuye a frenar el crecimiento de carcinomas de mama y de colon en ratones xenotransplantados.

Producción Científica

12

Artículos generados en revistas

9

Comunicaciones en congresos nacionales

13

Comunicaciones en congresos internacionales

Análisis fármaco-mimético del valor terapéutico de rutas metabólicas Vav-dependientes en cáncer de mama

Investigador Principal: Xosé Ramón García Bustelo

Centro de Investigación: Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.

La alteración del metabolismo celular es un proceso clave de procesos tumorigénicos. Estos cambios permiten que las células tumorales produzcan energía y elementos estructurales necesarios para mantener sus altas tasas de crecimiento. Sin embargo, ahora se sabe que



algunas de estas alteraciones también permiten generar segundos mensajeros intracelulares implicados en la estimulación de programas biológicos que favorecen proactivamente el proceso de transformación celular. Nuestro laboratorio ha estudiado, gracias al proyecto de investigación otorgado por la Fundación Ramón Areces, los cambios metabólicos globales activados por las onco-proteínas de la familia Vav, un grupo de enzimas involucradas en la estimulación de las GTPasas Rho.

A través del uso de técnicas globales de generación de perfiles de expresión génica, pruebas de shRNA funcionales de alto rendimiento y estudios de validación final, nuestro laboratorio pudo identificar, en el curso de este proyecto, los programas metabólicos que se alteran por los oncogenes Vav y, al mismo tiempo, descubrir que algunas de las enzimas involucradas en dichas rutas son talones de Aquiles farmacológicos potenciales para las células tumorales. Esto nos ha permitido descubrir: (i) Procesos biológicos dependientes de Vav que median tanto la tumorigénesis primaria como la metástasis de las células de cáncer de mama. (ii) Identificar nuevas dianas terapéuticas involucradas en la modulación de cada uno de esos procesos. (iii) Firmas genéticas de diagnóstico que permiten la estratificación de pacientes con cáncer de mama en términos de supervivencia general, quimiorresistencia y desarrollo potencial de metástasis pulmonares.

Efecto antitumoral de la quinasa GCN2: relación entre estrés nutricional, síntesis de proteínas y cáncer de piel

Investigador Principal: César Jesús de Haro Castella

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.



Las células responden, se adaptan y sobreviven al estrés ambiental debido a cambios en la expresión de proteínas específicas que ocurren de forma temprana y dependiente de la traducción de sus ARN mensajeros. Estos cambios críticos, influyen en la capacidad de adaptación de los organismos y, a largo plazo, también en su envejecimiento y en el desarrollo de las enfermedades relacionadas, como el cáncer. Así, nuestro objetivo es investigar la relevancia funcional de proteínas que regulan la traducción en respuesta a estrés, tanto en el envejecimiento como en el desarrollo de tumores de piel, centrándonos en el estudio de dos formas de estrés: la radiación ultravioleta (UV), principal causante del cáncer de piel; y la restricción nutricional (dietas con bajo contenido en el aminoácido metionina), que promueve un significativo aumento de longevidad.

Estos estudios se realizaron en células y ratones que carecen de GCN2, proteína quinasa que se activa en respuesta a distintas formas de estrés, como radiación UV y escasez de aminoácidos, regulando la función del factor 2 de iniciación de la síntesis de proteínas (eIF2). Tras aplicar los tratamientos (luz UV y regímenes con bajo contenido en metionina) individualmente, o en combinación, la principal conclusión es que las células incapaces de activar GCN2 y de fosforilar eIF2 en respuesta a UV son más sensibles a este estrés, y tienen menor capacidad para sobrevivir. Además, parece que el pre-condicionamiento nutricional por baja ingesta de metionina mantenida en el tiempo, puede mejorar la respuesta al estrés provocado por la luz ultravioleta, haciendo las células más resistentes a sus efectos nocivos. Esto, aplicado a los organismos vivos, podría significar que modificando la actividad de GCN2, por medios naturales (dietas) o por tratamientos farmacológicos, podríamos ralentizar y/o impedir el desarrollo de lesiones tumorales de piel provocadas por exposición a la luz solar.

NADPH oxidasas y regulación del metabolismo intermedio de células leucémicas: búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas

Investigador Principal: Ángel Hernández Hernández

Centro de Investigación: Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

CSIC-Universidad de Salamanca.

Una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la dependencia de

Producción Científica

13

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

2

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas



la glucolisis como fuente de energía, son dos de las características distintivas del metabolismo de células leucémicas. Algunas oncoquininas como BCR-ABL y FLT3-ITD contribuyen a esta adaptación metabólica, e incrementan la producción de ROS a través de NADPH oxidadas (Nox). Anteriormente, hemos mostrado que la inhibición de las NADPH oxidadas en combinación con inhibidores tirosina quinasa es una interesante estrategia terapéutica frente a la leucemia mieloide crónica (LMC) y aguda (LMA).

En el presente proyecto estamos analizando la implicación de las NADPH oxidadas en la regulación del metabolismo leucémico. El silenciamiento de la NADPH oxidasa Nox2 en células leucémicas reduce la concentración de varios intermedios metabólicos. Además, los análisis con la tecnología Seahorse XF muestran un incremento del metabolismo glucolítico y de la capacidad respiratoria. Estas alteraciones concuerdan con una mayor actividad lactato deshidrogenasa (LDH) y un aumento del contenido mitocondrial, respectivamente, en las células donde se ha silenciado Nox2. Todo ello apoya fuertemente la importancia de las NADPH oxidadas para la regulación del metabolismo leucémico, lo que podría ofrecer interesantes oportunidades terapéuticas. Así, hemos encontrado que la inhibición simultánea de las NADPH oxidadas y de varias enzimas que intervienen en la glucolisis o en el metabolismo mitocondrial, reduce de manera sinérgica la proliferación y la capacidad clonogénica de varias líneas celulares modelo de LMC y LMA, incrementando al mismo tiempo la apoptosis celular. Efectos similares se encontraron en células de médula ósea de pacientes de LMA. En breve comenzaremos a analizar el potencial traslacional de estas estrategias terapéuticas en modelos animales *in vivo*. Actualmente estamos tratando de lograr una mejor comprensión acerca del mecanismo mediante el cual las oxidadas NADPH controlan el metabolismo leucémico.

Inhibición de la proteína reguladora del metabolismo iónico celular SLC4A2 como nueva terapia en leucemias, linfomas y mielomas

Investigador Principal: José Ángel Martínez-Climent

Centro de Investigación: Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra. Pamplona.



Una prometedora aproximación, a la inmunoterapia del cáncer, tiene como objetivo la inhibición de los linfocitos T reguladores (Tregs) CD4+CD25+Foxp3+. Nuestros datos revelaron que la delección del gen que codifica, para la proteína SLC4A2 (AE2), un intercambiador de HCO₃- de membrana que regula el pH intracelular en linfocitos, dio lugar a una disminución de linfocitos Tregs, sugiriendo que AE2 podría ser una potencial diana en la inmunoterapia tumoral. Para demostrar esta hipótesis, generamos péptidos lineales con capacidad de unirse de forma específica al tercer bucle extracelular de la proteína AE2.

En esta propuesta, se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

- Objetivo 1: definir los mecanismos celulares, físico-químicos y moleculares observados como consecuencia de la interacción de los péptidos con AE2 en las diferentes subpoblaciones de células B y T normales.
- Objetivo 2: explorar los mecanismos de acción y el potencial terapéutico de los péptidos *in vitro* en muestras primarias o líneas celulares de neoplasias de células B.
- Objetivo 3: determinar la doble eficacia terapéutica de los péptidos en modelos experimentales de leucemia, linfoma y mieloma *in vivo*.

Se diseñaron y sintetizaron dieciocho péptidos lineales, capaces de unirse al tercer bucle extracelular de AE2. *In vitro*, se observaron efectos opuestos en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T murinas y humanas, promoviendo la apoptosis de las células Treg y activando la función de las células T efectoras. El péptido p17AE2 fue capaz de promover la apoptosis en líneas celulares y en muestras primarias de leucemia de células B, linfoma y mieloma múltiple humano, presentando, sin embargo, un moderado efecto en células B no tumorales. La unión del péptido a AE2, en linfocitos, es capaz de modular su función intercambiadora de aniones, disminuyendo el pH intracelular e induciendo la apoptosis. Sin

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

6

Comunicaciones en congresos nacionales

3

Comunicaciones en congresos internacionales

embargo, el p17AE2 lineal no fue efectivo en experimento *in vivo* realizados en ratones. El diseño de diferentes modificaciones químicas, para mejorar la estabilidad del péptido, permitió la generación de nuevos derivados ciclados capaces de unirse a AE2 con resultados *in vitro* similares a los del péptido lineal, pero con mejores parámetros farmacocinéticos. El péptido macrocíclico p17AE2-HT redujo el volumen tumoral en un modelo de xenotransplante *in vivo*. Este efecto, sin embargo, fue perceptible sólo cuando el péptido se inoculó de forma intratumoral a altas dosis. Estos datos sugieren que el SLC4A2 podría representar una diana terapéutica efectiva en neoplasias de células B. Nuevas modificaciones de los actuales péptidos ciclados, dirigidos contra AE2, y/o el desarrollo de pequeñas moléculas moduladoras de su función, podrían contribuir al desarrollo de una potencial estrategia terapéutica aplicable a tumores humanos.

Estudios de tumorogénesis en *Drosophila*: posibles implicaciones clínicas

Investigador Principal: Ginés Morata Pérez

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.



Los objetivos específicos de nuestro trabajo, durante este periodo, han sido estudiar los mecanismos de activación de la vía de transducción Jun N-Terminal Kinase (JNK) y su capacidad tumorogénica en células refractarias a apoptosis.

Como se describía en la memoria anterior, la vía JNK se activa de forma permanente en células refractarias a apoptosis después de irradiación o después de un pulso de la quinasa Hep o de la proteína activadora p53. También hemos estudiado la respuesta a irradiación de células que poseen altos niveles de actividad de la vía Ras, una vía de transducción asociada con gran número de procesos tumorales en vertebrados, incluyendo la especie humana (Melarde & Santos Genes Cancer 2, 344, 2011). El resultado ha sido que también en estas células la actividad JNK se establece de forma permanente después de stress. En conjunto, estos resultados refuerzan la conclusión de que en células refractarias a apoptosis un simple suceso de activación da lugar a continua actividad tumorogénica de JNK. Sugieren además que los tumores generados por Ras son debidos a que las células que expresan Ras no entran en apoptosis y se convierten en oncogénicas.

A partir de estos resultados, hemos estado investigando los mecanismos que permiten en estas células resistentes a apoptosis una actividad permanente de JNK, mientras que en células que pueden entrar en apoptosis la actividad JNK se apaga pocas horas después del suceso de activación.

Hemos encontrado que durante todo el periodo de actividad JNK se detectan altos niveles de oxígeno reactivo (ROS, Reactive Oxigen Species) que se sabe que inducen actividad JNK (Shi et al CDD 21, 612, 2014) lo que sugiere que son los responsables de la actividad permanente de JNK. Asimismo hemos comprobado que el gen moladietz, para el que se ha demostrado que mantiene actividad JNK durante los procesos regenerativos dando lugar a altos niveles de ROS, (Khan et al Plos Genet 13(7):e1006937, 2017), también está presente en células que mantienen la actividad JNK, sugiriendo que este gen está implicado en la actividad permanente de JNK.

Diagnóstico del cáncer mediante una plataforma de nanosensores metabólicos

Investigador Principal: Ángel Orte Gutiérrez

Centro de Investigación: Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

La reprogramación metabólica que presentan las células cancerígenas, por la que fundamentan su metabolismo en la glicólisis aeróbica frente al metabolismo oxidativo mitocondrial, produce alteraciones en los niveles de ciertos metabolitos, tanto a nivel citosólico, como a nivel mitocondrial. En los últimos años se está evidenciando la importancia capital del metabolismo celular a la hora de comprender el comportamiento de las células tumorales.

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

5

Comunicaciones en congresos nacionales

2

Comunicaciones en congresos internacionales



Así, mediante el presente proyecto de investigación, se ha conseguido establecer la diferencia de “metabófenotipos” en diferentes líneas de cáncer de mama, en función de su comportamiento metabólico frente a inhibidores de las aspartato-transaminasas.

Para ello, se ha establecido una plataforma nanotecnológica de detección de diferentes estatus celulares metabólicos, a través de nanosensores fluorescentes y técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia multidimensional, en concreto microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM), que soluciona, en gran medida, muchas de las desventajas y errores sistemáticos de métodos convencionales.

En este proyecto se han desarrollado nanosensores específicos para seguir la regulación celular de Zn (II), iones implicados en problemas de inmunodeficiencia (*Chem. Commun.* 2015, 51:16964); así como una familia de nanosensores fluorescentes útiles para el marcaje celular en FLIM, y técnicas de citometría de fluorescencia y citometría de masas (*ACS Omega* 2018, doi: 10.1021/acsomega.7b01984).

Además, el establecimiento de metabófenotipos celulares nos ha permitido realizar un diseño racional de potenciales fármacos anti-tumorales, basados en inhibición enzimática metabólica, mostrando una eficacia mejorada en líneas celulares de cáncer de mama refractarias a otros tratamientos.

Este proyecto, que finalizó en el mes de abril de 2018, podrá contribuir al desarrollo a medio plazo de nuevas estrategias de diagnóstico tumoral, avaladas por el potencial discriminatorio a nivel metabólico cuantitativo, abriendo la puerta a una plataforma de diagnóstico metabólico del cáncer, que podría extenderse posteriormente al diagnóstico tisular, o incluso “*in vivo*”.

La inhibición de la enzima lipogénica sintasa de ácidos grasos (FASN) como nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo

Investigadora Principal: Teresa Puig Miquel

Centro de Investigación: Universidad de Girona.



El objetivo principal del proyecto es la determinación de la expresión y actividad de la sintasa de ácidos grasos (FASN) en distintos subgrupos celulares de cáncer de mama triple negativo (TNBC) y en muestras de pacientes de TNBC, para analizar el papel de la inhibición de la actividad de FASN mediante compuestos polifenólicos de nueva síntesis relacionados estructuralmente con el EGCG, como posible diana o co-diana terapéutica. Los resultados, hasta el momento, demuestran que los nuevos inhibidores sintéticos de FASN son citotóxicos en los modelos de TN sensibles y quimioresistentes (desarrollados por nuestro grupo) y que existe sinergismo farmacológico cuando se combinan los inhibidores de FASN con quimioterapia (doxorubicina y paclitaxel). Además, hemos demostrado que la combinación también es sinérgica en modelos animales de TNBC, sin datos de toxicidad.

A nivel de muestras de pacientes hemos demostrado, sobre una cohorte de 100 pacientes con TNBC diagnosticados en el Instituto Catalán de Oncología de Girona entre el 1990 y 2012, que FASN se expresa en la mayoría de pacientes. Sin embargo, la expresión de FASN no se correlacionó con la supervivencia libre de la enfermedad. Por otro lado, se han optimizado las condiciones para la fabricación de scaffolds nanométricos (matrices 3D) a través de la tecnología de electrospinning, para el cultivo y enriquecimiento de la población de cancer stem cells (CSCs). La expansión de esta subpoblación ha sido cuantificada mediante distintas técnicas (formación de mamosferas, actividad ALDH, marcadores EMT) de dos modelos celulares de TNBC (mesenquimal y basal). Se ha conseguido, de esta forma, enriquecer la población CSC, permitiendo una caracterización molecular de los modelos TN enriquecidos usando scaffolds para su posterior tratamiento. La población CSC ha sido propuesta como diana farmacológica por su papel en la recurrencia y adquisición de resistencia a las terapias actuales.

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

5

Comunicaciones en congresos nacionales

6

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

11

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

6

Comunicaciones en congresos internacionales

La enzima AMPK, un nexo de unión entre metabolismo y cáncer. Una nueva estrategia terapéutica en los glioblastomas cerebrales

Investigadora Principal: Rosa M^a Señarís Rodríguez

Centro de Investigación: CIMUS. Universidad de Santiago de Compostela.



Nuestro objetivo es estudiar el posible papel de la enzima AMPK como molécula maestra que interrelaciona metabolismo celular, proliferación/supervivencia y migración en las células cancerosas. Para ello, hemos utilizado como modelo tumoral el glioblastoma multiforme, tumor primario del sistema nervioso.

Datos previos de nuestro grupo demostraban niveles elevados de la actividad de AMPK en los glioblastomas y que esta enzima metabólica era necesaria para la proliferación de este tipo de tumores. En este proyecto hemos estado profundizando en el papel de AMPK en el metabolismo mitocondrial y glucolítico, así como la eficacia de la inhibición de AMPK como una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de los glioblastomas. Para ello hemos utilizado diversas líneas de tumores astrocitarios humanos y muestras de pacientes. Las células de glioblastoma son muy dependientes de glucosa, aunque con gran capacidad de utilizar ácidos grasos y glutamina como sustratos oxidativos en la mitocondria. El silenciamiento de AMPK con RNAs de interferencia disminuye significativamente la respiración mitocondrial y la expresión de factores de transcripción mitocondriales (PPAR α y PGC1 α), no modifica la glucólisis, pero aumenta significativamente la capacidad de utilización mitocondrial de la glutamina. Este es un dato importante a la hora de utilizar AMPK como diana terapéutica en estos tumores.

Los glioblastomas son heterogéneos, con gran poder proliferativo, pero también muy infiltrantes. Nuestros datos, en muestras de tumores de pacientes, indican que las células con niveles elevados de actividad de AMPK se encuentran rodeando los vasos, en las zonas con la mayor tasa de proliferación, lo cual indica que la activación de AMPK no es un proceso homogéneo en todo el glioblastoma. Curiosamente, la inhibición de AMPK incrementa la migración/invasión de las células de glioblastoma. Ello sugiere una regulación diferencial de esta enzima y del metabolismo de las subpoblaciones proliferativas e invasivas del glioblastoma y subraya la necesidad de estrategias terapéuticas multidiana teniendo en cuenta la heterogeneidad metabólica del tumor.

Efecto de péptidos penetrantes antitumorales basados en la conexina-43 en la reprogramación metabólica selectiva de las células madre de glioma humano

Investigadora Principal: Aránzazu Tabernero Urbeta

Centro de Investigación: Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca.



Los gliomas malignos son los tumores cerebrales primarios más frecuentes y presentan un mal pronóstico, con una esperanza de vida media en torno a los 18 meses. Estos tumores contienen una subpoblación de células, denominadas células madre de glioma, consideradas responsables de la recurrencia de los gliomas. A diferencia del resto del glioma, estas células sobreviven en ambientes desfavorables porque reprograman su metabolismo, incrementando la expresión, entre otros, del transportador de alta afinidad para la glucosa, GLUT3. Recientemente, hemos descrito que péptidos penetrantes basados en la interacción entre la conexina-43 y c-Src (TAT-Cx43266-283) revierten, específicamente, el fenotipo característico de las células madre de glioma.

El objetivo general del presente proyecto es determinar si estos péptidos penetrantes impiden la reprogramación metabólica de las células madre de glioma sin afectar al metabolismo de las neuronas y los astrocitos. Nuestros resultados indican que TAT-Cx43266-283 disminuye la captación de glucosa en células madre de glioma en cultivo, sin que esta se vea afectada en otras células sanas del cerebro, como son las neuronas o los astrocitos en cultivo primario. Además, los resultados obtenidos en un modelo de glioma ex vivo nos permiten confirmar que TAT-Cx43266-283 reduce la captación de glucosa en las células

Producción Científica

2

Comunicaciones en congresos nacionales

Producción Científica

7

Artículos generados en revistas

19

Comunicaciones en congresos nacionales

21

Comunicaciones en congresos internacionales

madre de glioma en el contexto del parénquima cerebral. Recientemente, hemos estudiado la función y parámetros mitocondriales, encontrando que TAT-Cx43266-283 no ejerce ningún efecto sobre la actividad mitocondrial de neuronas y astrocitos. Sin embargo, en el caso de las células madre de glioma, TAT-Cx43266-283 disminuye la respiración basal, la respiración máxima, la producción de ATP y la reserva respiratoria mitocondrial. Por tanto, TAT-Cx43266-283 reduce la captación de glucosa y la función mitocondrial, específicamente, en células madre de glioma sin afectar a neuronas y astrocitos. Estos datos respaldan a TAT-Cx43266-283 como un agente interesante para el desarrollo de terapias contra estos tumores.

Caracterización molecular del papel de la disfunción mitocondrial en el desarrollo tumoral

Investigador Principal: Ignacio Alejandro Varela Egocheaga

Centro de Investigación: Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria.

CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN.



El cáncer se produce, fundamentalmente, por la acumulación somática de mutaciones en el ADN. Durante años, se ha descrito la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) en prácticamente todos los tipos tumorales, aunque todavía se desconoce su transcendencia en el proceso tumoral. En este contexto, en el presente proyecto nos propusimos inicialmente un estudio genómico de las alteraciones presentes en el ADN mitocondrial en una gran colección de muestras tumorales humanas con la intención de identificar patrones mutacionales que nos permitieran determinar si las alteraciones en el ADNmt juegan un papel importante en el desarrollo tumoral así como los mecanismos moleculares implicados.

Durante este proyecto hemos secuenciado el genoma mitocondrial de más de 500 muestras tumorales lo que nos ha permitido identificar unas 170 mutaciones somáticas. El 93% de estas mutaciones producen un cambio de aminoácido en la proteína y el 10% de las mutaciones están en todas las mitocondrias de la célula (homoplasmia) a pesar de ser somáticas. Todo esto podría indicar una alta presión selectiva en la acumulación de mitocondrias defectuosas y, por lo tanto, un papel activo de estas alteraciones en el desarrollo tumoral. En segundo lugar hemos detectado una gran ausencia de transversiones G>T y un gran número de transiciones G>A lo que hipotetizamos que es resultado de un comportamiento especial de la ADN polimerasa mitocondrial a la acumulación de 8-oxo-guanina. Por último, hemos visto una acumulación mayor de mutaciones cuando el daño se produce en la hebra no transcrita, lo que podría evidenciar la presencia de un mecanismo de reparación asociado a la transcripción, que no ha sido descrito hasta la fecha en el ADN mitocondrial. Estos resultados apoyan un papel activo de las alteraciones mitocondriales en el desarrollo tumoral y evidencian la presencia de nuevos mecanismos mutacionales y de reparación en el ADNmt.

Producción Científica

2

Comunicaciones en congresos nacionales

3. INTERACTOMA: IMPLICACIONES PATOLÓGICAS



Bases estructurales del desarrollo tumoral asociado a defectos en el interactoma que regula la transcripción

Investigador Principal: Carlos Fernández Tornero

Centro de Investigación: Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). CSIC. Madrid.



La transcripción es el primer paso en la expresión génica y se regula a través de una dinámica red de interacciones entre las macromoléculas involucradas en dicho proceso. Las alteraciones transcripcionales desestabilizan la homeostasis celular y están relacionadas con el desarrollo de enfermedades. Entre estas, destaca el descontrol en la proliferación celular que generalmente conduce a la formación de tumores. Por tanto, el estudio de las interacciones que regulan este proceso permite sentar las bases para el desarrollo de nuevos fármacos.

El objetivo del presente proyecto es la caracterización estructural y funcional de diversas proteínas y complejos macromoleculares que forman parte del interactoma que regula la transcripción. Abordamos este reto a través de un enfoque integrativo que combina potentes métodos estructurales, como la criomicroscopía electrónica y la resonancia magnética nuclear, con estudios genéticos, bioquímicos y de microscopía de fluorescencia en células vivas.

Nuestros estudios estructurales de la ARN polimerasa I en su estado libre y unida a la proteína activadora Rrn3, complementados con análisis funcionales en condiciones de estrés nutricional, han permitido desvelar un mecanismo que modula la producción de ARN ribosómico según las condiciones externas (Torreira et al., eLife 2017; Fernandez-Tornero, Transcription 2018). Además, hemos descubierto cómo esta enzima detecta lesiones en el ADN producidas por la luz ultravioleta, lo que protege las células frente a la luz solar (Sanz-Murillo et al., PNAS 2018). También hemos profundizado en el mecanismo empleado por la proteína Sub1 para regular la actividad de la ARN polimerasa II, enzima que sintetiza los ARN mensajeros (Garavís et al., NAR 2016; Garavís & Calvo, Current Genetics 2016; Calvo, Transcription 2018). Finalmente, hemos identificado segmentos en la región desordenada del factor de transcripción CHOP que presentan carácter helicoidal, lo que les permite mediar interacciones con proteínas que regulan la transcripción (Canales et al., PLoS One 2017).

Producción Científica

7

Artículos generados en revistas

10

Comunicaciones en congresos nacionales

8

Comunicaciones en congresos internacionales

Inhibición fotoselectiva de interacciones proteína-proteína para el estudio de redes interactómicas y el desarrollo de nuevas terapias

Investigador Principal: Pau Gorostiza Langa

Centro de Investigación: Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC). Barcelona.



La actividad, en el último tramo del proyecto, se ha basado en los conocimientos básicos logrados en los años anteriores, a saber, la determinación de las reglas de diseño de péptidos para obtener inhibidores de péptidos fotoconmutables y la aplicación del andamio helicoidal para diseñar nuevas interacciones proteína-proteína involucradas en cáncer.

Sobre esta base, hemos probado las propiedades anticancerígenas de los péptidos fotoconmutables y hemos encontrado que causan la muerte celular de forma dosis-dependiente y con una eficacia moderadamente regulada con luz. También hemos desarrollado nuevos inhibidores peptídicos basados en una hélice partida donde tres aminoácidos se reemplazan por un aminoácido de azobenceno. Estos péptidos se han sintetizado, purificado y sus propiedades químicas y fotofísicas se han caracterizado completamente. Fotoisomerizan, como era de esperar, y están listos para llevar a cabo ensayos de unión y actividad en su proteína diana, el receptor de orexina. Dado que los receptores de orexina son reguladores cruciales del sueño y la vigilia, estos nuevos péptidos pueden ser muy útiles como herramienta para la investigación básica en muchos procesos neurobiológicos, así como también como potenciales fármacos para terapias reguladas por la luz. Por último, hemos continuado investigando nuestros péptidos Traffic Lights inhibidores de endocitosis mediada por clatrina y hemos establecido un nuevo ensayo para fotocontrolar la endocitosis en esferoplastos de levadura, que constituye un sistema más ventajoso para estudios mecánicos que las líneas celulares de mamíferos utilizadas en estudios previos.

Estudio del interactoma tejido-específico del nodo GRK2 implicado en la resistencia a insulina y obesidad: repercusiones fisiopatológicas

Investigadora Principal: Cristina Murga Montesinos

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.



La proteína quinasa GRK2 es una serina/treonina quinasa ubicua y esencial que constituye un nodo para integrar las señales iniciadas por diferentes cascadas de señalización intracelular. La relevancia de GRK2 en el control de fenómenos fisiopatológicos se ha acentuado en los últimos años con el descubrimiento de que un aumento en sus niveles puede actuar como un inhibidor de la ruta de la insulina mediante diferentes mecanismos que nuestro grupo y otros investigadores han ayudado a caracterizar.

Este proyecto se ha centrado en estudiar cómo cambios en los niveles o actividad de GRK2 pueden alterar el desarrollo de patologías relacionadas con la señalización de la insulina o la regulación metabólica que esta hormona ejerce. Para ello, hemos utilizado ratones modificados genéticamente como modelo experimental y, en algún caso, muestras humanas.

Nuestros datos indican que una reducción en los niveles de GRK2 ayuda a limitar la esteatosis, hipertrofia y fibrosis cardíacas inducidas por una alimentación con dieta alta en grasas. Además, esta reducción de GRK2 puede no sólo prevenir sino también revertir algunos de los efectos patológicos de esas dietas como son la insulinoresistencia y el sobrepeso, incluso cuando estas condiciones se habían establecido con anterioridad en animales genéticamente modificados. Además, hemos descubierto que los niveles bajos de esta proteína previenen frente al desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) en modelos preclínicos, reducen la inflamación en este tejido y mejoran la respuesta celular ante esta patología. Además, los niveles de GRK2 en muestras de hígado de pacientes correlacionan con la acumulación de grasa en hígado y con la severidad de esta patología en humanos.

Como conclusión global de nuestro trabajo podemos destacar que nuestros resultados identifican a GRK2 como una potencial diana terapéutica en el tratamiento de la obesidad y de la resistencia a insulina así como en la hipertrofia y esteatosis cardíaca y en la enfermedad de hígado graso NAFLD, todas ellas patologías de creciente incidencia y repercusión en nuestra sociedad.

Producción Científica

4

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

7

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

4

Artículos generados en revistas

4

Comunicaciones en congresos nacionales

5

Comunicaciones en congresos internacionales

Nuevos complejos funcionales derivados de la interacción de G α q con proteínas que contienen dominios PB1 y su posible repercusión en patologías cardiovasculares

Investigadora Principal: Catalina Ribas Núñez

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.



Las proteínas G heterotriméricas juegan un papel esencial en el inicio de la señalización de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Concretamente, los GPCR acoplados a G α q median la acción de numerosas hormonas y neurotransmisores con un papel muy relevante en distintas patologías.

Los objetivos generales de este estudio consisten en caracterizar las repercusiones funcionales que se derivan de la interacción de G α q con un nuevo interactoma que hemos descrito con proteínas que presentan dominios PB1, tales como PKC ζ y p62/SQSTM1, así como determinar la posible implicación de esta vía en procesos de muerte celular, autofagia y estrés oxidativo y su repercusión en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Nuestros resultados muestran la presencia de una nueva región acídica en G α q, diferente a la de interacción con efectores clásicos, y el dominio PB1 de PKC ζ . Esta interacción promueve la activación de los programas de muerte celular por apoptosis e hipertrofia cardíaca. Además, hemos visto que G α q controla procesos de autofagia por un mecanismo que correlaciona con su interacción con p62 y la modulación de la vía mTORC1. Las células que carecen de G α q/11 muestran niveles de autofagia más altos tanto basales como tras la ausencia de nutrientes, así como una respuesta autófaga más temprana bajo diferentes condiciones de estrés nutricional. De forma interesante, la modulación de la autofagia por G α q/11 se correlaciona con la activación de la vía mTORC1, y las células que carecen de G α q/11 no pueden activar mTORC1, por tanto incapaces de inactivar autofagia en respuesta a dosis crecientes de suero, glucosa o aminoácidos. Por el contrario, usando el sistema DREADD-GPCR donde activamos específicamente un GPCR acoplado a G α q hemos conseguido revertir el fenotipo autófago promovido por bajas condiciones de suero a través de un mecanismo que se correlaciona con la activación de mTORC1. Finalmente, hemos observado que la proteína G α q no se degrada por autofagia, implicándola como modulador de estas vías. En general, nuestro estudio proporciona claras evidencias que muestran que G α q/11 regula la autofagia mediante la activación de la vía mTORC1, implicando a G α q/11 como nexo de unión entre la detección de nutrientes por GPCR y los procesos de autofagia. Además, estamos comenzando la caracterización de un nuevo mecanismo de regulación entre las vías de producción de ROS y los mecanismos de control de la respuesta antioxidante en los que G α q podría jugar un papel central en la regulación de la señalización a través de especies reactivas de oxígeno a través de su interacción con proteínas que regulan estas vías.

Bases moleculares de la enfermedad: biointeractómica de la muerte celular programada

Investigador Principal: Miguel Ángel de la Rosa Acosta

Centro de Investigación: cicCartuja, Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

Universidad de Sevilla-CSIC.



La disfunción mitocondrial favorece la aparición de patologías humanas, tales como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas. El citocromo c (Cc) es un modulador clave del metabolismo mitocondrial y de la activación de la muerte celular programada o apoptosis. El objetivo principal de este proyecto es el análisis de la red de interacciones núcleo-citoplásmicas del Cc que regula la apoptosis.

En este cuarto año, hemos analizado la interacción del Cc con la proteína citosólica 14-3-3 ϵ , un inhibidor del factor apoptótico Apaf-1. Nuestros hallazgos muestran cómo la interacción del Cc con 14-3-3 ϵ impide a esta ejercer su efecto inhibitorio, lo que revela la existencia de un doble mecanismo de activación de Apaf-1 (Elena-Real et al., 2018).

Producción Científica

4

Artículos generados en revistas

6

Comunicaciones en congresos nacionales

8

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

4

Comunicaciones en congresos nacionales

7

Comunicaciones en congresos internacionales

En relación a las interacciones del Cc en el núcleo, nuestros estudios nos han permitido elaborar una hipótesis sobre el efecto del Cc en dicho orgánulo. Así, cuando los niveles de daño en ADN son bajos, el Cc viaja al núcleo, impide la formación de nucleosomas y permite a la maquinaria de reparación del ADN realizar su función antes de que la célula inicie la ruta apoptótica. Sin embargo, cuando el daño al ADN persiste o aumenta, la concentración de Cc nuclear aumenta, bloquea completamente la remodelación del ADN y dispara la apoptosis (Díaz-Moreno et al., 2018).

Finalmente, las interacciones del Cc con sus dianas pueden verse afectadas por fosforilación post-traduccional del propio Cc. De hecho, durante la respuesta neuroprotectora inducida por insulina tras una lesión cerebral isquémica, el Cc aparece fosforilado en su tirosina 97. Hemos determinado que la disminución en la muerte neuronal está directamente relacionada con cambios significativos en el metabolismo mitocondrial, incluida una menor activación de la apoptosis, debidos a la presencia de Cc fosforilada (Guerra-Castellano et al., 2018).

4. EXOSOMAS: LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR COMO ARMA TERAPÉUTICA



Estudio de la biogénesis intracelular y de la biodistribución tisular de los exosomas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos

Investigador Principal: Juan Manuel Falcón Pérez

Centro de Investigación: Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (CIC bioGUNE). Vizcaya.



Las células del organismo secretan distintos tipos de vesículas al medio extracelular denominadas vesículas extracelulares (VEs) que incluyen exosomas y microvesículas, y presentan un alto potencial terapéutico, como vehículos para liberar de manera controlada material genético y fármacos.

Este proyecto tiene como objetivo determinar la biodistribución de las vesículas extracelulares dentro de un organismo e identificar los mecanismos que determinan la especificidad de estas vesículas. Durante 2017 hemos obtenido preparaciones de exosomas de varios tipos celulares emulando condiciones normales y patológicas y analizado, mediante metabolómica, la influencia de estos exosomas sobre la composición de fluidos biológicos como la sangre. Los resultados de estos experimentos han mostrado que los exosomas alteran el metabolismo de la arginina e influencian la función endotelial.

En colaboración con el Dr. Reichardt hemos caracterizado la glicosilación de superficie presente en estos exosomas. También se han puesto a punto técnicas de marcaje de exo-

Producción Científica

8

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

4

Comunicaciones en congresos internacionales

somas para estudiar la captura de los mismos por distintos tipos celulares. Estas técnicas han permitido observar que la alteración de la glicosilación de superficie afecta la internalización de VEs por parte de un panel de distintos tipos celulares.

En colaboración con la Dra. Guerrero, se ha observado que los citonemas que emanan de las células receptoras también tienen un papel clave durante la formación del gradiente morfogenético de Hedgehog. Estos resultados indican que estas estructuras celulares pueden jugar un papel importante en la recepción celular de los exosomas, y en el mecanismo que define el tropismo de estas vesículas.

Por último, en colaboración con el grupo del Dr. Llop hemos realizado varios experimentos para reforzar el estudio de la biodistribución de exosomas de origen hepático mediante su inyección en ratones.

En resumen, los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que los cambios generados en la glicosilación de superficie modifican el tropismo de los exosomas.

Exosomas: nuevos comunicadores intercelulares y su aplicabilidad como agentes terapéuticos en enfermedades parasitarias desatendidas

Investigador Principal: Hernando A. del Portillo Obando

Centro de Investigación: ISGLOBAL, Barcelona.



La malaria causada por *Plasmodium vivax*, la enfermedad de Chagas (causada por *Trypanosoma cruzi*) y la fasciolosis (causada por el helminto *Fasciola hepatica*) son tres enfermedades tropicales olvidadas, responsables de millones de infecciones en todo el mundo. Nuestro proyecto se centra en la caracterización molecular de vesículas extracelulares (exosomas) de origen endocítico, en sangre periférica durante infecciones naturales, y de aquellos derivados de reticulocitos, como una nueva plataforma para la elaboración de vacunas para estas enfermedades.

Durante este último año del proyecto se ha conseguido un resultado muy significativo ya que hemos demostrado que los exosomas derivados de reticulocitos humanos tienen moléculas capaces de presentar antígenos al sistema inmunitario y que las mismas son captadas activamente por células dendríticas. Por tanto, estos exosomas tienen la maquinaria necesaria para convertirse en una nueva plataforma de vacunas, hipótesis original del proyecto (Díaz-Varela et al., 2018 Sci Rep).

Actualmente, se están haciendo ensayos funcionales con células dendríticas obtenidas de bazo humano de donantes de trasplante, así como se ha iniciado una colaboración con grupos de áreas endémicas para recolectar células T y sus exosomas de plasma para demostrar la capacidad de presentar antígenos de malaria. También se han concluido experimentos sobre la distribución *in vivo* de los exosomas derivados de plasma de *P. vivax*, *F. hepatica* y *T. cruzi*, y se ha demostrado que los exosomas de infecciones naturales de malaria vivax inducen cambios transcripcionales en células de bazo humano que favorecen adherencia celular.

En el caso de *F. hepatica*, de las 42 proteínas parasitarias, identificadas por espectrometría de masas, en el plasma de vacas infectadas, cuatro de ellas identificadas con alto grado de fiabilidad han sido escogidas para su validación y estudio. Se han conseguido clonar los genes que las codifican en vectores para su expresión en el sistema libre de células de germe de trigo y su posterior uso como nuevas vacunas y/o biomarcadores. Asimismo, en colaboración con los Dres. Julio López Abán y Antonio Muro, de la Universidad de Salamanca, se ha realizado un ensayo de vacunación en modelos murídios usando exosomas derivados de plasma de vacas infectadas.

En el caso de *T. cruzi*, se ha estudiado la acción de dichas exovesículas sobre cultivos celulares, comprobándose cómo ejercen una acción directa sobre el citoesqueleto de dichas células, actuando directamente sobre las proteínas Rho induciendo su fosforilación. Por otra parte, los estudios de proteómica han puesto de manifiesto cómo las EVs procedentes de formas infectantes poseen al menos 7 isoformas de Transialidasas mientras que las de las formas no infectivas tan solo 3.

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

7

Comunicaciones en congresos nacionales

12

Comunicaciones en congresos internacionales

Optimización de exosomas para su uso en terapia. Papel de los microdominios ricos en tetraspaninas en la biogénesis y función de los exosomas

Investigadora Principal: María Yáñez Mó

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.



Los exosomas tienen gran potencial terapéutico y diagnóstico debido a su capacidad de mediar la transferencia horizontal y sistémica de material genético y proteico y como biomarcadores no invasivos de enfermedad. Sin embargo, todavía no se conocen al detalle los mecanismos moleculares que determinan su biogénesis, su adhesión y captación por la célula diana, o su función. Las tetraspaninas, formadoras de microdominios adherentes en la membrana plasmática, son de las proteínas más abundantes de la superficie de los exosomas. En este proyecto hemos hecho uso de nuestra gran batería de herramientas frente a las tetraspaninas para estudiar su papel funcional en la biogénesis y captación de los exosomas. Esta información es crucial para la optimización de las terapias basadas en estas vesículas exocíticas. A lo largo del proyecto hemos comprobado el efecto bloqueante de péptidos citopermeables frente a tetraspaninas en la secreción de exosomas, así como la variación en su composición. La alteración en la dinámica de maduración de los endosomas mediante el tratamiento con los péptidos produce una reducción de la proliferación celular, que se refleja en un efecto terapéutico de los péptidos en un modelo *in vivo* de melanoma. En un modelo de infección por HIV la afectación de la función endosomal, producida por los péptidos bloqueantes, afecta a la degradación de SAMHD1, una enzima asociada a los microdominios de tetraspaninas que regula el aporte de dNTPs en la célula. Por último, hemos desarrollado y optimizado un medio de cuantificación sensible y compatible con abordajes de *screening*, para medir la captación de exosomas por parte de la célula diana.

Producción Científica

5

Artículos generados en revistas

15

Comunicaciones en congresos internacionales

5. SEGURIDAD ALIMENTARIA Y BIOTECNOLOGÍA



Proteómica avanzada y biología de sistemas para el estudio de la alergia alimentaria

Investigadora Principal: Mónica Carrera Mouríño

Centro de Investigación: Instituto de Investigaciones Marinas (IIM). CSIC. Vigo.

El presente proyecto de investigación es una propuesta interdisciplinaria y multidisciplinaria en donde las actuales técnicas de Proteómica Avanzada y las novedosas herramientas



de Biología de Sistemas son aplicadas con la finalidad de desarrollar nuevas técnicas de control e inmunoterapia para el control y tratamiento de la alergia al pescado. Revisión sobre el tema publicada por Carrera et al., *Curr. Opin. Food Sci.* 2018, 22: 9-16.

Durante el año 2018, se ha desarrollado una novedosa metodología para la detección rápida de alérgenos de pescado (parvalbúminas) y de los Anisakis en cualquier producto alimenticio, mediante la aplicación de la tecnología "PaperSpray" acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive. Con esta nueva metodología se logra la detección rápida de alérgenos de pescado en sólo 15 minutos. Es la metodología más rápida descrita hasta el momento y se está preparando un artículo científico para su publicación.

Se ha desarrollado también un estudio de la aplicación de tecnologías de Altas Presiones para la reducción de la estabilidad de los alérgenos de pescado en los productos alimenticios.

También se ha hecho un estudio Proteómico cuantitativo de las larvas L3 y L4 de *Anisakis simplex*, donde se han identificado nuevos alérgenos en las distintas fases larvarias que están siendo objeto de estudio.

Asimismo, se ha continuado con el estudio pormenorizado del mapeo de epítopos B lineales para los alérgenos de pescado y de los Anisakis de forma in-silico utilizando programas bioinformáticos y mediante estrategias de Proteómica Shotgun. Se propusieron 4 vacunas peptídicas para la alergia al pescado que actualmente están en fase de validación utilizando modelos animales (ratones).

Detección y eliminación de aminas biógenas en alimentos: diseño de nuevos biosensores y nuevos catalizadores de amino oxidadas

Investigadora Principal: Gloria Fernández Lorente

Centro de Investigación: Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL). CSIC-UAM.



Las aminas biógenas (AB) son compuestos tóxicos presentes en alimentos fermentados (p.e. vino) que provocan problemas de salud y alteran las propiedades organolépticas del alimento. La amino oxidasa (AO) degrada estos compuestos en aldehídos inócuos, amoniaco y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, el H_2O_2 producido es un problema de relevante importancia ya que puede inactivar a la AO, dificultando su posible reutilización, y modificar otros componentes presentes en la matriz del alimento. En estos casos, la rápida eliminación del H_2O_2 liberado mediante catalasas (CAT) es un proceso clave. La mejor manera de conseguir dicho objetivo sería la co-inmovilización y co-localización de AO y CAT dentro del mismo soporte poroso para la eliminación del H_2O_2 producido en la reacción de degradación de AB.

El objetivo principal será la búsqueda de una catalasa lo más activa posible que nos permita su colocalización junto a una amino oxidasa de *Pisum sativum*, y optimizar la relación AO/CAT usada para minimizar la liberación de H_2O_2 al medio. Así, inmovilizamos primero la AO de manera lenta, para conseguir una distribución homogénea dentro del soporte. Luego, co-inmovilizamos la CAT, de manera que logramos la co-localización de ambas. Evaluamos la efectividad en la eliminación instantánea de H_2O_2 de diferentes derivados inmovilizados con diferentes relaciones AO/CAT.

Evaluamos dos catalasas modificadas diferentes, procedentes de *Aspergillus niger* y *Bordetella pertussis*, y elegimos esta última debido a sus características físicas, tamaño y a su actividad específica. Con esta catalasa, elaboramos un derivado colocalizado AO/CAT de relación 10/60 que logró liberar solamente un 8% de H_2O_2 al medio. Este resultado es comparable con el obtenido anteriormente con un derivado colocalizado AO/CAT 1.25/25mg, donde usamos catalasa de hígado bovino. Por tanto, conseguimos aumentar 10 veces la cantidad de AO utilizada, mejorando el proceso de degradación de AB.

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

5

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

Eliminación de disruptores endocrinos para mejorar la seguridad alimentaria

Investigador Principal: José Luis García López

Centro de Investigación: Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). CSIC. Madrid.



Entre los micro-contaminantes presentes en el agua regenerada destacan los disruptores endocrinos (EDC) que causan graves problemas en la salud humana y animal. El conocimiento sobre los organismos degradadores de EDC es aún muy limitado y cualquier aproximación biotecnológica para la depuración de aguas pasa por el estudio en mayor profundidad de las rutas microbianas de degradación de estos contaminantes. El proyecto ha abordado dos grandes objetivos cuyos principales resultados se resumen a continuación:

Objetivo 1. Degradación de EDC esteroídicos.

Mediante una combinación de herramientas ómicas (genómica y transcriptómica) y estudios de mutagénesis dirigida se han caracterizado distintos agrupamientos génicos implicados en la degradación del estradiol, de compuestos esteroídicos C19, como la testosterona, y de los ácidos biliares en la bacteria *Novosphingobium tardaugens* ARI-1. Por otro lado, se ha confirmado que la cepa ARI-1 es capaz de utilizar colesterol aeróbicamente como única fuente de carbono y energía, una capacidad muy poco frecuente en bacterias. El análisis transcriptómico hace pensar que el metabolismo del colesterol discurre por un mecanismo diferente a los conocidos hasta la fecha.

Objetivo 2. Degradación de EDC aromáticos (ésteres de o-ftalatos).

Se ha caracterizado el primer transportador TRAP de o-ftalato en bacterias. Dicho transportador se ha incorporado a una casete sintética pht que contiene los genes para la degradación de o-ftalato a través de una nueva ruta periférica que genera el intermediario central benzoil-CoA. La nueva casete se ha utilizado con éxito para expandir el potencial degradador de organismos bien caracterizados e incapaces de degradar o-ftalato. Por otro lado, se ha implementado la casete pht con genes que codifican mono- y di-esterasas capaces de hidrolizar los mono- y di-ésteres de ftalatos, lo que permitirá el desarrollo de cepas recombinantes capaces de degradar ésteres de ftalatos tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Desarrollo de procesos biotecnológicos para la producción de “building blocks” y glicopolímeros de alto valor añadido con aplicaciones biomédicas

Investigador Principal: José Miguel Palomo Carmona

Centro de Investigación: Instituto de Catálisis y Petroleoquímica. CSIC. Madrid.



El proyecto tiene como objetivo principal la preparación de nuevos glicopolímeros sintetizados mediante la aplicación de una estrategia biotecnológica partiendo de un sustrato barato como es la glucosa. Los objetivos específicos son i) obtener biocatalizadores optimizados; ii) aplicarlos en la obtención de glicoderivados y estos últimos, a su vez, en la producción final de glicopolímeros diseñados a medida.

Los resultados objetivos durante este proyecto se resumen a continuación:

En el primer año hemos desarrollado las bases biotecnológicas para la obtención de 2-deoxiglucosa y 6-hidroxi-glucosatetraacetato a escala de multimiligramos.

En el segundo año se abordó la activación de la glucosa 6-OH obtenida con grupo tricloroacetamidilo (TCA). Además, mediante migración al variar el pH se obtuvo también el 3-OH el cual también fue activado como TCA, obteniéndose dos “building blocks” muy valiosos para la obtención de glicopolímeros.

Dentro del estudio de nuevas enzimas, se consiguió obtener un resultado excelente con la lipasa de ROL producida en *Pichia pastoris*. Esta, tras su adsorción selectiva en un soporte hidrofóbico fue completamente selectiva y específica en la producción de 3-OH lactal, un building block muy interesante en producción de glicosidos con actividad antitumoral.

Por último, se abordó la primera generación de glicopolímeros, partiendo de dextrans

Producción Científica

10

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

6

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

16

Artículos generados en revistas

9

Comunicaciones en congresos internacionales

funcionalizados (diferentes tamaños) con ácidos asparticos y posteriormente derivatizados con nuestro 6-OH con resultados prometedores en citotoxicidad. A partir de estos resultados, en el tercer año hemos diseñado una nueva generación de glicopolímeros, variando la cantidad de moléculas de glucosa 6-OH, funcionalización previa del polímero, etc., obteniendo valores interesantes en citotoxicidad y actividad antiviral. Por último, tras la optimización realizada se ha desarrollado un nuevo tipo de glicopolímero funcionalizado con un fluoroforo el cual ha sido evaluado en localización celular completando así los objetivos planteados en el presente proyecto.

Desarrollo de plantillas biomiméticas de base proteica económica mente viables para su uso en regeneración de tejido óseo

Investigador Principal: Juan Manuel Russo Beiras

Centro de Investigación: Facultad de Física. Universidade de Santiago de Compostela.



El objetivo general de este proyecto era reproducir y optimizar el proceso de deposición de cristales de hidroxiapatita (HA) sobre colágeno mediante sistemas directores para obtener materiales de alta calidad para la regeneración ósea. Dicho objetivo conlleva una doble vertiente: por un lado, buscar los materiales y la metodología que mejor se adapta a nuestras necesidades y por el otro desarrollar técnicas y modelos computacionales para optimizar dicho proceso.

La revisión crítica de las rutas y estrategias ya conocidas para la síntesis de cristales de HA suministró una importante base de datos con la que desarrollar un método computacional que nos permita predecir a priori las propiedades del material a partir de los constituyentes y las condiciones experimentales. Basándonos en métodos QSPR (Quantitative Strucutre Properties Relationships) desarrollamos el primer modelo de este tipo que combina teoría de perturbaciones (PT) y las ideas LFER (Linear Free Energy Relationships) y que permite predecir los efectos de variaciones sobre nueve propiedades (T, concentración...) diferentes de los sistemas a estudiar.

Otra forma de optimizar el proceso de regeneración y crecimiento de HA es mediante imágenes de microscopía. Tradicionalmente se hace de forma manual con los riesgos que eso conlleva. Para automatizar esta parte, desarrollamos un software que permite determinar automáticamente las propiedades más importantes de los materiales (longitudes, ángulos, rugosidad) a través de las imágenes de forma automática y eficiente y cuyo uso es totalmente accesible a través de nuestro servidor. Además, hemos desarrollado una nueva técnica eficiente y versátil de fabricación de microhidroxiapatita mediante dispositivos microfluídicos.

Con estas herramientas hemos sido capaces de optimizar las propiedades morfológicas y mecánicas de estructuras fibrosas de colágeno, HA y ácido tálico. Demostramos cómo la distribución homogénea de HA da como resultado un mayor nivel de renaturalización de colágeno, incrementando su resistencia mecánica. También se observó un efecto positivo sobre el crecimiento epitaxial de la deposición de fase mineralizada, produciendo un crecimiento de esta fase en forma, composición y orientación equivalente a la que presenta la fase mineral de los tejidos calcificados.

Avances metodológicos para la obtención de biocidas naturales de uso alimentario basados en extractos de *Mentha sp.*

Investigadora Principal: Ana Cristina Soria Monzón

Centro de Investigación: Instituto de Química Orgánica General. CSIC. Madrid.



El presente proyecto tiene como objetivo principal el desarrollo de una metodología integradora que permita seleccionar el método de extracción y quimiotipo más adecuado para la obtención de extractos de menta (*Mentha sp.*) con actividad antimicrobiana, antioxidante, etc, de potencial uso como biocidas naturales y/o conservantes de uso alimentario. La comparación en cuanto a rendimiento y bioactividad de los extractos obtenidos por diversas técnicas avanzadas de extracción permitió seleccionar el método por extracción asistida

Producción Científica

17

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

5

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

20

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

19

Comunicaciones en congresos internacionales

con microondas (MAE: 100°C, 17,5 min, 1 g muestra : 12 mL agua, 1 ciclo) como el óptimo para su aplicación al elevado número de muestras requerido para el estudio de quimiotipos, que actualmente se está completando, y cuyos resultados serán de gran relevancia para la estandarización de extractos a escala industrial.

Además, el empleo de agua como disolvente extractante hace de la metodología desarrollada un método respetuoso con el medioambiente y de bajo coste para su potencial aplicación a escala industrial. Por otro lado, se han desarrollado y validado diversas metodologías por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS y LC-MSn) para el análisis, tanto cualitativo como cuantitativo, de los compuestos bioactivos (principalmente compuestos fenólicos) de dichos extractos. Así mismo, se ha avanzado en el desarrollo de metodologías basadas en ionización por electrospray-espectrometría de masas (ESI-MS) que permitirán la clasificación rápida y no sesgada de muestras con similar composición (quimiotipo), que serán validadas con los métodos por LC-MS previamente desarrollados. Por último, se pretende completar este estudio y relacionar composición-bioactividad con el fin de seleccionar el quimiotipo más adecuado para la obtención de extractos multifuncionales de menta con potencial aplicación en la industria alimentaria.

6. ENERGÍA RENOVABLE: MATERIALES Y PROCESOS



Nuevos fotocatalizadores basados en perovskitas híbridas halogenadas para la obtención de combustibles solares a partir de CO₂

Investigador Principal: Pedro Atienzar Corvillo

Centro de Investigación: Instituto de Tecnología Química. CSIC-Universidad Politécnica de Valencia.



El proyecto planteaba el empleo de perovskitas híbridas halogenadas como fotocatalizadores para la obtención de combustibles a partir del agua y el dióxido de carbono. Este tipo de materiales presentan distintas ventajas frente a otros materiales como la posibilidad de controlar sus propiedades electrónicas mediante la modificación de la composición de forma sencilla junto con unas propiedades de absorción excelentes. A su vez, presentan unos niveles energéticos adecuados para participar en reacciones de fotoreducción.

A pesar de las limitaciones de estos materiales frente a la humedad, se ha demostrado su capacidad para obtener hidrógeno a partir del agua llevando a cabo la reacción fotocatalítica en fase gas. Además, en la búsqueda de nuevos fotocatalizadores, también se ha conseguido incorporar compuestos organometálicos formando nuevas estructuras mediante la combinación de estructuras 2D y 3D y modificando el catión orgánico. Esta estrategia va

Producción Científica

7

Artículos generados en revistas

5

Comunicaciones en congresos nacionales

3

Comunicaciones en congresos internacionales

a permitir la incorporación de otros huéspedes que puedan mejorar la actividad catalítica. También, dentro de la familia de materiales híbridos, se han explorado otro tipo de materiales basados en clústeres metálicos de molibdeno obteniendo un material híbrido con una actividad catalítica elevada. Finalmente, destaca que durante el desarrollo del proyecto se ha diseñado una técnica que permite estudiar las propiedades ópticas y eléctricas sobre cristales individuales de tamaño micrométrico.

Producción eficiente de combustibles solares mediante el desarrollo de nuevas perovskitas con capacidad redox para la disociación termoquímica de CO₂ y H₂O

Investigador Principal: Juan Manuel Coronado Carneiro

Centro de Investigación: Instituto IMDEA Energía.



Aunque la energía solar es ya una realidad tangible para la producción de electricidad sostenible, su empleo para la síntesis de combustibles solares es aún un desafío tecnológico para el que no existe todavía una solución ideal. Los ciclos termoquímicos con óxidos redox constituyen una de las vías más prometedoras para almacenar la energía solar en forma de energía química.

En este campo se enmarca el proyecto SOLARKITE, cuyo objetivo principal es desarrollar óxidos mixtos con estructura perovskita, ABO₃ como portadores de oxígeno para mejorar la eficiencia de la disociación de H₂O y CO₂ mediante energía solar de concentración. La selección de óxidos mixtos con estructura perovskita se debe a su estabilidad estructural a altas temperaturas y su flexibilidad química, que permite adaptar las propiedades de estos materiales para su utilización en este proceso redox cíclicos.

En el transcurso de este proyecto se han obtenido resultados muy prometedores con los materiales La_{0.6}Sr_{0.4}Mn_{1-y}Al_yO_{3-δ}, que han demostrado una elevada eficiencia para la producción de CO a temperaturas por debajo de 1200°C. Asimismo, se han conseguido producciones muy elevadas de gas de síntesis en ciclos mixtos de disociación de CO₂ con un aporte de metano empleando perovskitas La_{1-x}SrxFeO₃ a 850 °C. Estos estudios han mostrado la relevancia de procesos como la descomposición de metano y la reacción de Boudouard en la reactividad de estos sistemas. Otro aspecto relevante que se abordó en la última fase del proyecto fue la posibilidad de mejorar la reactividad del componente redox combinándolo con sólidos con la estabilidad térmica adecuada y elevada conductividad iónica. Los ensayos realizados con La_{1-x}SrxFeO₃ soportados en YSZ confirman el interés de esta estrategia para incrementar el rendimiento de gas de síntesis. Estos resultados permiten concluir que las perovskitas redox son una opción destacada para ciclos termoquímicos de producción de combustibles solares.

Baterías de flujo redox libre de metales para el almacenamiento de energías renovables. (BAT-LIMET)

Investigadora Principal: Cristina Flox Donoso

Centro de Investigación: L'Institut de Recerca en Energia de Catalunya (IREC). Barcelona.



Los sistemas de almacenamiento de energía electroquímico (baterías y condensadores) se encuentran en un proceso de expansión global ante su importante papel en la integración de energías renovables, implementación de "smart-grid" y electrificación de zonas aisladas. En este marco, el proyecto Bat-LiMet ofrece una solución eco-sostenible, barata y eficiente, basado en baterías de flujo que utiliza especies redox activas abundantes en la naturaleza. Los principales objetivos de este trabajo son: la selección de moléculas redox activas para cada compartimento; la implementación de nuevas estrategias de medida y caracterización para predecir mecanismos de fallo (diagnosis y prognosis) y el diseño y construcción de un "stack" para su validación.

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

4

Comunicaciones en congresos nacionales

3

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

1

Comunicaciones en congresos internacionales

Inicialmente, una barrera que impide la extensa comercialización de las baterías de flujo es la baja densidad de energía que presentan, debido a la limitada solubilidad de la especie redox activa (1,6 M para sistemas de vanadio y 0,55 M para p-hidroquinona). Dentro del proyecto Bat-LiMet, se ha conseguido el aumento de la concentración de dicha especie, llegando hasta 3 M usando hidroquinonas, valores que llegan a ser 6 veces mayor que los mostrados en la literatura. Así mismo, se ha conseguido disminuir la resistencia de transferencia de carga y una mejora de la interfase electrodo-electrolito, al usar novedosos electrodos de baja polarización que han sido sintetizados dentro del proyecto. La estrategia seguida para dicha síntesis está basada en tratamientos basados en hidrotermal en combinación con tratamientos térmicos, los cuales son simples, fáciles de escalar y no suponen un coste extra elevado.

Por último, se ha conseguido ensamblar una celda basada en quinonas en medio acuoso y consecutivamente acoplarlas como un stack de alta potencia, minimizando su tamaño para la validación de los materiales.

Procesos catalizados “one-pot” para la obtención de combustibles y productos químicos, a partir de derivados del furfural provenientes de la biomasa

Investigador Principal: Alberto Marinas Aramendía

Centro de Investigación: Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba.



Uno de los grandes desafíos que afronta la sociedad es la transición de una economía basada en combustibles fósiles, como fuente de energía, a otra más fundamentada en energías renovables. Entre estas últimas destaca la biomasa que, además de energía, puede dar lugar a productos químicos de interés.

El presente proyecto de investigación tiene una doble vertiente. Por un lado, la obtención de energía a partir de la biomasa, centrándose en procesos de producción de diésel a partir de derivados del furfural mediante condensaciones, hidrogenaciones y deshidrataciones o de foto-reformado, con generación de hidrógeno. Por otro lado, la producción selectiva de alcohol furfurílico (el cual tiene importantes aplicaciones en la producción de fibras, resinas o como disolvente) vía hidrogenación del furfural. En ambos casos se plantea como reto el llevar a cabo las reacciones sin separación intermedia, mediante procesos “one-pot”.

En lo que se refiere a la obtención de energía, se ha estudiado la producción fotocatalizada de hidrógeno a partir de alcoholes C2 y C3 (puros o mezclas), empleando sistemas metálicos soportados M/TiO_2 ($M=Pt, Pd, Au$). Los monoalcoholes puros, producen significativamente más hidrógeno que los polialcoholes. En mezclas, la presencia minoritaria de polialcoholes, en especial los vecinales, ralentiza la descomposición de los monoalcoholes, debido a su mayor adsorción. Por otra parte, se ha abordado la condensación de furfural y acetona, obteniéndose buenos resultados al producto de condensación de 2 moléculas de furfural con una de acetona, sobre hidrotalcitas.

En cuanto a la reducción quimioselectiva del furfural a alcohol furfurílico usando propano-2-ol como dador de hidrógeno, los mejores rendimientos correspondieron al empleo de catalizadores basados en ZrO_2 , debido probablemente a la existencia de pares de centros ácido-básicos. Los sistemas sintetizados por el método de microemulsión, condujeron a mayores selectividades, lo que puede deberse a que la presencia residual de surfactante favorece la adsorción del furfural por el grupo carbonilo.

Producción Científica

5

Artículos generados en revistas

8

Comunicaciones en congresos nacionales

7

Comunicaciones en congresos internacionales

7. MATERIALES SUPERCONDUCTORES DE ALTA TEMPERATURA



Materiales Superconductores de (muy) alta temperatura crítica

Investigador Principal: Miguel Ángel Alario y Franco

Centro de Investigación: Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense. Madrid.



El objetivo de este proyecto era obtener y estudiar materiales superconductores de muy alta temperatura crítica con fórmula general $TM_xCu_{1-x}Sr_2TRCu_2O_{8-\delta}$ (TM : Mo, Fe; RE: Tierra Rara), también conocidos como cupratos M-1212. Mediante oxidación no convencional, hemos modificado la composición para establecer correlaciones entre los cambios estructurales y las propiedades superconductoras resultantes, en particular la temperatura crítica T_c .

Aunque el sistema $Mo_{0.3}Cu_{0.7}Sr_2RECu_2O_y$ no muestra superconductividad cuando se sintetiza al aire, al ser tratado en corriente de oxígeno u ozono a baja temperatura se obtiene una T_c de 30K que aumenta casi tres veces hasta 86K a alta presión de oxígeno. Por otro lado, la T_c para el sistema $FeSr_2RECu_2O_y$ se incrementa desde 30K hasta 70K tras un recocido en ozono.

En ambos sistemas Fe-1212 y Mo-1212, hemos observado una contracción anisotrópica de la celda unidad con la oxidación, que resulta de una distancia más corta entre capas superconductoras a expensas de una mayor entre bicapas, acompañando al aumento de la temperatura crítica. Merece destacarse que esta tendencia observada dentro de una familia concreta de cupratos con la oxidación, es opuesta al comportamiento observado entre diferentes familias. Estos parámetros estructurales están estrechamente relacionados con el proceso de transferencia de carga y, como resultado, con la inyección de huecos para la conducción de corriente eléctrica. Se ha observado también que un aumento en los radios de las tierras raras da lugar a un cierto desorden composicional, lo que resulta en un impedimento de la transferencia de carga desde las cadenas a los planos superconductores. Con respecto a la distribución de carga, el estudio XPS del sistema Mo-1212 sugiere un equilibrio de óxido-reducción entre los dos metales de transición en el bloque de reserva de carga: $Mo^{V/VI} \leftrightarrow Cu^{III/II}$. Sin embargo, en el sistema de hierro, los datos de espectroscopía de pérdida de energía de electrones (EELS) sugieren un aumento en el estado de valencia del hierro después de la oxidación del ozono, mientras que la valencia del cobre permanece casi constante.

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

7

Comunicaciones en congresos nacionales

9

Comunicaciones en congresos internacionales

Superconductividad de alta temperatura en materiales de hierro

Investigadora Principal: Elena Bascones Fernández de Velasco

Centro de Investigación: Instituto de Ciencias de Materiales de Madrid (ICMM). CSIC.
Madrid.



El proyecto persigue entender las propiedades y el origen de la superconductividad en los superconductores de hierro, la segunda familia de superconductores de alta temperatura. Se cree que la superconductividad está relacionada con la fuerte repulsión electrónica, las interacciones magnéticas y la tendencia a exhibir fases electrónicas anisótropas. En estos sistemas las propiedades electrónicas vienen controladas por varios orbitales atómicos. En este proyecto buscamos comprender la relación que hay entre la repulsión electrónica, las propiedades magnéticas, superconductivas y orbitales de los superconductores de hierro. Gran parte de nuestro esfuerzo se ha centrado en comprender la naturaleza e intensidad de las correlaciones electrónicas y el origen y propiedades de la misteriosa fase nemática, una fase anisótropa que precede al magnetismo, excepto en el compuesto FeSe. Hemos analizado el efecto de las correlaciones electrónicas en los superconductores de hierro. A partir de los resultados hemos propuesto la búsqueda de superconductividad de alta temperatura en compuestos basados en cromo. En el análisis del estado anisótropo hemos visto que la interacción de Hund no produce esta fase pero afecta de forma dramática al tipo de orden que puede estabilizarse y a las propiedades de baja energía. Por otro lado, hemos visto que es crucial incluir las propiedades orbitales en los modelos de fluctuaciones de spin que sí pueden explicar esta fase. El grado orbital afecta a la estabilidad de la fase nemática respecto a la magnética, a la anisotropía del gap superconductor y de la conductividad en el estado normal. Durante el proyecto se ha descubierto superconductividad no convencional en nuevos materiales: BaFe₂S₃ un nuevo tipo de superconductores de hierro de carácter cuasi-unidimensional y las bicapas de grafeno rotadas. Hemos estudiado la intensidad y naturaleza de las correlaciones electrónicas, claves para entender la superconductividad.

Producción Científica

5

Artículos generados
en revistas

4

Comunicaciones en
congresos nacionales

9

Comunicaciones en
congresos internacionales

XVIII CONCURSO NACIONAL

De 2 de marzo de 2017 a 2 de marzo de 2020

1. ENFERMEDADES RARAS



Función de la E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 en la fisiopatología del síndrome del cromosoma X frágil. Posible aplicación terapéutica

Investigadora Principal: Ángeles Almeida Parra

Centro de Investigación: Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).



El síndrome del cromosoma X frágil (FSX) es la causa genética más frecuente de discapacidad intelectual hereditaria y trastornos del espectro autista. Está causado por la mutación en el gen *FMR1*, provocando la pérdida o reducción de la expresión de proteína de unión selectiva al RNA, FMRP, lo que se ha relacionado con una mayor o menor severidad de la discapacidad intelectual.

Nuestro grupo ha descrito que la E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 desempeña un papel clave en el desarrollo postnatal del cerebro. FMRP contiene secuencias consenso de degradación reconocidas por Cdh1, lo que le convierten en un potencial candidato de APC/C-Cdh1. El objetivo fundamental del proyecto es el estudio de la función de APC/C-Cdh1 en la regulación de los niveles de FMRP en el cerebro en desarrollo y su implicación en la fisiopatología del FXS.

Siguiendo el plan de trabajo planteado, hemos descrito que FMRP es un sustrato de APC/C-Cdh1. Durante la diferenciación neuronal *in vitro*, los niveles de FMRP disminuyen como consecuencia del incremento en la actividad de la ligasa. FMRP se acumuló en las neuronas carentes de Cdh1 (KO_{Cdh1}), provocando la muerte neuronal. De la misma manera, describimos que FMRP se acumula en la corteza e hipocampo de los ratones KO_{Cdh1}, lo que provoca desestructuración dendrítica y pérdida de sinapsis, lo que es compatible con neurodegeneración *in vivo*. Por tanto, Cdh1 regula los niveles de FMRP en las neuronas y, con ello, la estabilidad dendrítica y sináptica, lo que le convierte en una potencial molécula neuroprotectora. Durante los próximos años continuaremos con el estudio del eje de señalización Cdh1-FMRP *in vivo*, con el objetivo de establecer la relevancia de Cdh1 en el FXS, lo

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

que podría ser potencialmente útil para la identificación de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de esta neuropatología.

Un sistema de análisis integrado para aumentar la tasa de diagnóstico de enfermedades raras usando secuenciación masiva

Investigadora Principal: Carmen Ayuso García

Centro de Investigación: Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD, UAM). CIBERER. Madrid.



El uso de las nuevas técnicas de secuenciación masiva en el área de las Enfermedades Raras está suponiendo un incremento en la tasa de detección en pacientes y un importante impacto en el descubrimiento de nuevos genes y mutaciones implicadas. Una continua bajada de precios en este tipo de experimentos y la especial característica de estos trastornos, donde existen multitud de genes implicados, han acelerado su implantación como técnicas de diagnóstico.

El análisis de datos provenientes de secuenciación masiva es un campo muy reciente y con continuos nuevos desarrollos. Para aprovechar estos avances, que repercuten en una mayor detección de casos positivos, es necesario que el uso de dichas técnicas en el diagnóstico clínico incorpore las últimas estrategias desarrolladas. Sin embargo, no existen productos comerciales ni protocolos estándar que faciliten su implantación. El presente proyecto propone aunar esfuerzos entre el área de la bioinformática, la práctica y la investigación clínica para, a partir del desarrollo de un sistema informático flexible, personalizable y orientado al ámbito clínico, mejorar el diagnóstico de enfermedades tales como distrofias de retina, malformaciones oculares congénitas, cardiopatías congénitas y cánceres hereditarios.

Como fruto del primer/segundo año de ejecución se ha llegado a un consenso de protocolo informático que se está utilizando para el análisis de casos que resultan negativos en un primer análisis por medio de un protocolo comercial. Dicho protocolo interno está en continuo desarrollo y está mejorando la detección de variantes patogénicas en pacientes con una enfermedad rara.

Análisis sistemático de la red de regulación genética implicada en la especificación y mantenimiento del epitelio pigmentado de la retina: hacia nuevas terapias para las enfermedades neurodegenerativas de la retina

Investigadora Principal: Paola Bovolenta Nicolao

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid.



La pérdida de visión debida a la neurodegeneración a menudo se asocia con alteraciones en el epitelio pigmentado de la retina (RPE). El reemplazo de las células del RPE es, por lo tanto, una estrategia terapéutica muy prometedora. Actualmente, sin embargo, diversos obstáculos técnicos dificultan la obtención de células adecuadas para el remplazo terapéutico. Esto es debido en gran parte a que solo conocemos parcialmente las redes genéticas reguladoras (GRN) involucradas en la especificación y el mantenimiento del RPE.

Nuestro proyecto, enfocado en llenar este vacío conceptual, ha avanzado sustancialmente en esta dirección. Para ello hemos aplicado en pez cebra análisis genómicos comparativos, RNAseq y ATACseq, tanto para progenitores no especificados como para los dominios de retina neural (NR) y RPE. Con esta estrategia, hemos identificado grupos bien definidos de factores de transcripción, que marcan los estados transcripcionales del RPE y NR a lo largo del tiempo. Un primer grupo actúa muy temprano en el desarrollo y es esencial para la especificación inicial, y un segundo sostiene la adquisición de la identidad molecular principal de los dos tejidos. La identificación de regiones de cromatina, diferencialmente abiertas entre los dos tejidos, apoya este proceso diferencial y escalonado y muestra además que el RPE es más activo transcripcionalmente que la NR. Una posible interpretación de este análisis, aún en curso, es que la identidad de NR se configura más fácilmente al "restringir" el destino de los progenitores no comprometidos con adaptaciones menores de la GRN del campo morfogenético del ojo. Por el contrario, la adquisición de la identidad de RPE

Producción Científica

6

Artículos generados en revistas

22

Comunicaciones en congresos nacionales

6

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

5

Artículos generados en revistas

4

Comunicaciones en congresos nacionales

9

Comunicaciones en congresos internacionales

requiere cambios más dramáticos en los que la GRN inicial debe experimentar cambios transcriptómicos y epigenómicos más profundos para "modificar" el destino celular. De forma algo inesperada, también observamos que los programas de desarrollo de NR y RPE son mutuamente excluyentes, con grupos de factores de transcripción ejerciendo represión cruzada. La mutagénesis CRISPR / Cas9 FO en curso -para genes seleccionados en base a su expresión diferencial entre dominios, su anotación ontológica, su patrón de expresión, y el número de parálogos asociados a los mismos- debe validar nuestro análisis y modelo propuesto. Esto, a su vez, nos guiará para trasladar la información obtenida hacia su aplicación en estudios preclínicos relevantes.

Disqueratosis congénita. Nuevos modelos, nuevas claves moleculares y nuevos tratamientos

Investigadora Principal: María Luisa Cayuela Fuentes

Centro de Investigación: Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias-Arrixaca.



La Disqueratosis congénita (DC) es una enfermedad rara causada por mutaciones en el complejo Telomerasa o en el complejo Shelfterin, como consecuencia los pacientes sufren acortamiento telomérico. La causa principal de muerte prematura es debida al fallo en la hematopoyesis en el 85% de los casos o al cáncer en el 10%. La variabilidad y severidad de los síntomas de las diferentes mutaciones causantes de la enfermedad no se explica sólo por el acortamiento telomérico, por lo que sospechamos que estos componentes podrían estar implicados en otros procesos.

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la inhibición genética del componente de RNA de la telomerasa (TR o TERC) en el modelo de pez cebra provoca un defecto en la mielopoyesis que es independiente de la longitud telomérica y de la actividad telomerasa, lo que explica la neutropenia persistente en niños con DC. Nuestros resultados sugieren que TR actúa como un RNA largo no codificante (lncRNA) con funciones reguladoras en hematopoyesis más allá de su función en los telómeros.

Durante el desarrollo del proyecto hemos conseguido demostrar que la función de TR en mielopoyesis está conservada en humano. Hemos establecido modelos animales que mediante rescate fenotípico nos ayudarán a identificar aquellos compuestos que puedan desarrollarse como terapias. Finalmente, seguimos profundizando en los mecanismos por los que TR ejerce funciones extracurriculares en cáncer (en concreto cáncer de cabeza y cuello) y en hematopoyesis.

Bases moleculares de la deficiencia inmune en el Síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p-)

Investigador Principal: César Cobaleda Hernández

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid.



Las proteínas encargadas de establecer los patrones epigenéticos que determinan la identidad celular son esenciales para el correcto desarrollo y función del organismo. Por ello, las alteraciones en estos genes tienen profundas consecuencias para el organismo. El Síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS) es una enfermedad poco frecuente causada por la pérdida de material genético en el cromosoma 4(p). Los pacientes afectados presentan numerosos problemas,

que incluyen malformaciones, discapacidad intelectual, epilepsia y deficiencias inmunes.

De entre los genes deleticados en la región 4p, el gen WHS-candidate-1 (WHSC1), que codifica para un modificador epigenético con actividad Histona-3 K36 metiltransferasa, ha sido postulado como uno de los principales responsables de las características patológicas de los pacientes, pero su mecanismo de acción no está aún completamente caracterizado. Además, la activación ectópica o las mutaciones de WHSC1 están asociadas con tumores hematológicos como el mieloma múltiple o la leucemia linfoblástica aguda B infantil. Usando modelos de ratón modificados genéticamente que carecen de Whsc1, hemos demostrado que la falta de WHSC1 es un factor causal en las inmunodeficiencias de los pacientes

Producción Científica

4

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

3

Comunicaciones en congresos nacionales

1

Comunicaciones en congresos internacionales

con WHS. Actualmente seguimos trabajando para lograr un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares del funcionamiento de WHSC1. Hemos generado y estamos caracterizando modelos de ganancia de función para reproducir el papel de WHSC1 en las patologías tumorales hematopoyéticas en las que está implicado.

Usando diferentes tipos de aproximaciones experimentales, como trasplantes de médula ósea, queremos estudiar las propiedades de las células inmunes que expresan las formas oncogénicas de WHSC1 como aparecen en pacientes humanos. En paralelo, también estamos estudiando el DNA de pacientes con WHS para buscar si presentan alteraciones adicionales, e identificar otros posibles genes que condicione la gravedad de sus patologías.

Visualización de la arquitectura polisomal neuronal y sus alteraciones en la enfermedad de Huntington

Investigador Principal: José Jesús Fernández Rodríguez

Centro de Investigación: Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. Madrid.



La enfermedad de Huntington (EH) es una patología hereditaria que implica una neurodegeneración selectiva de las neuronas espinosas de tamaño medio del estriado y, en estadios posteriores, también de las neuronas de la corteza cerebral. En consecuencia, los pacientes sufren disfunción motora, declive cognitivo y alteraciones psiquiátricas. Actualmente no existe tratamiento efectivo para la enfermedad. Nuestra hipótesis general es que el mantenimiento de la arquitectura subcelular es esencial para la homeostasis neuronal y que el estudio de las alteraciones en dicha arquitectura puede proporcionar conocimiento sobre las bases patogénicas y posibilitar la identificación de dianas terapéuticas.

En este proyecto estamos estudiando la arquitectura de la maquinaria de síntesis de proteínas con el objetivo de identificar y caracterizar las alteraciones que presenta en la EH y explorar el potencial terapéutico de moléculas que puedan revertir estas alteraciones. Para ello, empleamos la tomografía electrónica y el procesamiento de imagen tridimensional (3D) sobre muestras de tejido cerebral que son preparadas con protocolos de óptima preservación estructural.

En este segundo año hemos profundizado en el análisis *in situ* de la organización ribosomal neuronal y hemos confirmado la existencia de alteraciones que parecen específicas de las neuronas espinosas de tamaño medio del estriado en el modelo murino de EH Q175. Estamos desarrollando y aplicando métodos para la detección automática de los ribosomas con el objetivo de realizar un análisis morfológico cuantitativo de tales alteraciones. Además, hemos desarrollado nuevos métodos de procesamiento de imagen que permiten mejorar la calidad de los tomogramas 3D y facilitar su interpretación. Para entender la relevancia de estas alteraciones en la fisiopatología de la EH, hemos obtenido perfiles de sedimentación ribosómica de muestras provenientes de animales control y modelos de EH de diferentes regiones cerebrales. Nuestros resultados sugieren que la organización polisomal es muy variable entre diferentes regiones del cerebro.

Modelización de la cavernomatosis múltiple familiar a través de reproducción celular

Investigador Principal: Miguel Ángel Fidalgo Pérez

Centro de Investigación: Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS). Universidad de Santiago de Compostela.



Las malformaciones cavernosas cerebrales familiares (FCCM, por sus siglas en inglés) son malformaciones vasculares, ubicadas principalmente dentro del cerebro que pueden causar hemorragias cerebrales, convulsiones y accidentes cerebrovasculares, o en los casos más graves, incluso la muerte del paciente. A pesar de la gravedad de las lesiones causadas por mutaciones de pérdida de función en uno de los tres genes de malformación cavernosa cerebral (CCM), los mecanismos moleculares detrás de este comportamiento desregulado de células endoteliales (EC) no se han aclarado.

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

3

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

1

Comunicaciones en congresos internacionales

En este proyecto, nuestro objetivo principal es desarrollar un modelo mejorado *in vitro* mediante el uso de células madre pluripotentes para poder descifrar el papel de cada gen CCM durante la especificación del destino celular endotelial. Durante este segundo año de nuestro proyecto, nuestros objetivos han sido: a) diseccionar nuevas funciones de los genes CCM y b) investigar los mecanismos moleculares gobernados por los genes CCM.

Notablemente, nuestros resultados muestran que si bien los genes CCM pueden ser prescindibles para la auto renovación de células madre embrionarias (ESCs) y la generación de células pluripotentes inducidas (iPSCs) a través de la reprogramación de células somáticas con los "Factores de Yamanaka" (OSKM), su función es requerida para la diferenciación temprana hacia el linaje endotelial y la formación de vasos en cultivos de 3D. Además, nuestros datos indican que la ausencia de los genes CCM altera un paisaje epigenético conservando que es necesario para la transición transcripcional durante el desarrollo inicial de células endoteliales (EC) en mamíferos. En resumen, los objetivos establecidos en el proyecto se están llevando a cabo de acuerdo con lo que se estableció en la propuesta científica original, con resultados esperanzadores que nos llevarán a identificar nuevas aproximaciones farmacológicas y nuevos enfoques terapéuticos para tratar esta grave y hasta ahora incurable enfermedad rara humana.

Inhibidores de fosfodiesterasas como tratamiento para la ataxia de Friedreich

Investigadora Principal: Pilar González Cabo

Centro de Investigación: Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER de Enfermedades Raras). Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.



Según el plan de trabajo propuesto en el proyecto, los objetivos específicos del segundo año han sido: (1) Tratamiento farmacológico en el modelo de *Drosophila*; (2) Rastreo genético utilizando la cepa de *Drosophila* con reducción de los niveles de frataxina (FH1); (3) Evaluación de la función motora de ratones deficientes en frataxina (YG8sR).

Tratamiento: El rolipram y el sildenafilo a concentración de 10 µM y 25 µM, respectivamente, recuperan la capacidad motora del modelo de FRDA en *Drosophila* que presenta una reducción del 25% respecto a las moscas control. *Rastreo genético y validación:* Para identificar la(s) vía(s) de señalización de estos compuestos en un escenario con déficit de frataxina, se ha realizado un rastreo de genes candidatos. Según resultados previos se han seleccionado 130 genes implicados en receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Utilizando interferencia del ARN, hemos determinado que la expresión disminuida de 13 genes modifica el fenotipo motor de las moscas modelo. Siete de ellos son receptores activadores del sistema fosfatidilinositol-calcio como segundo mensajero, y un octavo codifica una proteína que forma parte de los receptores de glutamato de la familia kainato, regulando la entrada de calcio celular. La reducción de la expresión de estos genes podría afectar al fenotipo motor de las moscas modelo, a través de cambios en los niveles de calcio.

Función motora en ratones YG8sR: Hemos realizado un estudio fenotípico, previo al tratamiento, del ratón Yg8sR y del control Y47 a partir del tercer mes de vida y de forma mensual. Las pruebas incluyen: rotarod, barra de equilibrio, prueba del palo, fuerza de agarre. Hasta el momento las diferencias no han sido concluyentes, por lo que el inicio en la administración de los fármacos se ha retrasado a los 9 meses de edad.

Activación de la inmunidad innata en células deficientes en disferlina: nuevas dianas terapéuticas

Investigadora Principal: Noemí de Luna Salvà

Centro de Investigación: Laboratorio de Enfermedades Neuromusculares. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. CIBER (Centro de Investigación Biomédica en Red).

Los objetivos del proyecto de investigación son:

1.- Estudiar la activación de la inmunidad innata en cultivos celulares deficientes en disferlina. Hemos desarrollado un protocolo para diferenciar la línea TE671 y caracterizar los miotubos resultantes. Con este método, la línea TE671 resultará de gran utilidad como al-

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas



ternativa al uso de células musculares humanas primarias para chequeo de medicamentos y/o investigación básica. Hemos creado un modelo celular/muscular para disferlinopatías con las mutaciones siguientes en el exón 29 del gen DYSF: c.3103_3112del, c.3112dup, c.3147T>G y c.3150C>G (secuencia de referencia NM_3494.3), que reproduce las propiedades observadas en los cultivos primarios de pacientes con disferlinopatía: como reducción de miogenina, incremento de TSP-1 y reparación de membrana deficiente.

2.- Evaluar la eficacia de diferentes tratamientos en cultivos celulares:

2.1.- Terapia farmacológica: Hemos testado inhibidores del proteosoma (Oprozomib, Ixazomib y MG-132), a diferentes tiempos y concentraciones, eligiendo las condiciones donde el efecto de la inhibición sobre el incremento de la expresión de disferlina era mayor. Hemos comprobado la inhibición del proteasoma mediante el ensayo de luciferasa de las diferentes actividades del proteasoma. En la actualidad, estamos realizando estudios funcionales en las células tratadas, para analizar si el incremento de disferlina se acompaña de mejoras funcionales.

2.2.- Terapia génica: En una línea muscular inmortalizada procedente de un paciente con dos mutaciones "missense" hemos diseñado guías de crRNA para corregir la mutación mediante CRISPR/Cas9. En la actualidad, estamos en proceso de analizar la edición génica de los clones celulares resultantes de la transfección.

2.3.- Análisis TLR4: Estamos estudiando la expresión de TLR4 en células con deficiencia en disferlina comparado con controles. Tratamos las células con reguladores de expresión del TLR4, como el LPS, antagonista LPS, TSP-1 y atorvastatina.

La conexión entre enfermedades raras y enfermedades comunes: la disfunción de la homeostasis del cobre y la mitocondria como modelo

Investigador Principal: Francesc Palau Martínez

Centro de Investigación: Instituto de Investigación Sanitaria Sant Joan de Déu y Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona.



El proyecto NeuroCobre estudia de forma comparativa los mecanismos celulares y moleculares relacionados con la disfunción del metabolismo del cobre y la mitocondria en la enfermedad de Menkes (EM)/gen ATP7A, enfermedad de Wilson (EW)/gen ATP7B y enfermedad de Parkinson (EP) familiar PARK1/gen SCNA. El objetivo es determinar los mecanismos fisiopatológicos comunes y no comunes en relación a la homeostasis del cobre y la función mitocondrial en dos enfermedades poco frecuentes (EM y EW) y en la EP.

Para ello, en primer lugar estamos caracterizando la expresión de CTR1, ATXO1, ATP7A y ATPTB en la línea neuronal SH-SY5Y y la línea endotelial HBEC-5i. Nuestros resultados en experimentos de RT-PCR muestran diferencias específicas en la expresión de los genes en ambas líneas celulares, tanto en condiciones basales como tras tratamiento con histidinato de cobre (CuHis) 200 µM.

Hemos estudiado con anticuerpos específicos (cedidos por el laboratorio del Dr. Ignacio Sandoval) la expresión basal de ATP7A y ATP7B en SH-SY5Y y HBEC-5i. ATP7A y ATP7B muestran un patrón específico para cada línea celular. En HBEC-5i, la señal de ATP7A colocaliza completamente en la red Cis-Golgi (CGN) y parcialmente en la red Trans-Golgi (TGN), mientras que SH-SY5Y muestra un patrón similar en CGN y TGN. En HBEC-5i, ATP7B muestra un patrón difuso y cierta localización en TGN, mientras que en SH-SY5Y se encuentra una localización evidente en TGN. La estimulación con CuHis promueve el tráfico ATP7A y ATP7B desde la red de Golgi hacia diferentes destinos en SH-SY5Y.

Actualmente estamos obteniendo modelos neuronales de mutaciones clínicas específicas de EM y EW, y se pretende obtener también modelos clínicos para las líneas endoteliales. En estos modelos se estudiará el efecto de las mutaciones sobre la biología de las mitocondrias, el metabolismo del cobre, la expresión de α -synucleina y el tráfico celular de las proteínas mutantes.

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

1

Comunicaciones en congresos nacionales

Mejora del diagnóstico y tratamiento en anemias diseritropoyéticas congénitas. (Proyecto CoDysAn)

Investigadora Principal: María del Carmen Sánchez Fernández

Centro de Investigación: Universidad Internacional de Cataluña UIC.



La anemia diseritropoyética congénita (ADC) es un grupo heterogéneo de trastornos hematológicos caracterizados por anemia y distintas anomalías morfológicas de los precursores eritroides en la médula ósea. Los pacientes con ADC presentan anemia congénita y crónica de grado variable con una reticulocitosis que no corresponde al grado de anemia (eritropoyesis ineficaz), ictericia y con frecuencia esplenomegalia y/o hepatomegalia. La morbilidad en ADC I, ADCII y otros pacientes con ADC que requieren transfusiones de sangre continuas puede ser importante debido a las complicaciones de la sobrecarga de hierro que pueden ser fatales si no se tratan.

Se han definido cinco tipos clásicos de ADC (I-II-III-IV y XLTDA) sobre la base de la morfología de la médula ósea. ADC tipo II es la forma más común y bien definida entre las ADC. Esta clasificación de trabajo se sigue utilizando en la práctica clínica. Sin embargo, la identificación de los genes mutados involucrados en la mayoría de los subgrupos de ADC mejorará las posibilidades de diagnóstico y permitirá una mejor clasificación de los pacientes con ADC, ya que en la actualidad, en muchos casos no se logra un diagnóstico final. Actualmente sabemos que hay varias familias que cumplen con la definición general de ADC, pero no se ajustan a ninguna de las variantes clásicas de ADC. Aunque se han realizado varios estudios sobre la genética molecular y la correlación genotipo-fenotipo en este campo, la fisiopatología de los ADC sigue siendo un problema sin resolver. Más allá de lograr un diagnóstico definitivo, conocer la base genética de los pacientes con ADC también es valioso para desentrañar la fisiopatología de estos trastornos, así como para guiar el tratamiento (según el tipo de ADC, se han establecido diferentes tratamientos).

Los principales objetivos de este proyecto de investigación y resultados son:

1. Mejorar el diagnóstico clínico de ADC mediante el uso de un panel genético de secuenciación de próxima generación. Varios paneles de genes que causan enfermedades hematológicas hereditarias se han diseñado y desarrollado en el laboratorio de la Dra. Maanya Sánchez, incluidos los 6 genes descritos en los diferentes subtipos de ADC: CDAN1, C15ORF41, SEC23B, KIF23, KLF1 y GATA1. Esto está mejorando el diagnóstico de estas enfermedades y permitirá una mejor clasificación de los pacientes en el futuro.
2. Crear nuevas herramientas de telemedicina para aumentar el conocimiento de estas enfermedades en médicos, pacientes y población general. Hemos desarrollado una página web de CODYSAN (www.codysan.eu) para la difusión del conocimiento sobre esta enfermedad y esta página incluirá un algoritmo para realizar un diagnóstico de pacientes con CDA.
3. Utilizar un método basado en la secuenciación de la próxima generación (NGS) (secuenciación del exoma) para identificar nuevos genes causantes en los casos de ADC no resueltos. Realizamos WES en dos familias con ADC que fueron negativas en estudios previos realizados por Sanger o por paneles de genes. Los resultados están pendientes de ser analizados. También el laboratorio del Dr. Achille Iolascon comenzó con el análisis WES de 6 pacientes sospechosos de CDA I. Tres de ellos fueron diagnosticados como pacientes con deficiencia de PK.
4. Caracterizar los mecanismos patogénicos que subyacen a los CDA mediante el establecimiento de modelos celulares diseñados por el sistema CRISPR / CAS9.

Astrocitos: nuevas dianas antiepilepticas en la enfermedad de Lafora

Investigador Principal: Pascual Felipe Sanz Bigorra

Centro de Investigación: Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).

La enfermedad de Lafora (LD) es un desorden neurológico raro que caracteriza por la presencia de neurodegeneración, epilepsia mioclónica progresiva y acumulación de depósitos de glucógeno aberrante insoluble en el cerebro, denominados "Lafora bodies" (LBs). Todas estas características conducen a la muerte de los pacientes alrededor de 10 años desde

Producción Científica

3

Comunicaciones en congresos nacionales

8

Comunicaciones en congresos internacionales



el inicio de los primeros síntomas. Desgraciadamente no existe todavía un tratamiento eficaz contra esta enfermedad. En el presente proyecto se propone profundizar en el conocimiento de las alteraciones presentes en los astrocitos provenientes de ratones modelo de LD, con la finalidad de identificar nuevas dianas terapéuticas de las que pueda beneficiarse la enfermedad.

Durante la duración de este proyecto hemos obtenido evidencias que indican que si bien los LBs se acumulan en las neuronas, como se había establecido originariamente, la mayoría de ellos co-localizan con marcadores astrocitarios tales como la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y la glutamina sintetasa. Además, hemos observado que cultivos primarios de astrocitos LD acumulan mayores niveles de glucógeno que los controles. Estos resultados sugieren que los astrocitos juegan un papel esencial en la fisiopatología de LD, ya que la acumulación de LBs en estas células puede afectar su funcionamiento normal, dando lugar a una posible disfunción neuronal.

En este último año hemos realizado un análisis transcriptómico de la expresión diferencial de genes en el cerebro de dos modelos de LD independientes. Nuestros resultados indican que en ambos casos se estimula la expresión del mismo conjunto de genes, codificando la mayoría de estos para mediadores pro-inflamatorios. Estos genes son de origen microglial, por lo que sugerimos que la activación de la microglía sería la etapa que iniciaría un proceso inflamatorio que conduciría al desarrollo de la enfermedad. Estos datos sugieren que la microglía sería una nueva diana terapéutica de LD.

Deficiencia en AGC1 y señalización por calcio a la mitocondria: un nuevo modelo de la enfermedad para el estudio de mecanismos patogénicos y desarrollo de estrategias terapéuticas

Investigadora Principal: Jorgina Satrústegui Gil-Delgado

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid.



La deficiencia en AGC1 es una enfermedad rara, causada por mutaciones en el gen Slc25a12/Aralar/AGC1. El modelo animal de esta enfermedad, el ratón AGC1-KO, tiene un fenotipo muy severo, y esto ha impedido testar dietas o tratamientos para la enfermedad en el ratón. Para resolver este problema se planteó la producción de un ratón con deficiencia en AGC1 y un fenotipo menos severo.

Se trataba de un ratón en el cual la proteína AGC1 mutante sólo tuviera defectos en los motivos EF-hand de unión de Calcio (AGC1-Camut). Sin embargo, como describimos en 2017, el fenotipo del mutante en homozigosis (AGC1-Camut/AGC1-Camut) es muy parecido al del AGC1-KO global, con tamaño pequeño y corta longevidad, lo cual se debe a niveles muy bajos de la proteína mutante en muchos tejidos. Con todo, algunos ratones AGC1-Camut/AGC1-Camut sobreviven hasta 4 meses, mucho más que los 21 días estándar de los AGC1-KO globales.

Hemos investigado la biogénesis de la proteína AGC1-Camut en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) inmortalizados, obtenidos de ratones control o AGC1-Camut/AGC1-Camut. Para ello hemos contado con la colaboración del laboratorio de Agnieszka Chacinska, del Centro de Nuevas Tecnologías de la Universidad de Varsovia y con la estancia de Inés Juaristi durante 3 meses en su laboratorio. Los resultados obtenidos son todavía preliminares, pero apuntan a la presencia de cambios en los componentes del sistema de importación de proteínas mitocondriales en los MEFs mutantes.

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

3

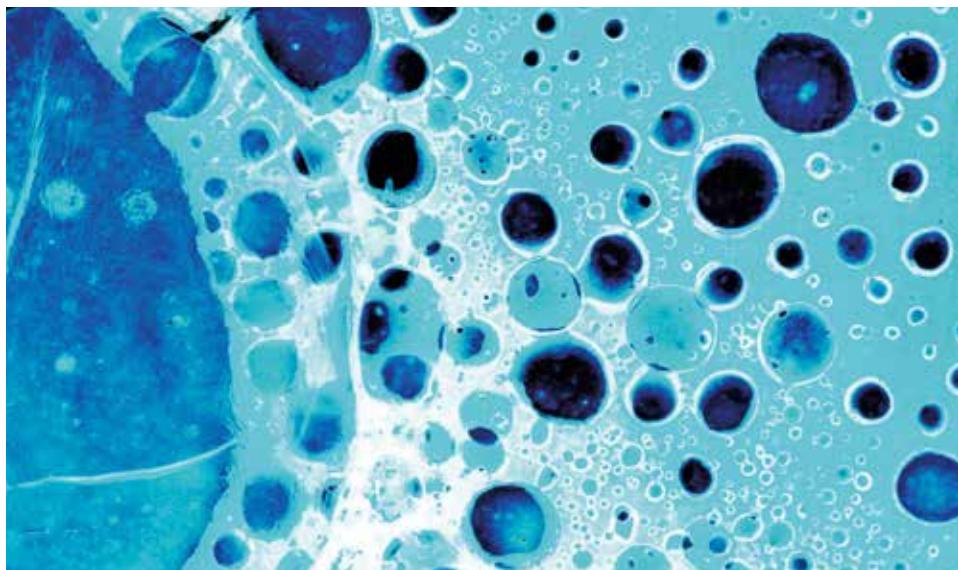
Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

2. INMUNOTERAPIA Y CÁNCER



Estudio genómico y transcriptómico de linfocitos tumorales circulantes para el desarrollo de biomarcadores asociados con la respuesta al tratamiento con inhibidores de la vía PD-L1/PD1 en pacientes con CPNM

Investigador Principal: Ángel Carracedo Álvarez

Centro de Investigación: Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica. Santiago de Compostela.



El cáncer de pulmón es uno de los más mortales en los países desarrollados. La incorporación, en el 2015, de fármacos inmunoterapéuticos para su tratamiento, ha supuesto un avance increíble para la supervivencia de estos pacientes. A pesar de esto, existe una proporción considerable de pacientes que no responden a inmunoterapia.

El objetivo principal de este proyecto consiste en estudiar el tumor primario y otros marcadores circulantes complementarios que pueden ofrecer información sobre la futura respuesta del paciente a este tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

Para ello, se realiza una toma de muestra de sangre a tres tiempos: a T0 (previo al inicio del tratamiento), T1 (3 meses) y T2 (6 meses). Estas muestras se someten a recuentos de porcentajes de linfocitos T citotóxicos PD1+ y PD1-, y a separación y aislamiento de estas poblaciones celulares mediante cell sorting.

Hasta el momento, hemos observado un porcentaje de linfocitos T citotóxicos CD8+ del 17%, dentro de los cuales un 20% son PD1+. Los análisis de las muestras T1 obtenidas muestran un incremento en la proporción de células T CD8+ en respondedores y un descenso de estas células en no respondedores entre T0 y T1+. El siguiente paso será generar los perfiles de expresión transcriptómicos de estos grupos celulares mediante RNAseq para identificar firmas de expresión en pacientes respondedores frente a no respondedores.

En paralelo, secuenciaremos ADN extraído de muestras parafinadas de tumor primario para obtener el perfil mutacional mediante la secuenciación por NGS de un panel de genes de NSCLC y carga mutacional tumoral (TMB).

Desarrollo de nuevas dianas para inmunoterapia en la metástasis tumoral

Investigador Principal: José Ignacio Casal Álvarez

Centro de Investigación: Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid.

Nuestro grupo ha identificado y caracterizado nuevas dianas implicadas en metástasis



hepática y pulmonar del cáncer colorrectal y otros tumores, concretamente la LI-cadherina (CDH17), la VE-cadherina (CDH5), el receptor α 2 de la interleuquina 13 (IL13R α 2) y la proteína PAUF. En este proyecto nos planteamos inicialmente: i) la caracterización y uso terapéutico de anticuerpos monoclonales (AM) anti-RGD de cadherinas, ii) AM anti-IL13R α 2 y iii) la clonación y expresión de las scFvs respectivas de cada anticuerpo como paso previo a su posterior humanización.

Durante la ejecución del proyecto hemos demostrado la capacidad de los AM anti-RGD de cadherina, particularmente el AM 6.6.1, para provocar una reducción significativa en las propiedades metastásicas de las células cancerosas, así como un aumento notable en la supervivencia de ratones tras la inoculación de líneas celulares de melanoma y cáncer colorrectal, que causaron metástasis en pulmón e hígado, respectivamente. En el caso de IL-13R α 2, hemos descrito un péptido de IL13R α 2 capaz de inhibir la señalización de IL-13 a través de IL13R α 2 en células de cáncer colorrectal y glioblastoma. Este péptido se ha utilizado para la preparación de AM frente a IL13R α 2. El AM 5.5.4 inhibió la invasividad de las células metastásicas y la capacidad de formación de metástasis hepática del cáncer colorrectal en ratones "Swiss nude".

Por último, se han preparado diferentes scFvs a partir del AM 6.6.1 con distintas combinaciones de las regiones variables y diferentes proteínas de fusión que nos han permitido seleccionar la mejor combinación. Actualmente, y en colaboración con las empresas ProAlt y Fusion Antibodies (UK), se está llevando a cabo la humanización del AM 6.6.1. En conclusión, disponemos de 2 AM (6.6.1 y 5.5.4) muy eficaces contra la metástasis en cáncer de colon, melanoma y, potencialmente, otros tumores. Nuestra intención es seguir avanzando en su desarrollo para su rápido traslado a clínica.

Edición genética de los principales factores de transcripción para mejorar la eficacia antitumoral de la terapia con linfocitos T

Investigador Principal: Juan José Lasarte Sagastibelza

Centro de Investigación: Centro de Investigación Médica Aplicada, CIMA. Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Pamplona.



Los objetivos para la segunda anualidad del proyecto han sido: (1) Análisis de la expresión génica de los linfocitos T modificados genéticamente para silenciar Foxp3, (2) Estudio del efecto de la edición de Foxp3 en el metabolismo de los linfocitos T CD8.

Objetivo 1. Hemos seleccionado un panel de guías y construido vectores retrovirales (RV), para la modificación genética de Foxp3 en los CD8. Hemos detectado una nueva guía que consigue hasta un 60% de silenciamiento de Foxp3 en células CD8. Hemos comparado, mediante microarray, la expresión génica de CD8 WT y CD8 Foxp3 (ko). Los linfocitos CD8 Foxp3 (ko) presentan numerosos genes sobreexpresados de las vías de la glicolisis y el ciclo celular, así como de c-Myc. Hemos encontrado que hay una serie de genes de la glicolisis regulados por Myc que se encuentran regulados al alza en células CD8 Foxp3 (ko). El papel de Foxp3 en la regulación de la expresión de c-myc y la glicolisis ha sido comprobado también a nivel proteico midiendo, por citometría de flujo, la expresión del receptor Glut1 (clave para la captación de glucosa por los linfocitos T) y c-myc.

Objetivo 2. Hemos analizado la respuesta de CD8 WT y Foxp3 (ko) al estrés mitocondrial y la capacidad de producción de ATP, utilizando el sistema Seahorse. Los datos preliminares indican que los linfocitos T CD8 Foxp3 (ko) son más energéticos (mayor producción de ATP en condiciones basales) pero presentan una menor capacidad respiratoria adicional (SRC). Este comportamiento metabólico es característico de células T efectoras, muy energéticas basalmente pero con SRC limitada, a diferencia de las células T memoria, con gran SRC que es clave para su supervivencia. Estos datos revelan un papel hasta ahora desconocido para Foxp3 en la regulación del metabolismo de los linfocitos T CD8 y su diferenciación a células efectoras.

Producción Científica

5

Artículos generados en revistas

5

Comunicaciones en congresos nacionales

4

Comunicaciones en congresos internacionales

Desarrollo y validación de un aerosol contenido nanopartículas vectorizadas, para tratamiento de carcinoma humano de pulmón

Investigadora Principal: Eva Martín del Valle

Centro de Investigación: Universidad de Salamanca.



El principal objetivo de este proyecto de investigación es desarrollar y validar una nueva forma de administración (aerosoles) para el tratamiento de cáncer de pulmón con un polímero que sea capaz de encapsular dos fármacos diferentes de cara a generar efectos sinérgicos. Para ello se prepararán y caracterizarán nanopartículas basadas en cadenas de polifructosas y cargadas con cis-platino y paclitaxel; y EGFR como sistema de reconocimiento específico.

Además, se estudiará la afinidad específica de los receptores celulares con las partículas, y se tratará de estudiar la cinética de liberación de fármacos. De igual modo, se realizarán simulaciones informáticas del movimiento de las nanopartículas en el tracto respiratorio y se terminará el proyecto con la validación del aerosol mediante ensayos *in vivo*.

Los resultados obtenidos hasta la fecha corresponden con los primeros objetivos parciales del desarrollo del proyecto. Concretamente, se han sintetizado y caracterizado correctamente las nanopartículas, y se observan partículas de unos 200 nm de tamaño con estabilidad superior a 15 días. Se ha modificado también la superficie de las partículas mediante una reacción de carboxilación, y de esta forma han podido funcionalizarse con la adición de ligandos (como EGF), para su direccionamiento específico. De igual modo, se ha procedido a la retención de cis-platino en las partículas mediante enlace covalente con los grupos carboxilos, obteniendo rendimientos de reacción superiores al 90%, y capacidades de carga en torno al 1%.

Finalmente, también se ha estudiado la interacción entre el ligando de nuestras partículas EGF y el receptor EGFR; y posteriormente, se incluyeron en la simulación las partículas junto con el ligando. Se pudieron determinar las energías de interacción que se sitúan entre -87 y -22 kcal/mol. Estos valores obtenidos por las simulaciones garantizan que las partículas sean estables durante el tiempo que durase el tratamiento.

Papel de Dido en el desarrollo linfoide y mieloide y sus implicaciones en tumores

Investigador Principal: Carlos Martínez Alonso

Centro de Investigación: Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. Madrid.



El primer año del proyecto nos ha permitido profundizar en el conocimiento de la implicación del gen *dido* en la hematopoyesis. Los ratones con una deficiencia condicional en líneas hematopoyéticas del exón XVI de dicho gen carecen de la isoforma proteica DIDO3 y presentan una severa linfopenia B. Analizando los precursores de médula ósea hemos observado diversos problemas de desarrollo en distintas fases del proceso.

En este año 2018, hemos podido determinar que el fenotipo observado no depende de la actividad del estroma ya que, en experimentos de trasplante de médula, las células madre hematopoyéticas procedentes del mutante no han sido capaces de competir con las de un animal normal. Esta incapacidad de repoblar la médula se ve acompañada por un defecto general en la capacidad de división y diferenciación de las células mutantes en ensayos realizados tanto *in vivo* como *in vitro*. Pese a la evidente reducción en la generación de precursores en etapas posteriores de diferenciación (pro-B y especialmente pre-B), los procesos de recombinación somática V(D)J parecen realizarse con normalidad. Hemos determinado que la diferenciación y activación en periferia se produce normalmente, pese a que los análisis histológicos de tejidos linfoideos demuestran defectos en la localización de las células B con fenotipo de zona marginal.

Hemos analizado el estado de la cromatina en los precursores hematopoyéticos más primitivos (células madre hematopoyéticas -HSC- y precursores multipotentes (LMPP)), encontrando, en general, una menor accesibilidad para los promotores de las células procedentes de ratones deficientes para Dido3. Esta alteración de la cromatina creemos que se

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

3

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

traduce en un menor nivel de expresión a partir de los promotores afectados, lo que validaremos en próximos experimentos. Entre los genes con expresión potencialmente alterada hemos identificado oncogenes de las vías de señalización Ras (ras, ilk, jun), TGF-β (c-myc, n-myc) y Wnt/β-catenina (sox4), todas ellas relacionadas con el desarrollo de mielodisplasias y leucemia mieloide aguda (AML), y un antioncogen (inpp4b) de la vía de señalización de Akt, asociado con quimiorresistencia y mal pronóstico en AML.

De los modelos preclínicos a los pacientes: una investigación global de la inmunoterapia en MM

Investigador Principal: Enrique María Ocio San Miguel

Centro de Investigación: Hospital Universitario de Salamanca. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).



El proyecto de investigación tiene tres grandes objetivos:
Objetivo 1. Investigar preclínicamente la eficacia y el mecanismo de acción de agentes inmunoterápicos en MM. La molécula EDO-S101 aumenta en las células de MM la expresión de CD38 así como la de algunos ligandos activadores de células NK. Además, EDO-S101 potencia el efecto de daratumumab (anticuerpo monoclonal anti-CD38) tanto en líneas celulares como en células de pacientes con MM.

Asimismo, hemos iniciado un estudio piloto para estandarizar un modelo murino humanizado con sistema inmune humano en ratones hIL6-NOG tras inyección de células CD34+ de cordón umbilical. Se observa que la cinética de crecimiento de líneas celulares de MM en ratones humanizados vs. no humanizados se encuentra retrasada en los primeros, sugiriendo que el sistema inmune humano generado es activo frente al tumor.

Objetivo 2. Caracterizar el sistema inmune de pacientes con MM en diferentes estadios de la enfermedad así como la influencia de distintos tratamientos inmunoterápicos. Hemos analizado mediante citometría de flujo 314 muestras de médula ósea (MO) y 297 de sangre periférica (SP) de pacientes con gammaglobulina monoclonal de significado incierto, mieloma múltiple (MM) quiescente de alto riesgo, MM activo al diagnóstico y en la recaída y de pacientes que han respondido al tratamiento.

Hemos analizado también el sistema inmune y expresión de PD1 y PDL1 en 18 pacientes que recibieron tratamiento de mantenimiento con pembrolizumab. Las progresiones tempranas se asociaron con menos NK y células plasmáticas normales y una menor expresión de PDL1 en las células plasmáticas patológicas (CPP).

Objetivo 3. Analizar mecanismos de resistencia a tratamientos inmunoterápicos.

Hemos generado una línea de MM resistente al efecto de daratumumab mediado por complemento. Los datos preliminares sugieren una menor expresión de CD38 y mayor de moléculas inhibidoras del complemento (CD46 y CD55) en las células resistentes.

Producción Científica

1

Comunicaciones en congresos nacionales

1

Comunicaciones en congresos internacionales

Conversión de tumores con expresión EGFR en tejidos inmuno rechazables

Investigador Principal: Fernando Pastor Rodríguez

Centro de Investigación: Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Pamplona.



Uno de los principales retos en la inmunoterapia del cáncer es conseguir que el sistema inmune reconozca al tumor como un potencial agente exógeno para que lo rechace como si se tratase de un patógeno. Esto dependerá, entre otros factores, de la antigenicidad intrínseca tumoral, la cual a su vez está determinada por las mutaciones acumuladas a lo largo del desarrollo del tumor. Muchos de estos抗ígenos tumorales pueden estar enmascarados por un proceso conocido como NMD. En este proyecto pretendemos desarrollar una herramienta terapéutica basada en aptámeros para inhibir el NMD en el tumor y así potenciar la antigenicidad tumoral haciendo al tumor más visible al sistema inmune. Desde el comienzo del proyecto hasta ahora hemos desarrollado un aptámero-siRNA químera capaz de inhibir

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos internacionales

el NMD de forma específica en células tumorales *in vitro* e *in vivo* en diferentes modelos tumorales de ratón (cáncer de colon, melanoma, páncreas y estamos explorando el cáncer de mama).

En los modelos *in vivo* testados en los que se observa una clara reducción del crecimiento tumoral también se ha hecho un estudio de la infiltración linfocitaria. Todos los tumores tratados *in vivo* con el aptámero conjugado con el siRNA capaz de inhibir el NMD muestran un incremento muy significativo del infiltrado linfocitario dominando entre todos, los linfocitos citotóxicos CD8+, responsables del reconocimiento y destrucción directa de las células tumorales.

Por otro lado, los tumores también evolucionan desarrollando mecanismos de escape a la respuesta inmune comprometiendo la actividad efectora de los linfocitos que infiltran el tumor mediante el reclutamiento de linfocitos reguladores y la expresión de receptores de co-inhibición. En esta línea, el bloqueo de la actividad del NMD y el bloqueo de las señales inmunosupresoras procedentes del tumor conllevaría un aumento en la supervivencia. Para la potenciación de la respuesta inmune inducida por la inhibición dirigida del NMD estamos testando varios aptámeros frente a dianas inmuno-moduladoras expresadas en el ambiente tumoral.

Desarrollo y comprobación preclínica de Receptores para Antígenos Quiméricos (CARs) bi-específicos contra la Leucemia Mieloide Aguda

Investigador Principal: Hisse Martien van Santen

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid.



La terapia de células CAR T es una aproximación terapéutica recientemente aprobada para tratar el cáncer. En esta aproximación, las células inmunitarias del paciente están modificadas genéticamente con un receptor recombinante ("receptor de antígeno químico") que puede reconocer proteínas de la superficie celular en las células tumorales del paciente, lo que les permite eliminar las células tumorales. Una de las limitaciones actuales de la terapia con células CAR T es la falta de proteínas que solo son expresadas por las células tumorales, lo que da lugar a ataques por las células CAR T a tejidos sanos cuando también expresan estas proteínas.

En este proyecto, estamos generando un nuevo tipo de CAR (SiDECAR) que puede reconocer al mismo tiempo dos proteínas diferentes asociadas a la leucemia mieloide aguda, lo que reduce la probabilidad de que estas células CAR T también reconozcan el tejido sano. Hemos obtenido las secuencias de los dominios del CAR que son responsables de reconocer las proteínas tumorales y hemos diseñado el formato óptimo de estos dominios en el contexto de los CAR. Además, hemos modificado los dominios de señalización de este CAR, demostrando, a través de ensayos de eliminación de células tumorales, que se pueden modificar las respuestas utilizando diferentes variantes de señalización. Este último hallazgo nos debería permitir encontrar una combinación de dominios de reconocimiento y señalización, que asegura que el CAR necesita reconocer a la vez las dos proteínas asociadas a células tumorales diferentes para estar activo. La probabilidad reducida de que el tejido sano exprese las mismas dos proteínas asociadas al tumor debería reducir la probabilidad de que las células CAR T ataquen el tejido sano.

Producción Científica

2

Comunicaciones en
congresos internacionales

3. TERAPIA CELULAR EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS



Efecto de las mutaciones del gen *glucocerebrosidasa-1* en neuronas derivadas de células iPS de enfermos de Parkinson. Rescate del fenotipo y trasplante celular

Investigador Principal: Carlos Vicario Abejón

Centro de Investigación: Instituto Cajal. CSIC. Madrid.



El objetivo de nuestra investigación es la obtención de neuronas dopaminérgicas y neuronas corticales maduras a partir de células iPS derivadas de enfermos de Parkinson. Estudio de las alteraciones causadas por las mutaciones N370S y L444P en *GBA1*. Los resultados, han sido:

En primer lugar, queremos resaltar que durante este año 2018, expertos del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) han evaluado la calidad celular, molecular y genética de nuestras células iPS / iPSCs y han aprobado su publicación y depósito en el Banco Nacional de Líneas Celulares (BNLC).

Como se mencionó en la primera memoria, hemos obtenido neuronas dopaminérgicas (DA) funcionales a partir de las 8 líneas de células iPS derivadas de pacientes de Parkinson portadores de mutaciones en el gen *GBA1* (5) y de sujetos sanos (3). En este segundo periodo, se ha hecho hincapié en el estudio del efecto de las mutaciones sobre la liberación de dopamina, así como las propiedades eléctricas pasivas y activas de las neuronas tales como el potencial de membrana en reposo, la capacitancia, potenciales de acción, curva corriente-voltaje, frecuencia de disparo y actividad espontánea.

Hemos finalizado la puesta a punto de la obtención de neuronas corticales (con características similares a las de la corteza cerebral) a partir de células iPS. Dichas neuronas expresan marcadores corticales como PAX6, FOXG1, TBR2, TBR1, y MAP2. Además, presentan capacidad para realizar endocitosis y exocitosis en la terminal presináptica y liberar glutamato, lo que sugiere que son neuronas funcionales.

También hemos medido por ELISA la cantidad de alfa-sinucleina liberada en el medio de cultivo de neuronas DA derivadas de iPSCs; los primeros resultados muestran que dicha liberación podría estar afectada por las mutaciones en *GBA1*. Aunque la alfa-sinucleina se expresa en la gran mayoría de las neuronas presentes en estos cultivos, estamos analizando si su patrón de expresión se ve afectado por las mutaciones.

El estudio acerca del impacto de las mutaciones sobre función lisosomal, autofagia, metabolismo lipídico y función mitocondrial fue desarrollado, primeramente, en los fibroblastos aislados de pacientes (artículo de García-Sanz...Vicario, Moratalla, 2017, *Movement Disorders; que ya ha recibido 14 citas*), con comentarios en *Movement Disorders* (García-Sanz y Moratalla, 2018) y en *Autophagy* (García-Sanz...Vicario, Moratalla, 2018). En este periodo, seguimos estudiando dichos procesos en neuronas DA obtenidas a partir de nuestras células iPS.

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

7

Comunicaciones en congresos internacionales

4. INTERACTOMA: IMPLICACIONES PATOLÓGICAS



Interactoma diferencial de WIP durante su actividad oncogénica o supresora de tumores

Investigadora Principal: Inés María Antón Gutiérrez

Centro de Investigación: CIBERNED/CNB-CSIC. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas-Centro Nacional de Biotecnología. Madrid.



Los tumores sólidos, habitualmente, se generan y mantienen a partir de una subpoblación de células troncales tumorales (CTT) resistentes al tratamiento y con capacidades metastásicas. Algunas propiedades patológicas esenciales de las CTT, como la motilidad y la invasividad tumoral mediada por invadopodia, dependen de la reorganización del citoesqueleto de actina y proteínas asociadas a este como WIP (*WASP Interacting Protein*). Nuestro trabajo demuestra que en glioblastoma y en cáncer de mama las células transformadas más invasivas contienen altos niveles de WIP y que la reducción de estos disminuye la proporción de CTT, la formación de estructuras invasivas y el crecimiento independiente de anclaje, indicando que WIP actúa como promotor de tumores sólidos.

En colaboración con la Universidad de Harvard hemos descrito que en contraposición, WIP actúa como supresor de tumores en el Linfoma Anaplásico de Células Grandes (*Anaplastic Large-Cell Lymphoma; ALCL*) ya que su ausencia favorece el desarrollo de linfomas ALK+ murinos y humanos.

Nuestro objetivo global es la identificación del interactoma diferencial de WIP en células tumorales adherentes o en suspensión (CTT) para determinar los mecanismos que confieren a WIP funciones opuestas en tumores hematopoyéticos y no hematopoyéticos. En este segundo año hemos obtenido complejos proteicos asociados a WIP por inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales murinos y policlonales de conejo y, utilizando LC-MS/MS (*Liquid-chromatography-mass spectrometry*) y hemos iniciado la identificación de las proteínas específicamente asociadas a WIP en células tumorales invasivas procedentes de tumores sólidos no hematopoyéticos. El análisis bioinformático comparativo de las proteínas identificadas en el interactoma de WIP revela una amplia representación de componentes del metabolismo, de procesos de síntesis de bases nitrogenadas, de rutas de degradación proteica y de transporte intracelular. La descripción detallada del interactoma de WIP en diferentes condiciones/tipos celulares permitirá identificar dianas proteicas diferenciales y desarrollar terapias tumorales efectivas dirigidas a CTT específicas.

Producción Científica

4

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

1

Comunicaciones en congresos internacionales

Papel de la proteína lisosomal LAMP2 en el fenotipo “EA-like” inducido por HSV-1: estudio del interactoma de LAMP2 en neuronas infectadas por el virus

Investigadora Principal: María Jesús Bullido Gómez-Heras

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid.



En esta anualidad, hemos corroborado la participación de la proteína lisosomal LAMP2 en el ciclo infectivo del virus herpes simplex 1 (HSV 1), encontrando que en diferentes condiciones de infección (tiempo, dosis viral y presencia de estrés oxidativo) los niveles de DNA y proteínas virales son significativamente menores en células deficientes en LAMP2 (LAMP2 $-/-$). Los primeros análisis de los marcadores de neurodegeneración inducidos por HSV 1 sugieren que estos también disminuyen en las células deficientes, posiblemente como consecuencia de la menor eficacia de la infección. Los ensayos realizados para evaluar si estos efectos están mediados por una disfunción lisosomal han revelado que la actividad enzimática de diferentes hidrolasas lisosomales no está alterada en las células LAMP2 $-/-$, lo que sugiere que el papel de LAMP2 en nuestro modelo no depende de la función hidrolítica de los lisosomas. Otro aspecto funcional de los lisosomas relevante en neurodegeneración es la regulación de los niveles de colesterol. En este aspecto, tras optimizar la metodología necesaria para analizar los niveles de colesterol, hemos demostrado que HSV-1 induce una acumulación intracelular de colesterol, probablemente en el compartimento lisosomal. En resumen, nuestros datos sugieren que LAMP2 puede formar parte del mecanismo que conecta la infección por HSV-1 con la disfunción lisosomal y la neurodegeneración, a través de la regulación de los niveles celulares o lisosomales de colesterol. Para confirmarlo, estamos analizando si la deficiencia de LAMP2 afecta a los niveles de colesterol celular y si la modulación de los niveles de colesterol afecta a los marcadores de neurodegeneración inducidos por HSV-1. En este sentido, estudios preliminares sugieren que la reducción de los niveles de colesterol atenúa la hiperfosforilación de tau inducida por el virus. Además, hemos iniciado los estudios de interacción de proteínas virales con LAMP2 como posible mecanismo inductor de las anomalías lisosomales causadas por HSV-1.

Interacciones entre la proteína N-acetilglucosamina kinasa y diferentes circuitos de regulación génica en *Yarrowia lipolytica*

Investigador Principal: Carlos Gancedo Rodríguez

Centro de Investigación: Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols".

CSIC-UAM. Madrid.



Nuestro objetivo es investigar si la actividad catalítica de la N-acetilglucosamina (NAGA) kinasa es necesaria para su función reguladora. Hemos ensayado la capacidad de NAGA kinasas heterólogas para complementar la actividad catalítica y/o reguladora de la enzima de *Yarrowia lipolytica*. Como criterio de la funcionalidad catalítica de la enzima ensayada, se usó el crecimiento del mutante *Ylnag5* expresando la proteína correspondiente. Como reportero de la función reguladora (control de los genes de la vía catabólica de NAGA) utilizamos la actividad de la glucosamina-6-P desaminasa.

Encontramos que la expresión de la kinasa de *Magnaporthe oryzae* complementó tanto el defecto de crecimiento como la función de regulación transcripcional de los genes. Esto muestra que esta NAGA kinasa es funcionalmente similar a *YNag5*. La transformación con el gen de *Candida albicans* no complementó ninguna de las funciones. Dos NAGA kinasas ejercieron un control transcripcional sin complementar la actividad catalítica. La NAGA kinasa de *Homo sapiens* restauró totalmente el control transcripcional mientras que la de *Arabidopsis thaliana* sólo lo hizo parcialmente. Este resultado muestra que las dos funciones de la proteína Nag5 pueden separarse y apoyan la hipótesis de que *YNag5* es una proteína *moonlighting*.

Aunque la secuencia de aminoácidos de *YNag5* no presenta grandes similitudes con las de otras NAGA kinasas, comparamos la predicción de su estructura secundaria con la de otras NAGA kinasas para localizar posibles sitios que afectasen a la actividad no-canónica de la

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos internacionales

proteína. Identificamos un sitio conservado en una región de estructura conservada cuya mutación en la proteína de mamíferos elimina su actividad catalítica sin afectar su función reguladora en la arborización dendrítica. Estamos mutando ese sitio para estudiar su efecto en la proteína de levadura.

Para evaluar la extensión del control de la NAGA kinasa sobre otros genes hemos comenzado experimentos de RNA-seq.

Identificando el sensor celular de nucleótidos y su interactoma

Investigadora Principal: Marçal Pastor Anglada

Centro de Investigación: CIBEREHD-Universitat de Barcelona.



El análisis proteómico de las interacciones de transportadores de nucleósidos (hNTs) anticipó la existencia de complejos proteicos que podrían funcionar como sensores de los niveles extracelulares de nucleósidos purínicos. Nuestra hipótesis es que estos complejos permiten regular de manera coordinada las vías de recuperación y las de síntesis de novo de nucleótidos de purina. Estas redes proteicas podrían estar alteradas durante el proceso oncogénico. En base a esta hipótesis, los objetivos concretos del proyecto son:

- a) Demostrar la existencia de interacciones directas, con implicación funcional, de enzimas de las vías de recuperación y de síntesis de novo de nucleótidos de purina.
- b) Demostrar que estos complejos forman parte de un sensor celular de purinas susceptible de estar alterado en la oncogénesis, contribuyendo por lo tanto a la reprogramación metabólica asociada.
- c) Incorporar en este sensor a los transportadores de membrana responsables de la recuperación de nucleósidos y nucleobases y establecer la integridad funcional de estos complejos ante situaciones de estrés metabólico.

Se ha demostrado la interacción entre un transportador de la familia hCNT y un enzima de las vías de recuperación de nucleósidos. Esta interacción tiene efectos funcionales puesto que modula la afinidad del transportador por su substrato. A su vez, este enzima interacciona con una proteína implicada en la síntesis de novo de nucleótidos, lo cual establece una jerarquía estructural en la composición del complejo proteico inicialmente hipotetizado. Se dispone ya de un modelo celular obtenido mediante tecnología CRISPR en el cual expresar los mutantes que hemos ido generando para poder así identificar las zonas de interacción entre ambas proteínas. Se han establecido las condiciones de estrés nutricional y bioquímico (depleción de nucleósidos y nucleobases extracelulares y desequilibrio purinas/pirimidinas) en las cuales analizar el impacto funcional de dicho estrés sobre la estructuración de este presumible sensor de purinas.

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

Desarrollo de compuestos terapéuticos basados en los sitios moleculares de interacción entre la proteína viral A238L y los complejos transcripcionales que regulan la síntesis de mediadores pro-inflamatorios y tumorales

Investigadora Principal: Yolanda Revilla Novella

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid.



El objetivo del presente proyecto es caracterizar residuos claves de la proteína viral A238L en la inhibición de la ruta de NF-κB, y con ello definir un farmacóforo para desarrollar nuevos fármacos anti-inflamatorios. En el anterior período identificamos residuos clave en la activación de NFκB basándonos en medidas de actividad transcripcional de NFκB mediante un reportero luciferasa (ensayos luc), generándose mutantes en estos residuos.

En este periodo, hemos corroborado la expresión de A238L y de sus mutantes en las condiciones de los ensayos luc detectando la expresión de mRNA de A238L por qPCR, lo que

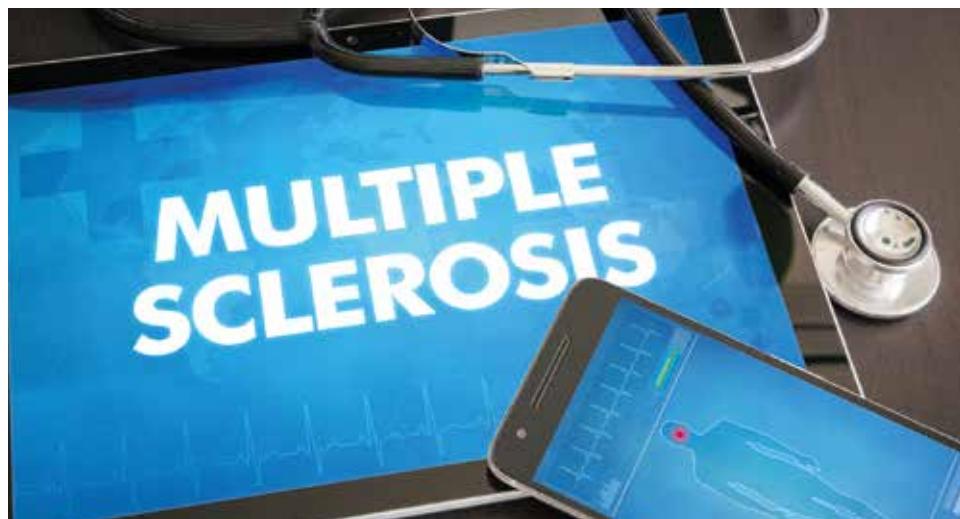
Producción Científica

2

Comunicaciones en congresos internacionales

permite hablar de la estabilidad de este mensajero. Además, generamos baculovirus-A238L recombinantes para producir anticuerpos específicos que permitan detectar la proteína durante la infección. Sin embargo, la expresión de A238L resultó ser intracelular, lo que complica su purificación y en la actualidad estamos solventando estos problemas. Alternativamente, en paralelo, subclonamos A238L y sus mutantes en vectores de expresión comerciales que contienen tags (myc e his) con el objetivo de utilizar anticuerpos frente a estos tags en células transfectadas con estos vectores. En estas condiciones, observamos expresión débil mediante WB en células COS transfectadas con las distintas construcciones, corroborando la expresión observada por qPCR en los ensayos luc. Utilizando dichas construcciones, hemos realizado ensayos de co-inmupoprecipitación para analizar la unión de A238L y sus mutantes con la subunidad p65 de NFkB para mapear los sitios de unión de A238L-p65, de cara al diseño de fármacos. También realizamos inmunofluorescencia para la observar la localización de A238L y sus mutantes, lo que está relacionado con la función. En estos momentos estamos utilizando sistemas alternativos de expresión, como el VV-T7, utilizado para la expresión heteróloga de genes del VPPA, para incrementar la expresión y llegar a resultados funcionales más concluyentes en la próxima y última etapa del proyecto.

5. EXOSOMAS: LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR COMO ARMA TERAPÉUTICA



Estudio de los micro RNAs de EBV, HHV-6A y HHV-6B presentes en exosomas aislados de plasma de pacientes con esclerosis múltiple: correlación con la actividad y progresión de la enfermedad

Investigador Principal: Roberto Álvarez Lafuente

Centro de Investigación: Hospital Universitario Clínico San Carlos. Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC). Madrid.



El objetivo primario del estudio consiste en la realización de un estudio longitudinal, de dos años de seguimiento, en pacientes diagnosticados de esclerosis múltiple recurrente remitente (EMRR), para analizar los niveles de expresión de los miRNAs virales de EBV, HHV-6A y HHV-6B presentes en los exosomas aislados de plasma de dichos pacientes y su posible relación con la progresión y la actividad de la enfermedad. Como objetivos secundarios, se comparará la evolución de los niveles de expresión de los miRNAs virales de EBV, HHV-6A y HHV-6B presentes en los exosomas aislados de plasma de pacientes con EMRR con: 1) la evolución de la carga viral de EBV, HHV-6A y HHV-6B, y la evolución de los títulos de anticuerpos IgG e IgM frente a EBV y HHV-6 a lo largo de los dos años de seguimiento; 2) los niveles de expresión

la progresión y la actividad de la enfermedad. Como objetivos secundarios, se comparará la evolución de los niveles de expresión de los miRNAs virales de EBV, HHV-6A y HHV-6B presentes en los exosomas aislados de plasma de pacientes con EMRR con: 1) la evolución de la carga viral de EBV, HHV-6A y HHV-6B, y la evolución de los títulos de anticuerpos IgG e IgM frente a EBV y HHV-6 a lo largo de los dos años de seguimiento; 2) los niveles de expresión

de HLA-DR y HLA-DQ por RT-PCR cuantitativa, a lo largo de los dos años de seguimiento. Después de casi 2 años de estudio, se ha completado el periodo de reclutamiento de los pacientes, habiéndose incluido en el mismo los 100 pacientes inicialmente planificados. Se han recogido las muestras basales y se ha comenzado ya con la recogida de las muestras correspondientes a los 12 meses de seguimiento, así como los datos clínicos y radiológicos relacionados con dichas visitas. Se ha comenzado a analizar también las variables de laboratorio correspondientes a las visitas realizadas: niveles de expresión de los miRNAs de EBV, HHV-6A y HHV-B de exosomas aislados de plasma; carga viral de EBV, HHV-6A y HHV-B; niveles de expresión de HLA-DR y HLA-DQ; niveles de anticuerpos IgG e IgM frente a EBV y HHV-6; genotipado del HLA. Puesto que no se han completado todavía los dos años de seguimiento, no se han obtenido resultados definitivos relacionados con los objetivos inicialmente planteados.

Modulación de exosomas transportadores de miRNAs y lncRNAs para la comunicación intercelular como herramienta terapéutica frente a la dislipidemia

Investigador Principal: Alberto Dávalos Herrera

Centro de Investigación: Instituto Madrileño de Estudios Avanzados (IMDEA) en Alimentación. Madrid.



Los exosomas transportan una gran variedad de moléculas, entre ellas RNAs no codificantes, y debido a su papel en la comunicación intercelular, tiene un alto potencial de diagnóstico y terapéutico. Sin embargo, la modulación terapéutica de los miRNAs que transporta, mediante la dieta está muy poco caracterizada. Los objetivos de este proyecto son buscar y validar el transporte de miRNAs y lncRNAs en exosomas en estado de lipemia postprandial, caracterizar sus posibles mecanismos moleculares de acción y buscar su modulación terapéutica a través de la dieta.

Durante el 2018, se han validado miRNAs secretados en lipemia postprandial en roedores. Además, como prueba de efecto, los miRNAs validados en roedores han sido evaluados y confirmados también en exosomas plasmáticos de humanos en respuesta a lipemia postprandial. Con el fin de establecer los mecanismos de acción, se ha buscado el posible órgano de origen/destino de dichos miRNAs analizando algunos tejidos de roedores. Además, se ha realizado un screening de miRNAs circulantes modulados por el consumo de componentes de la dieta mediterránea y hemos validado un miRNA transportado por exosomas que responde al tratamiento dietético. Por otro lado, hemos realizado un screening de lncRNAs circulantes en respuesta a la dieta mediterránea y hemos encontrado varios candidatos para su posterior validación en toda la cohorte.

Aunque aún no se han descifrado los posibles mecanismos moleculares, los resultados obtenidos indican que la dieta (o sus componentes) podría modular la secreción de exosomas que transportan miRNAs y lncRNAs, abriendo así nuevas alternativas terapéuticas.

Caracterización de biomarcadores de infección y posibles dianas terapéuticas presentes en exosomas generados durante la infección *in vitro* e *in vivo* por *Leishmania infantum*

Investigador Principal: Vicente Emilio Larraga Rodríguez de Vera

Centro de Investigación: Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid.



Los parásitos del género *Leishmania* (Trypanosomatidae) son los causantes de la leishmaniasis, que se manifiesta de diferentes formas dependiendo de la especie implicada. La especie *L. infantum* causa leishmaniasis visceral zoonótica en la cuenca mediterránea y en Latinoamérica, siendo el perro el reservorio principal. En el estudio propuesto de la implicación de los exosomas

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

4

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

1

Comunicaciones en congresos nacionales

1

Comunicaciones en congresos internacionales

en la infección, se ha optimizado el método de caracterización del ARN. Así mismo, se ha avanzado en otros objetivos propuestos. Se ha determinado el contenido proteico de los exosomas producidos por promastigotes de *L. infantum* en las primeras etapas de su diferenciación, en la infección, teóricamente menos infectivos. La presencia de genes de *Leishmania* en los exosomas mostró que al menos 32 de ellos se encuentran altamente expresados (8 veces sobre la media).

Entre estos genes, se encuentra la mayor parte de la familia de las metaloproteasas de superficie gp63 y de los genes de autofagia, la proteína del vástago paraflagelar 1D y un cluster de proteínas asociadas a microtúbulos. Se han identificado también proteínas contenidas como carga en los exosomas. Entre ellas, la histidina fosfatasa ácida secretada, la Metalo-peptidasa, Clan MA(M), Familia M8 y la β-tubulina. Se está determinando el contenido de los exosomas producidos por las fases más infectivas para proceder a la comparación e identificación de genes expresados y proteínas presentes en estas fases del parásito.

Aplicabilidad de los exosomas como agentes predictores de respuesta al tratamiento y pronóstico en cáncer de mama: modificaciones celulares inducidas por la interacción de las exovesículas

Investigador Principal: Fernando Rodríguez Serrano

Centro de Investigación: Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa. Centro de Investigación Biomédica. Universidad de Granada.



Los exosomas son nanovesículas liberadas al espacio intercelular que son capaces de transmitir elementos celulares, pudiendo de este modo afectar a otras células receptoras. En el cáncer, los exosomas se han relacionado con transformación celular, progresión y resistencia a fármacos, entre otros aspectos. Sin embargo, en la actualidad contamos con poca información sobre

los mecanismos y las características de las exovesículas que justifican dichos efectos, así como el valor clínico que pueden proporcionar componentes exosomales. Nuestro objetivo principal es demostrar que los exosomas tumorales circulantes en sangre periférica son indicadores de la funcionalidad tumoral en cuanto a respuesta al tratamiento y pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Para ello, nos centramos en el análisis de exosomas aislados a partir de muestras de pacientes de cáncer de mama sometidas a tratamiento de neoadyuvancia, con 4 ciclos de adriamicina-ciclofosfamida seguidos de 4 ciclos de doce-taxel y posterior cirugía.

En la actualidad hemos conseguido reclutar 50 pacientes, de los cuales 35 ya han finalizado el programa de neoadyuvancia. A partir del grupo de pacientes ya intervenidas y con informe de anatomía patológica hemos establecido diferentes grupos de comparación atendiendo a la clasificación histopatológica y la respuesta al tratamiento. A partir de sus muestras estamos llevando a cabo análisis proteómico y transcriptómico en busca de marcadores predictores de respuesta. De igual modo, estamos llevando a cabo ensayos de phage display para desarrollar sistemas específicos de detección. El sistema de despliegue de fagos frente a librerías de proteínas permite el aislamiento y la selección de variantes con características de unión determinadas, mediante biopanning y selección de Cry-bodies. Por el momento, estas tareas se centran en marcadores de identificación exosomal, aunque los resultados obtenidos con muestras de pacientes nos permitirán incluir en las rondas de selección aquellas proteínas que posean mayor valor predictivo clínico.

Mecanismos moleculares implicados en la producción de exosomas en el estrés celular

Investigador Principal: Antonio Zorzano Olarte

Centro de Investigación: Instituto de Investigación Biomédica (IRB Barcelona).

El objetivo de este proyecto consiste en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la generación y liberación de vesículas extracelulares (VE) en células sometidas



a condiciones de estrés metabólico e hipoxia. En este contexto, hemos desarrollado varias líneas de trabajo:
En primer lugar, hemos establecido un protocolo para aislar tanto las vesículas de pequeño tamaño (exosomas), como las de mayor tamaño (microvesículas), que tienen un origen en la membrana plasmática celular. La concentración y el tamaño de las vesículas han sido analizadas mediante *Nanotracking Particle Analysis* (NTA) y *western blot*.

Una vez optimizado este procedimiento de aislamiento de VE, hemos comenzado a realizar los estudios para determinar el comportamiento de dichas vesículas en las diferentes condiciones de estrés metabólico e hipoxia. En este sentido, hemos conseguido establecer una ventana de trabajo para el análisis de la liberación de VE en condiciones de hipoxia en varias líneas celulares (HEK293, 3T3-L1 y SK-N-AS). De este modo, nuestros resultados han puesto de manifiesto que el tiempo óptimo de exposición a hipoxia en estas células está entre las 4 y 24 horas. Esto nos ha permitido detectar las vesículas secretadas tanto en células HEK293T como en células 3T3-L1. También hemos observado que una exposición más prolongada a la hipoxia, 48 horas, incrementa la muerte celular en estas líneas celulares. En base a estos resultados, en el segundo año del proyecto hemos iniciado el análisis de los mecanismos de señalización que regulan la producción de estas vesículas en respuesta a la hipoxia. Para ello estudiaremos la implicación de los factores inducibles por hipoxia (HIFs - *Hypoxia Inducible Factors*), la respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR - *Unfolded Protein Response*) y la regulación del factor de transcripción kappa B (NF- κ B - *Nuclear Factor kappa B*).

Por último, hemos empezado a investigar el papel de la autofagia en relación a la liberación de VE. En este sentido, el proceso de autofagia y la vía endosomal están estrechamente relacionados, y ambas vías son importantes en la liberación de las VE. Por esta razón, hemos empezado a estudiar el papel de la proteína TP53INP2 (*Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 2*) en la liberación de las VE. La proteína TP53INP2 está implicada en la regulación de la autofagia, y recientemente se ha descubierto su relación con la vía endosomal. Concretamente, TP53INP2 participa en el mantenimiento de la homeostasis de los cuerpos multivesiculares (Romero et al., Nat. Cell Biol. 2018), también llamados endosomas tardíos, los cuales tienen un papel primordial en la biogénesis de los exosomas. Así, hemos demostrado que la proteína TP53INP2 promueve el secuestro de proteínas reguladoras tales como GSK3b en endosomas tardíos, en condiciones en las cuales tanto TP53INP2 como la proteína autófágica LC3 se localizan también en esos orgánulos (Romero et al., Nat. Cell. Biol. 2018).

Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que la sobreexpresión de TP53INP2 también incrementa la secreción de VE, mientras que la pérdida de función de TP53INP2 reduce la liberación de vesículas de pequeño tamaño (exosomas), sin afectar a las vesículas de mayor tamaño (microvesículas). Por ello, el siguiente paso en el desarrollo del proyecto será analizar la posible relación entre TP53INP2 y algunas de las diferentes proteínas que gobiernan la formación de los cuerpos multivesiculares y la posterior secreción de exosomas. Para ello estudiaremos la implicación de la familia de proteínas ESCRT (*Endosomal sorting complexes required for transport*) y de las Rab GTPasas en este proceso.

Ya que los exosomas desempeñan un papel importante en la regulación de la comunicación celular, también nos planteamos analizar la composición molecular de estas vesículas. Esto nos permitirá entender, de una forma más precisa, el papel de TP53INP2 en este proceso. La caracterización de estos exosomas se llevará a cabo mediante ensayos de western blot y citometría de flujo.

6. REPROGRAMACIÓN TISULAR Y ORGANOIDES



Regeneración como modelo para estudiar mecanismos moleculares de la reprogramación celular

Investigador Principal: Antonio Baonza Cuenca

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid.



La regeneración de un órgano depende de múltiples procesos celulares que son necesarios para reconstituir el tamaño del órgano dañado y generar la variedad de células que lo constituyen. Durante el proceso regenerativo algunos de los tipos celulares que forman el órgano en regeneración lo hacen a partir de células diferenciadas o especificadas para un destino determinado, lo que implica que es necesario que se activen mecanismos que inducen cambios en la identidad celular. La identificación de las redes de señalización que controlan la re-especificación del destino celular durante la regeneración es fundamental para desarrollar nuevos abordajes para inducir reprogramación celular.

Nuestro proyecto consiste en definir estas rutas de señalización y los mecanismos moleculares que inducen cambios de identidad celular durante la regeneración. Distintos resultados han mostrado que en *Drosophila* las vías de señalización de N-terminal c-Jun (JNK) y JAK / STAT son necesarias para controlar la proliferación regenerativa. Los resultados obtenidos por nuestro grupo han servido para proponer que además de esta función, estas rutas de señalización son necesarias para la re-especificación del destino celular que tienen lugar durante la regeneración. Nuestros resultados indican que la actividad cooperativa de ambas vías de señalización pueden inducir cambios tanto en el destino celular en áreas lesionadas como en células adyacentes. Por otro lado, hemos encontrado que esta función depende de la actividad del iniciador de caspasa codificado por el gen *dronc*. En conjunto, nuestros datos proporcionan información importante sobre los mecanismos a través de los cuales las actividades de las vías de señalización de JNK y JAK / STAT pueden regular cambios en el destino celular en respuesta al daño tisular.

Papel de la señalización purinérgica en el desarrollo cortical humano: una aproximación basada en organoides cerebrales

Investigadora Principal: María Teresa Miras-Portugal

Centro de Investigación: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV. Universidad Complutense. Madrid.

El objetivo fundamental de este proyecto se centró en investigar el papel de la señalización purinérgica en el desarrollo cortical humano y su implicación potencial en el diseño de futuras estrategias terapéuticas contra las malformaciones corticales.

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales



Para ello, planeamos utilizar las prometedoras posibilidades abiertas por el método de los organoides cerebrales para realizar un estudio fenotípico completo, así como para descubrir qué genes y vías de señalización están involucrados en el modelo cortical humano: Concretamente, nuestro objetivo es i) caracterizar la expresión y función del sistema purinérgico durante el desarrollo cortical tanto a nivel de célula única, como a nivel del organoide completo y ii) mejorar el método de cultivo de organoides.

Durante la primera anualidad, nuestro grupo completó los siguientes objetivos: mejora y consolidación del cultivo de organoides; detección por medio de inmunohistoquímica de varios miembros de la señalización purinérgica, incluidos los receptores P2X7, P2Y₁ y P2Y₂, y el transportador vesicular de nucleótidos VNUT; y experimentos preliminares de electroporación de los organoides con vectores de sobreexpresión y silenciamiento del P2X7.

Siguiendo estos datos, en este periodo hemos realizado el siguiente proceso: continuar la optimización del método. La complejidad del cultivo implica una constante actualización de protocolos y materiales; análisis de los niveles de RNAm de los receptores purinérgicos y de VNUT, centrandonos, no sólo en los propios organoides, sino también en su formación y desarrollo (hiPSCs, Embryonic Bodies) para detectar si esa presencia es constitutiva o existe una "activación" de la presencia del sistema purinérgico en el desarrollo cortical humano. También hemos aislado muestras para el análisis del sistema purinérgico a nivel de proteína funcional. Finalmente, hemos continuado con el análisis de los experimentos de electroporación.

Producción Científica

8
Artículos generados en revistas

10
Comunicaciones en congresos nacionales

9
Comunicaciones en congresos internacionales

7. SEGURIDAD ALIMENTARIA Y BIOTECNOLOGÍA



Nuevos productos bioactivos derivados de alimentos contra la obesidad y la diabetes

Investigador Principal: Pablo José Fernández Marcos

Centro de Investigación: Instituto Madrileño de Estudios Avanzados (IMDEA) en Alimentación. Madrid.



Los objetivos del presente proyecto de investigación son los siguientes: (1) *Descubrir y caracterizar nuevos productos bioactivos derivados de alimentos*. Hemos puesto a punto dos sistemas de cribado de alto rendimiento para identificar nuevos productos bioactivos con efectos sobre la vía de la insulina/PI3K y sobre la actividad mitocondrial, y estamos poniendo a punto una nueva plataforma para identificar productos bioactivos capaces de aumentar los niveles de NADPH. Además, hemos cribado más de 1000 compuestos puros de origen natural con las dos plataformas desarrolladas, identificando más de 20 compuestos

Producción Científica

3
Artículos generados en revistas

3
Comunicaciones en congresos nacionales

2
Comunicaciones en congresos internacionales

bioactivos interesantes. (2) *Desarrollo y caracterización de productos bioactivos*. En colaboración con el grupo de la Dra. Tiziana Fornari, del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, hemos desarrollado una librería de más de 60 extractos de plantas, y los hemos probado en nuestras plataformas de cribado. Gracias a esto, hemos podido identificar varios extractos con actividad en las vías estudiadas. (3) *Pruebas en modelos de ratón de Síndrome Metabólico*. Hemos puesto a punto un modelo en ratón de síndrome metabólico, basado en la ingesta de una dieta rica en grasa durante varios meses, con la que los ratones desarrollan obesidad e intolerancia a la glucosa.

De los productos identificados en los objetivos 1 y 2 hemos probado un inhibidor de la insulina/PI3K, observando mejoras muy significativas en el peso corporal y en la sensibilidad a la insulina, una prueba muy valiosa de nuestro proyecto que queremos enviar a publicar en breve. Además, estamos probando tres compuestos que mejoran la actividad mitocondrial, y esperamos tener resultados en unos pocos meses. En general, este proyecto está generando resultados muy interesantes en todos los objetivos planteados, y esperamos obtener varias publicaciones próximamente, así como identificar y desarrollar nuevos productos bioactivos con aplicación a la población general.

Sistemas fotoactivos avanzados con propiedades biocidas para el desarrollo de recubrimientos aplicables en seguridad alimentaria y hospitalaria

Investigadora Principal: Ana Iglesias Juez

Centro de Investigación: Instituto de Catálisis y Petroleoquímica. CSIC. Madrid.



El objetivo principal de este proyecto es el desarrollo de agentes antimicrobianos nanométricos fundados en sistemas photocatalíticos multifuncionales basados en el empleo de ZnO. Durante este primer año de proyecto, se han sintetizado diversos óxidos de cinc. En esta estrategia es evidente que, tanto la composición química como factores estructurales, morfológicos y texturales son factores relevantes que deben optimizarse de forma conjunta a la hora de diseñar sistemas con un mayor potencial de eficacia biocida.

El método empleado ha sido el de sol-gel. Es un método “verde” que emplea condiciones suaves, no requiere el uso de disolventes tóxicos y permite manejar el tamaño de la partícula así como su forma y distribución. Además, este método de síntesis permite la producción de películas delgadas de alta calidad ya que se obtienen fases de reducido tamaño nanométrico dispersas en un medio líquido que permite su pulverización directa sobre una superficie, dando lugar a recubrimientos con mayor homogeneidad.

Se emplearon distintas composiciones y se han optimizado los diversos parámetros de síntesis. Se obtuvieron pequeños tamaños de partícula (<10 nm) y una modificación morfológica dentro de la serie. Se requiere un contacto específico entre caras polares y apolares que optimiza la separación de cargas hueco-electrón evitando así su recombinación y siendo por tanto eficientes para las reacciones fotoquímicas.

El método de electrospray ha sido el elegido para la pulverización sobre un sustrato de vidrio. Con este método se han obtenido recubrimientos de alta homogeneidad y con control del espesor. Las superficies recubiertas con los nanomateriales photocatalíticos se han sometido a varios ensayos biológicos para comprobar su eficacia en la inactivación de microorganismos. Distintos parámetros (tiempos de exposición al cultivo, tiempos de iluminación, espesor del recubrimiento...) han sido analizados. Los resultados preliminares indican propiedades biocidas mejoradas y se encuentran actualmente en fase de análisis.

Uso de modelos animales para evaluar intervenciones dirigidas a la desnutrición y el retraso del crecimiento en niños

Investigador Principal: Fernando Martín Belmonte

Centro de Investigación: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid.

Este proyecto tiene como objetivo generar un nuevo modelo animal para estudiar la fun-



ción de una población de enterocitos ricos en lisosoma (llamados LRE). Nuestros resultados previos identificaron que el gen de la plasmolipina (PLLP) es necesario para la diferenciación de los LRE presentes en un fragmento del intestino delgado (Ileum) que desempeña un papel esencial y conservado en la absorción de proteínas para una nutrición y el crecimiento durante el desarrollo. (Rodriguez-Fraticelli et al 2015). También encontramos que las alteraciones en las interacciones recíprocas entre los LRE del hospedador, la microbiota y la dieta pueden tener resultados inesperados que agravan los déficits nutricionales en personas desnutridas (resultados no publicados). Por lo tanto el éxito de intervenciones probióticas para las disfunciones entéricas ambientales (DEE) deben evaluar de forma integral todos los aspectos de estas interacciones.

Durante este segundo año del proyecto, ya analizamos los ratones PLLP KO e identificamos que las células LRE presentan defectos significativos en la absorción de proteínas neonatales. Caracterizamos que los LRE tienen un papel esencial en la absorción y nutrición debido a una mayor capacidad autofágica. Sin embargo, el fenotipo es relativamente leve y decidimos generar un PLLP KO específico para el intestino en este año. Ya hemos generado una línea floxed de pllp (ppllfl / fl) que se cruzará a una línea villinCreERT2 para generar un KO específico de PLLP en el intestino. En el año siguiente, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante los próximos meses, planeamos: i) definir cómo ciertos componentes nutricionales que dependen de la función de los LRE están regulados por las interacciones microbianas del huésped. ii) probar el efecto de las intervenciones de probióticos en un modelo de malnutrición experimental y determinar cómo las cepas bacterianas asociadas con el retraso en el crecimiento en los niños afectan la fisiología gastrointestinal y otros procesos dependientes de LRE.

Desarrollo de sensores nanoestructurados *Lab-on-a-chip* para la detección de patógenos y agentes químicos transmitidos por los alimentos basados en Espectroscopía Raman aumentada en superficie (SERS)

Investigador Principal: Jorge Pérez Juste

Centro de Investigación: Centro de Investigaciones Biomédicas CINBIO. Universidad de Vigo.



En el presente proyecto (SERSforSAFETY) pretendemos diseñar y desarrollar plataformas de diagnóstico miniaturizadas "*lab-on-a-chip*" basadas en la espectroscopía Raman, aumentada en superficies, para la posterior fabricación de dispositivos de análisis en tiempo real (*point of care*) sensibles, rápidos y portátiles que permitan la ultradetección de bacterias y diversos contaminantes químicos.

Para alcanzar nuestros objetivos emplearemos metodologías sintéticas del campo de la Nanoquímica y la Ciencia de Materiales, ya que las plataformas de diagnóstico estarán basadas en ensamblajes de nanopartículas metálicas plasmónicas (Au principalmente) depositados sobre membranas porosas de filtrado (como por ejemplo papel) o sobre sustratos vidrio grabados mediante fotolitografía suave. Una vez fabricados los materiales, el objetivo siguiente es demostrar su aplicabilidad en el campo de los sensores y, particularmente, en la biodetección de diferentes analitos en muestras complejas como son los alimentos. Para ello, se evaluará su capacidad para la detección basada en SERS de diferentes microorganismos patógenos y contaminantes químicos. Finalmente, se abordará el objetivo principal del proyecto: el desarrollo de una plataforma miniaturizada "*lab-on-a-chip*" de diagnóstico y su aplicación en dispositivos *Point-of-Care* para la ultradetección de microorganismos patógenos y contaminantes químicos en muestras reales.

En este momento, estamos preparando, mediante *litografía suave*, chips de microfluídica en polidimetilsiloxano (PDMS) para la formación de supercristales de nanopartículas de oro que se emplearán, posteriormente, para la detección *in situ* de diferentes moléculas de interés. Adicionalmente, estamos desarrollando un substrato cromogénico para la identifi-

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos nacionales

5

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

8

Artículos generados en revistas

4

Comunicaciones en congresos nacionales

20

Comunicaciones en congresos internacionales

cación multiplex de diferentes cepas bacterianas mediante espectroscopía SERS basado en un gel de agarosa dopado con nanopartículas de oro.

Nuevas estrategias para mitigar los riesgos producidos por levaduras patógenas emergentes en la cadena alimentaria

Investigadora Principal: Amparo Querol Simón

Centro de Investigación: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Valencia.



El objetivo principal del presente proyecto es comprender los mecanismos responsables de causar infecciones por parte de levaduras presentes en alimentos. Hemos estudiado las características fisiológicas asociadas con la virulencia en cepas aisladas de alimentos y de ambientes clínicos, de las especies *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefyr*), *Saccharomyces cerevisiae* y *Wickerhamomyces anomalus* (*Candida pelliculosa*, *syn. Pichia anomala*).

Durante la segunda anualidad se determinaron varios parámetros (adhesión, citotoxicidad, TEER y translocación) relacionados con la virulencia en un modelo de barrera epitelial con línea celular Caco-2. Algunas cepas de *W. anomalus* mostraron niveles de adhesión (10-15 %) superiores a cepas control no virulentas (0-5 %). En cuanto a la citotoxicidad se observó que tanto algunas cepas de *W. anomalus* como de *K. marxianus* mostraron niveles elevados (25-30%) comparado con otras cepas inocuas (0-5%). También en el caso de la translocación se determinaron niveles elevados para algunas cepas de *W. anomalus* y *K. marxianus*. Ninguna especie estudiada produjo cambios en los niveles de TEER. Las cepas de *D. hansenii* no mostraron signos de virulencia destacables.

En la primera anualidad pusimos a punto el modelo de infección del hospedador invertebrado *Galleria mellonella* usando cepas de *S. cerevisiae*. En esta segunda anualidad hemos estudiado la virulencia de aislados de diferentes ambientes de las especies *W. anomalus*, *K. marxianus* y *D. hansenii*. Cabe destacar que las tres cepas de *W. anomalus* analizadas fueron muy virulentas y pudieron matar todas las larvas después de 24 horas de infección; mientras que las larvas infectadas con *K. marxianus* y *D. hansenii* pudo sobrevivir hasta 72 h después de la infección con tasas de mortalidad bajas.

Por último, en esta segunda anualidad hemos enviado a secuenciar el genoma de todas las cepas ensañadas en el apartado anterior mediante la tecnología Illumina Nextseq.

Producción Científica

1

Comunicaciones en congresos nacionales

2

Comunicaciones en congresos internacionales

Hacia un nuevo paradigma en la identificación de peligros y evaluación de la seguridad y el riesgo de neurotoxicidad asociado a la exposición a nanomateriales con aplicaciones biotecnológicas

Investigador Principal: Miguel Ángel Sogorb Sánchez

Centro de Investigación: Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández de Elche.



La nanotecnología presenta una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas y biomédicas que ofrecen la posibilidad de conseguir mejoras del bienestar social. El tamaño de los nanomateriales hace que sus propiedades toxicológicas no puedan ser extrapoladas a partir de sus equivalentes a escala no nanométrica. Los objetivos del proyecto para esta segunda anualidad son (para nanopartículas de plata y de TiO₂): 1) Analizar las alteraciones transcriptómicas inducidas por estos nanomateriales en células T98G de glioblastoma humano y determinar posibles rutas moleculares de efecto adverso; y, 2) Determinar si los nanomateriales se internalizan en células T98G.

En los seis meses transcurridos de la segunda anualidad se han analizado en detalle las alteraciones transcriptómicas inducidas por nanopartículas de plata (en estos momentos se está abordando también el análisis de las alteraciones inducidas por TiO₂). La exposición de

Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos internacionales

células T98G a nanopartículas de plata a una concentración no citotóxica causó alteraciones estadísticamente significativas en la expresión de 43 genes que pertenecen a diferentes términos de cada una de las tres subcategorías de la ontología génica. Los genes que mostraron implicación en un mayor número de términos de la ontología génica fueron un factor de transcripción (JUN B), un inhibidor de un receptor implicado en regulación quinasas (SPROUTY 4), un receptor de membrana y su ligando (C-C MOTIF). También se alteraron 12 diferentes rutas metabólicas, siendo la neuroinflamación y la ruta de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos aquellas con una relevancia fisiológica más evidente. Se determinó mediante microscopía electrónica y citometría de flujo que las nanopartículas de plata no se internalizan en las células T98G, mientras que las de TiO_2 sí lo hacen.

8. ENERGÍA RENOVABLE: MATERIALES Y PROCESOS



Almacenamiento térmico latente con mezclas eutécticas de base urea

Investigador Principal: Álvaro Campos Celador

Centro de Investigación: Universidad del País Vasco (UPV-EHU).



Durante el año 2018 se ha cubierto: (i) la caracterización de un intercambiador de calor industrial adaptado para almacenamiento latente, (ii) análisis del sobreenfriamiento y (iii) análisis de los mecanismos de degradación de mezclas eutécticas.

En relación a la caracterización del intercambiador de calor se trató de determinar las condiciones de trabajo óptimas para obtener mayor eficiencia. Se trata de un intercambiador Shell & Tube donde el agua circula por el interior de los tubos y el PCM en la carcasa exterior. Se puso a punto el equipo mediante calorifugado, revisión de válvulas y calibración de sensores. Se determinaron las pérdidas y se estudió la energía almacenada y la potencia de carga y descarga con diferentes caudales y diferentes temperaturas operativas.

En cuanto al análisis del sobreenfriamiento, se vio que todo apuntaba a una dependencia del mismo con la masa y la velocidad de enfriamiento. Con el objetivo de generalizar su caracterización, se determinó fundamental analizar dicho comportamiento a una serie de números adimensionales aplicando reglas de semejanza. La hipótesis es que los números de Biot recogen la fenomenología detrás del sobreenfriamiento y se ha desarrollado una metodología de análisis para estudiar en detalle dicha correlación. Para ello se han construido probetas de distinto tamaño y se han puesto a punto sistemas de enfriamiento de distinta velocidad (coeficiente de convección), lo que asegura la evaluación bajo un rango de números de Biot suficientemente altos.

Se ha evaluado la degradación experimentada por las mezclas para muestras preparadas en condiciones ambientales y a temperatura de 95°C, mostrando una disminución de hasta

Producción Científica

2

Comunicaciones en
congresos internacionales

un 30% de la capacidad de almacenamiento en un periodo de 40 días. Debido a la gran influencia de la humedad ambiental, se plantea repetir el estudio con muestras preparadas en atmósfera controlada, lo que propicia un riesgo menor de degradación.

Catalizadores biomiméticos heterogéneos basados en arquitecturas híbridas orgánico-inorgánicas funcionalizadas para producción de hidrógeno

Investigadora Principal: M^a Dolores Esquivel Merino

Centro de Investigación: Instituto de Química Fina y Nanoquímica. Universidad de Córdoba.



En los últimos años, la comunidad científica ha mostrado un gran interés por la búsqueda de nuevas formas de energías alternativas, siendo una de las más prometedoras, el hidrógeno.

El H₂ es considerado uno de los portadores de energía más prometedores en el futuro debido a su alta capacidad energética y su compatibilidad con el medio ambiente. Entre las principales vías de producción de hidrógeno, la electrólisis del agua proporciona cierta esperanza de producir hidrógeno de una manera sostenible, al ser su materia prima, el agua, una fuente de hidrógeno abundante y renovable. En busca de posibles alternativas a los catalizadores clásicos, este proyecto de investigación se centra en el desarrollo de nuevos sistemas biomiméticos heterogéneos, compuestos por un centro activo tipo [2Fe2S] y un fotosensibilizador, que tengan la propiedad de producir hidrógeno al ser irradiados con la luz.

A día de hoy, hemos alcanzado algunos de los objetivos propuestos en el proyecto de investigación. Se ha logrado anclar los complejos dinucleares de hierro en la superficie de diferentes materiales híbridos orgánicos-inorgánicos con grupos tioles. La presencia de estos centros activos tipo [Fe2S2] ha sido confirmada por técnicas como EPR, RMN y UV-vis. Tras la adición de una especie fotosensibilizadora, estos materiales están siendo ensayados en la descomposición de agua mediante la luz visible.

Por otro lado, otros de los objetivos propuestos en el proyecto es la síntesis de nuevos precursores organosilícicos que porten el sistema [FeFe]-hidrogenasa. Para ello, se están siguiendo diferentes rutas de síntesis con varios precursores disilánicos con grupos tioles. Tras procesos de separación complejos, se ha logrado exitosamente aislar algunos de los isómeros formados. Estos ligandos serán empleados en los próximos meses para la construcción de estructuras híbridas orgánicos-inorgánicas.

Iluminación solar de nanocatalizadores para reducir el uso de energía global, las emisiones y la contaminación

Investigadora Principal: María González Béjar

Centro de Investigación: Instituto de Ciencia Molecular. Universitat de València.



Este proyecto aborda el diseño de nanocatalizadores capaces de absorber luz (preferentemente solar) y transformarla en energía térmica o química. El objetivo principal es encontrar nuevas alternativas que permitan diseñar procesos que requieran menor temperatura y menos consumo energético en comparación con los procesos térmicos convencionales. Con esta aproximación, se reducirían las emisiones de dióxido de carbono y, en consecuencia, disminuiría el uso de energía global y la contaminación. Por ejemplo, las nanopartículas metálicas (MNP) pueden absorber la luz solar y convertirla en energía química cuando se excitan en su banda de plasmón. Se están estudiando nuevos procesos que pueden tener lugar a partir de estas interacciones luz-nanosistema.

Además, entre la amplia gama de nanocatalizadores de interés, cabe mencionar el diseño de nuevos nanohíbridos de “upconversion” capaces de absorber la radiación (NIR, de sus siglas en inglés) y emitir en el visible. Así pues, los procesos inducidos por la luz pueden

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

2

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

4

Artículos generados en revistas

7

Comunicaciones en congresos internacionales

ayudar también a diseñar nuevos nanohíbridos teranósticos que serían ideales para una medicina personalizada. En concreto, hemos sintetizado un nanohíbrido adecuado para terapia fotodinámica cuyo seguimiento por imagen se puede llevar acabo sin activar simultáneamente la terapia.

Finalmente, se han presentado en la Universitat Autònoma de Barcelona y en el 2nd Global Congress & Expo on Materials Science and Nanoscience algunos ejemplos que ilustran las ventajas del uso de nanopartículas para aplicaciones inducidas por la luz frente a la catálisis térmica. Además, se han presentado algunos pósteres sobre el diseño de nanopartículas de *upconversion* con diferentes recubrimientos para ampliar la versatilidad de su uso como nanocatalizadores (CTCT-2018: Current Trends in Cancer Theranostics and 2nd Global Congress & UPCON18: 2nd Conference and Spring School on Properties, Design and Applications of Upconversion Nanomaterials).

Materiales eficientes para la captura y conversión de CO₂ a productos de interés

Investigador Principal: Manuel Moliner Marín

Centro de Investigación: Instituto de Tecnología Química. CSIC-UPV. Valencia.



Dos de los mayores retos de nuestra sociedad actual, se basan en reducir la enorme dependencia de las fuentes fósiles y los problemas asociados con el cambio climático por la excesiva emisión de CO₂ a la atmósfera. En este proyecto se propone el reciclaje químico de dióxido de carbono hacia metanol como plataforma para poder obtener hidrocarburos

sintéticos y otros productos de alto valor, tales como olefinas, reduciendo, considerablemente, la excesiva dependencia de las fuentes no renovables, y también regular la huella mediaambiental hacia un ciclo neutro de carbono.

En primera instancia, se están desarrollando materiales eficientes para la captura y separación de CO₂, buscando materiales con una eficaz capacidad de regeneración y, por tanto, bajo consumo energético en dicha etapa. En segundo lugar, se busca el diseño de catalizadores capaces de activar y transformar el CO₂ a productos de interés, principalmente metanol, mediante reacciones selectivas de hidrogenación directa. Se está haciendo especial énfasis en optimizar el confinamiento químico de dichos catalizadores, con el doble fin de, por un lado, mejorar la estabilidad frente a la desactivación cuando la reacción se lleva a cabo a altas presiones y temperaturas y, por otro lado, permitir llevar a cabo, eficientemente, dicha reacción en condiciones mucho más suaves. Finalmente, se están diseñando catalizadores activos y estables para la transformación de metanol a gasolina u olefinas, mediante los procesos MTG o MTO, respectivamente.

Materiales híbridos metal-orgánico tipo MOF como fotocatalizadores heterogéneos para la reducción de CO₂ y generación de H₂ empleando H₂O

Investigador Principal: Sergio Navalón Oltra

Centro de Investigación: Departamento de Química. Universitat Politècnica de València.



Actualmente hay mucho interés en el desarrollo de fuentes de energía sostenibles y alternativas al uso tradicional de los combustibles fósiles. En este contexto, el principal desafío de este proyecto es el uso de materiales híbridos metal-orgánico tipo MOF (MOF de sus siglas en inglés *Metal-Organic Framework*) como fotocatalizadores para la producción de combustibles solares derivados del CO₂ y del H₂O. Según el cronograma del proyecto, durante este segundo año se han preparado una serie de materiales basados en el UiO-66(Zr) modificados con cerio o titanio en los nodos metálicos. Experimentos preliminares han demostrado el uso potencial de los materiales bimetálicos UiO-66 para actuar como fotocatalizadores

Producción Científica

6

Artículos generados en revistas

4

Comunicaciones en congresos nacionales

6

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

3

Artículos generados en revistas

1

Comunicaciones en congresos internacionales

eficientes para la fotólisis del agua y la fotorreducción del CO₂. La mejora de la actividad photocatalítica de los sólidos bimetálicos con respecto a los monometálicos se atribuye al aumento del tiempo de vida de separación de cargas durante la fotoexcitación del MOF tal y como se deriva de medidas de fotólisis por destello láser.

De modo análogo, un material UiO-67(Zr) contenido en su estructura un complejo de rutenio como ligando orgánico y átomos de titanio en los nodos metálicos presenta una fotoactividad mejorada para llevar a cabo reacciones photocatalíticas bajo irradiación de luz visible. Es importante destacar que este material se puede emplear como photocatalizador para llevar a cabo la fotólisis del agua bajo irradiación con luz visible. Además de los materiales basados en UiO-66/67 (Zr), la presencia de nanopartículas de cobre en las cavidades del photocatalizador MIL-125(Ti)-NH₂ ha permitido aumentar su eficiencia de separación de carga con la consecuente mejora de su actividad photocatalítica.

Desarrollo de miméticos de dihidrogenas modulables por metales de transición para la producción de hidrógeno en ausencia de agentes reductores moleculares

Investigador Principal: Miguel A. Sierra Rodríguez

Centro de Investigación: Facultad de Química. Universidad Complutense. Centro de Innovación en Química Avanzada (ORFEÓ-CINQA). Madrid.



Las hidrogenasas son enzimas presentes en numerosos microorganismos anaeróbicos y son capaces de producir hidrógeno a partir de agua. La hipótesis inicial de este proyecto es que es posible construir un dispositivo simple, incorporando metales a moléculas biofuncionales (fundamentalmente segmentos de ADN o ARN) para mimetizar la acción de las hidrogenasas. El metal debe ser capaz de modular la actividad del dispositivo. La unión del fragmento que mimetiza la enzima (segmento productor de hidrógeno) a una superficie electroactiva (segmento que suministra la energía, transfiriendo electrones al segmento productor de hidrógeno) completa el dispositivo. La superficie será recargable usando una célula solar y, por tanto, el dispositivo será capaz de generar hidrógeno usando únicamente luz solar y agua.

Desde el inicio de este proyecto se ha desarrollado un método eficiente para la incorporación del fragmento [Fe,Fe] característico de los miméticos de hidrogenasa a diferentes sustratos, incluyendo nucleótidos, nucleosidos, BODIPYs, metalocenos, etc usando una reacción de azidas y alquinos catalizada por cobre. El comportamiento de los productos obtenidos frente a ácidos nos ha permitido proponer un nuevo mecanismo para la generación electrocalítica de hidrógeno. Adicionalmente, hemos desarrollado un método fotoquímico capaz de incorporar al complejo [Fe,Fe] prácticamente cualquier subunidad orgánica, produciendo miméticos que portan grupos funcionales. Paralelamente, un estudio químico-físico sobre el cluster de hidrogenasa nos ha permitido determinar los efectos electrónicos de diferentes sustituyentes sobre este cluster. Este estudio permite predecir el efecto de nuevos sustituyentes sobre los potenciales de reducción de estos sistemas. Por último, hemos preparado nanopartículas de oro, níquel y cobalto contenido [Fe,Fe] clústeres en su superficie, así como sistemas discretos de polioxisiloxanos contenido hasta 16 átomos de hierro. La caracterización y las propiedades de estos nuevos materiales se están estudiando en estos momentos en nuestros laboratorios.

Fotoproducción de hidrógeno con clústeres cuánticos atómicos utilizando luz visible

Investigador Principal: Carlos Vázquez Vázquez

Centro de Investigación: Instituto de Investigaciones Tecnológicas. Laboratorio NANOMAG. Santiago de Compostela (A Coruña).

En la actualidad, es imprescindible encontrar energías alternativas que sustituyan a los combustibles fósiles, y el hidrógeno es la mejor elección como combustible, tanto desde el punto de vista de eficiencia energética, como desde el impacto ambiental. En este pro-

Producción Científica

7

Artículos generados en revistas

4

Comunicaciones en congresos nacionales

3

Comunicaciones en congresos internacionales



yecto se pretende investigar y proponer soluciones viables para la captación de energía solar y su conversión en hidrógeno, aprovechando diferentes características de los clústeres cuánticos atómicos (AQC). Los AQC consisten en grupos de átomos metálicos de composiciones bien definidas y con una o muy pocas estructuras geométricas estables. Presentan niveles discretos de energía y tienen un comportamiento similar a materiales semiconductores

(dióxido de titanio, óxido de zinc,...). Debido a ello, los clústeres cuánticos atómicos presentan actividad photocatalítica y se pretende usarlos en este proyecto para desarrollar sistemas eficientes de captación de energía solar y su conversión en hidrógeno, que podrá ser usado como combustible.

Durante el año 2018, se ha continuado con la síntesis y optimización de los métodos de síntesis de AQC de varios tamaños. Basado en las nuevas metodologías de síntesis químicas y fotoquímicas, se ha presentado una patente internacional (PCT) con título “Process for producing atomic quantum clusters (EP18382038.0)”.

Por otro lado, se han sintetizando y caracterizando materiales semiconductores de tamaños nanométricos (TiO_2 , ZnO , Fe_3O_4 , Cu_2O) mediante diferentes estrategias de química suave en disolución. Así mismo, se ha trabajado en la obtención de compuestos formados por combinaciones de dos tipos de materiales semiconductores; por ejemplo, $TiO_2-Fe_3O_4$, $ZnO-Fe_3O_4$, $ZnO-Cu_2O$, al objeto de aumentar el intervalo de absorción de la luz solar.

Además, se han realizado estudios teóricos y experimentales de deposición de AQC sobre varios materiales semiconductores. Se ha comprobado que al depositar clústeres de Cu5 sobre nanopartículas de TiO2 es posible extender la absorción del material fotoactivo a la región visible.

Respecto a la fotoproducción de hidrógeno, se está trabajando en la optimización del proceso y se ha comprobado que la mayoría de los agentes eliminadores de huecos (hole scavengers) producen hidrógeno en la región UV. Se espera que este efecto no deseado se elimine o reduzca considerablemente al trabajar en la región visible o UV próxima.

Producción Científica

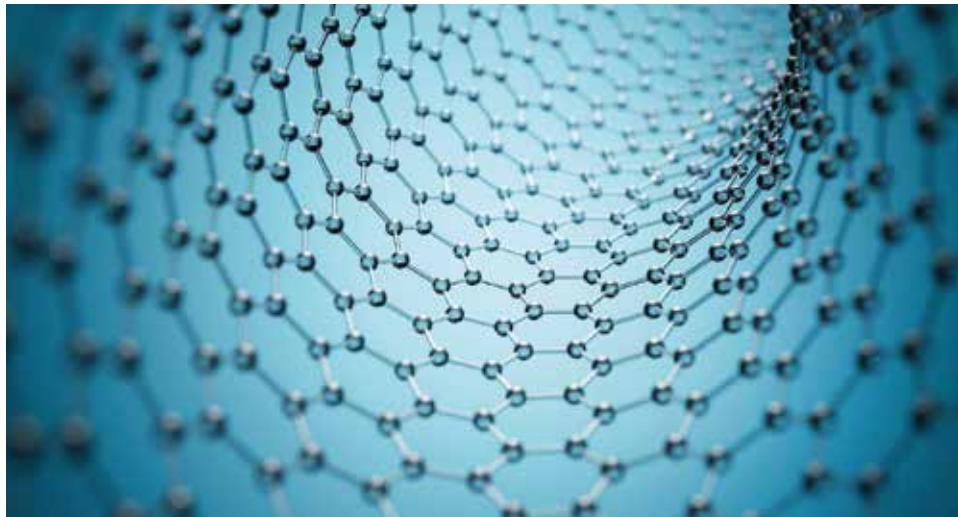
3

Artículos generados en revistas

5

Comunicaciones en congresos internacionales

9. GRAFENO, FUNDAMENTOS Y APLICACIONES



Biomateriales basados en grafeno: macrófagos: caracterización funcional para su aplicación en patología cardiovascular

Investigador Principal: Lisardo Boscá Gomar

Centro de Investigación: Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC-UAM. Madrid.

El proyecto se orienta a la comprensión de la interacción entre el grafeno y los macrófagos, y cómo este puede modificar su función biológica. La homeostasis de los macrófagos es



importante para regular reacciones adversas, como la fibrosis en el sistema cardiovascular, tras infarto o cuando se aplican dispositivos destinados a mantener el flujo sanguíneo o estabilizar los ateromas. Nuestra hipótesis es que los macrófagos ofrecen propiedades únicas para ser moduladas por el grafeno y esta interacción puede evitar complicaciones asociadas a varias disfunciones en patología cardiovascular: mejora de la estabilidad de la placa, regulación de la fibrosis y mejor capacidad de regeneración del corazón dañado.

Para estos fines, se han utilizado varias preparaciones de grafeno: grafeno policristalino, monocapas bidimensionales o sobre soportes tridimensionales y espumas multicapa de grafeno (nanoplaquetas). Sobre estas matrices se han unido macrófagos humanos y se ha evaluado la viabilidad celular, la expresión de genes implicados en la polarización funcional proinflamatoria y de resolución. El grafeno en capas no alteró el perfil de polarización de los macrófagos ni influyó en la viabilidad celular. Las nanoplaquetas de grafeno se incorporan rápidamente en las estructuras endosómicas de los macrófagos, que muestran una mejor supervivencia que las células de control correspondientes cuando se enfrentan a diferentes estímulos pro-apoptóticos. La determinación de las corrientes electrofisiológicas de los macrófagos cargados con grafeno o adheridos al mismo retenía las características de las corrientes de potasio ($Kv1.3$, $Kv1.5$ y $Kir 2.1$). Además, la presencia de grafeno, en cualquiera de las formas analizadas, no promueve una respuesta fibrótica de los macrófagos o en el reclutamiento de fibroblastos, lo que sugiere una ausencia de efectos profibróticos adversos. Por ello, las matrices de grafeno podrían definir nuevas estrategias en patología cardiovascular.

Controlando el magnetismo y transporte eléctrico en muestras de grafeno caracterizadas a la escala atómica

Investigador Principal: Iván Brihuega Álvarez

Centro de Investigación: Universidad Autónoma de Madrid.



Nuestro proyecto ambiciona caracterizar y manipular, con precisión atómica, el magnetismo inducido en grafeno mediante átomos de hidrógeno, pudiendo estudiar a su vez el transporte eléctrico en dichas muestras. Para ello, estamos construyendo un nuevo microscopio de efecto túnel (STM), específicamente diseñado para medir con resolución atómica la misma región de la muestra desde 4K hasta 400K, así como para posicionarse, con precisión de unas pocas micras, en una zona determinada de la muestra.

Tras comprobar, experimentalmente, el correcto funcionamiento, todos los desarrollos específicamente diseñados para el nuevo microscopio, estamos ahora ensamblando el sistema completo para poder así verificar su funcionamiento definitivo.

En paralelo a la construcción del nuevo sistema, hemos desarrollado una nueva metodología para litografiar grafeno con una precisión sub-nanométrica. Esto nos ha permitido confinar cuánticamente las quasipartículas de Dirac sin masa existentes en este material. La posibilidad de litografiar grafeno ha atraído un enorme interés entre la comunidad científica, ya que permite modificar de forma selectiva sus propiedades. Sin embargo, hasta ahora, no había sido posible crear estructuras de grafeno por debajo de 10 nanómetros. En el primer año del proyecto, demostramos que, usando una punta de STM, los átomos de H pueden ser manipulados a voluntad sobre la superficie del grafeno. En este segundo año, hemos ido un paso más allá, encontrando una metodología para crear nanopatrones de grafeno con precisión sub-nanométrica, mediante la manipulación colectiva de un gran número de átomos de H. Hemos medido las propiedades electrónicas de las nanoestructuras de grafeno así creadas, demostrando que estas confinan las quasipartículas de grafeno de forma muy eficiente, lo que da lugar a la aparición de gaps de energía perfectamente definidos. A fin de entender los mecanismos involucrados en el proceso de manipulación, hemos implementado las ecuaciones para el cálculo de las fuerzas en una situación fuera del equilibrio. Esta implementación puede ahora usarse, por ejemplo, para calcular la posibilidad de modificar la distancia entre capas de grafeno mediante la aplicación de una diferencia de voltaje entre las mismas.

Producción Científica

2

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

1

Comunicaciones en congresos internacionales

Producción Científica

5

Artículos generados en revistas

6

Comunicaciones en congresos nacionales

6

Comunicaciones en congresos internacionales

Interfaces neurales flexibles basadas en grafeno para el sistema nervioso periférico

Investigador Principal: José Antonio Garrido Ariza

Centro de Investigación: Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología. Bellaterra, Barcelona.



Después de la amputación de una parte del cuerpo, los pacientes padecen una reducción importante de sus funciones motoras y sensoriales y ven mermada su capacidad para llevar a cabo diferentes actividades. Existen neuroprótesis que pueden ser implantadas para reemplazar la extremidad amputada, que están diseñadas para vincular el sistema nervioso humano con prótesis electrónicas o robóticas, consiguiendo así restaurar las funciones motoras y sensoriales. Estos sistemas neuroprotésicos incluyen una interfaz con el nervio periférico que requiere un flujo de información entre el sistema nervioso del usuario y el dispositivo rápido, selectivo y bidireccional. Sin embargo, los estrictos requisitos para las tecnologías que se utilizan en estas interfaces, así como para los materiales que las componen, ralentizan el progreso en este campo.

Este proyecto tiene como objetivo explorar la tecnología basada en grafeno en dispositivos para prótesis neuronales, con un enfoque especial en la interfaz electrónica del sistema nervioso periférico. En este sentido, los principales objetivos del proyecto son: desarrollar la tecnología para la fabricación de sensores de grafeno y dispositivos de estimulación sobre sustratos flexibles, y evaluar la eficacia de la comunicación eléctrica bidireccional de estos sensores y dispositivos de grafeno en el sistema nervioso periférico, en particular en el nervio ciático de ratas adultas.

Durante el primer año, se implantó un primer prototipo de interfaz neural para evaluar la biocompatibilidad del grafeno *in vivo*. Además, se desarrolló un nuevo material a base de grafeno que exhibe propiedades sobresalientes para la estimulación y el registro. En este segundo período, el proceso de deposición de grafeno se ha optimizado para producir el segundo prototipo de electrodos nerviosos con una fiabilidad aceptable. Los primeros experimentos agudos están previstos para comenzar en los próximos meses. Posteriormente, se realizarán estudios crónicos para evaluar la funcionalidad a largo plazo y la biocompatibilidad.



Producción Científica

1

Artículos generados en revistas

2

Comunicaciones en congresos nacionales

6

Comunicaciones en congresos internacionales