

— **S U P L E M E N T O**

I SIMPOSIO · JÓVENES INVESTIGADORES

*INSTITUTO DE ESPAÑA*

*Desde 1879*

**A N A L E S**  
DE LA  
**REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA**  
**DE ESPAÑA**



**S U P L E M E N T O**

**Nº 138 (03)**

DOI: 10.32440/ar.2021.138.03.sup101

An RANM · 138.03 · Supl.01 **AÑO 2021** [SEGUNDA ÉPOCA]



**REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA DE ESPAÑA**

Revista editada por:



REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA DE ESPAÑA

Calle de Arrieta, 12. 28013 - MADRID

Teléfonos: 91 547 03 18 - 91 547 03 19

Fax: 91 547 03 20

Depósito Legal: M. 5.020.—1958

I.S.S.N. 0034-0634

**Presidente Comité Editorial**

Eduardo Díaz-Rubio García  
*Presidente de la Real Academia  
Nacional de Medicina de España*

**Directora Científica**

María Castellano Arroyo  
*Académica de Número de la Real Academia  
Nacional de Medicina de España*

**Editora Jefe**

Ana M<sup>a</sup> Villegas Martínez  
*Académica de Número de la Real Academia  
Nacional de Medicina de España*

**Consejo Editorial**

Eduardo Díaz-Rubio García  
Manuel Díaz-Rubio García  
Antonio Campos Muñoz  
José Miguel García Sagredo  
José Luis Carreras Delgado  
Ana M<sup>a</sup> Villegas Martínez  
Francisco José Rubia Vila  
Julián García Sánchez

**Coordinación**

Nuria Iglesias Rodríguez  
Luis Javier Aróstegui Plaza

**Diseño y maquetación**

M. Nieves Gallardo Collado  
Montse López Ferres

**Producción**



**Comité Científico**

Pedro Sánchez García · *Farmacología*  
José Antonio Clavero Núñez · *Obstetricia*  
Joaquín Poch Broto · *Otorrinolaringología*  
Diego M. Gracia Guillén · *Bioética*  
Gonzalo Piédrola Angulo · *Epidemiología Hospitalaria*  
Juan del Rey Calero · *Microbiología y Parasitología Médica*  
Jesús A. Fernández-Tresguerres Hernández · *Endocrinología Experimental*  
Emilio Gómez de la Concha · *Inmunología Clínica*  
Enrique Casado de Frías · *Pediatría*  
Francisco José Rubia Vila · *Fisiología*  
Manuel Díaz-Rubio García · *Medicina Interna*  
Guillermo Suárez Fernández · *Ciencias Veterinarias*  
Luis Pablo Rodríguez Rodríguez · *Rehabilitación*  
Miguel Lucas Tomás · *Estomatología*  
José Luis Carreras Delgado · *Medicina Física*  
Julián García Sánchez · *Oftalmología*  
Enrique Moreno González · *Cirugía General*  
Francisco González de Posada · *Arquitectura e Ingeniería Sanitarias*  
María del Carmen Maroto Vela · *Microbiología y Parasitología Médica*  
Enrique Blázquez Fernández · *Biología Molecular*  
Federico Mayor Zaragoza · *Farmacología*  
Antonio Campos Muñoz · *Histología*  
Carlos Seoane Prado · *Ciencias Químicas*  
Manuel Escudero Fernández · *Ginecología*  
José Ramón de Berrazueta Fernández · *Cardiología*  
Eduardo Díaz-Rubio García · *Oncología*  
Vicente Calatayud Maldonado · *Neurocirugía*  
José Miguel García Sagredo · *Genética Humana*  
Alberto Galindo Tixaire · *Ciencias Físicas*  
José Manuel Ribera Casado · *Gerontología y Geriátrica*  
María Castellano Arroyo · *Medicina Legal*  
Gabriel Téllez de Peralta · *Cirugía Torácica*  
Santiago Ramón y Cajal Agüeras · *Anatomía Patológica*  
Ana María Villegas Martínez · *Hematología y Hemoterapia*  
Luis Martí Bonmatí · *Radiología y Radiodiagnóstico*  
Javier Sanz Serrulla · *Historia de la Medicina*  
José A. Obeso Inchausti · *Neurología*  
Arturo Fernández-Cruz Pérez · *Medicina Social*  
José Antonio Rodríguez Montes · *Cirugía General*  
Pedro Guillén García · *Traumatología y Cirugía Ortopédica*  
Miguel Sánchez García · *Medicina Intensiva*  
Jorge Alvar Ezquerro · *Medicina Preventiva y Social*  
Miguel Sánchez García · *Medicina Intensiva*  
Fernando Gilsanz Rodríguez · *Anestesiología y Reanimación*  
María Trinidad Herrero Ezquerro · *Anatomía*



REAL ACADEMIA NACIONAL  
DE MEDICINA DE ESPAÑA

Protección de datos: Anales RANM declara cumplir lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. Papel ecológico libre de cloro.

Esta publicación se imprime en papel no ácido.

This publication is printed in acid-free paper.

Impreso en Europa.

Depósito Legal: M. 5.020.—1958

I.S.S.N. 0034-0634

Publicación cuatrimestral

(3 números al año)

© 2021. Anales RANM

Reservados todos los derechos. El contenido de la presente publicación no puede ser reproducido, ni transmitido por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética, ni registrado por ningún sistema de recuperación de información, en ninguna forma, ni por ningún medio, sin la previa autorización por escrito del titular de los derechos de explotación de la misma.

Anales RANM, a los efectos previstos en el artículo 32.1 párrafo segundo del vigente TRLPI, se opone de forma expresa al uso parcial o total de las páginas de Anales RANM con el propósito de elaborar resúmenes de prensa con fines comerciales.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra sólo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.

**Disponible en internet:**

**[www.analesranm.es](http://www.analesranm.es)**

Atención al lector:

[infoanales@analesranm.es](mailto:infoanales@analesranm.es)

Anales RANM.

Calle de Arrieta, 12. 28013

MADRID

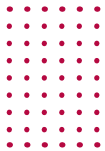
Teléfono: +34 91 159 47 34

Fax: 91 547 03 20

# ̄ S U P L E M E N T O

## I SIMPOSIO · JÓVENES INVESTIGADORES

### MARCO Y JUSTIFICACIÓN



La Real Academia Nacional de Medicina de España (RANM) y la Fundación Teófilo Hernando (FTH), firmaron un convenio para dar voz a los jóvenes investigadores. Se creó, para ello, el Foro “Teófilo Hernando” de Jóvenes Investigadores (FJI). El foro se bautizó con el nombre de don Teófilo Hernando, el adelantado de la farmacología española, que la introdujo en las universidades como materia docente y científica en el primer tercio del siglo XX. Fue académico de número de la RANM.

Los requisitos para incorporarse a este Foro incluían disponer de medios suficientes para mantener un grupo de investigación independiente y haber hecho estancias posdoctorales en centros de relieve internacional. Asimismo, la selección se hizo en base a la práctica de ciencia de calidad en España, competitiva a nivel internacional. Los jóvenes seleccionados (alrededor de 35-40 años de edad) debían impartir en la RANM una conferencia sobre su trabajo original de 45 minutos seguida de un amplio debate. A los investigadores se les otorgaba una medalla de la RANM y un diploma.

En el periodo 2018-2020 se han incorporado al Foro 11 jóvenes investigadores, cuyos trabajos se desarrollan tanto en ciencias básicas como en especialidades médicas. Trabajan en temas muy diversos, desde la biología estructural de proteínas pasando por la identificación de dianas con interés farmacoterápico, hasta enfermedades en distintos campos médicos.

Llegados a este punto, parece oportuno y deseable que esta rica gama de conocimientos, expuesta en las sesiones del Foro, celebradas en la RANM en el periodo 2018-2021, se integren de forma más próxima en el “I Simposio de Jóvenes Investigadores” de la RANM. Ello facilitará el encuentro de esos jóvenes investigadores que trabajan en distintos temas biomédicos y lugares, lo que facilitará el establecimiento de posibles colaboraciones entre ellos y con la RANME.

El Simposio se celebrará el miércoles 17 y jueves 18 de noviembre de 2021. El programa se estructura en breves ponencias de los nueve miembros del Foro (15 minutos + 5 minutos de discusión) y 1 hora para el café, visita y discusión de los pósteres. Los pósteres los presentarán los colaboradores de los miembros del Foro y se resumirán en una sesión oral. Habrá 3 premios para los mejores pósteres.



# I SIMPOSIO JÓVENES INVESTIGADORES

## Comité Organizador

**Presidente** **Rafael León Martínez**  
Científico Titular  
Instituto de Química Médica, CSIC

**Vice-Presidenta** **Jara Pérez Jiménez**  
Científico Titular  
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, CSIC

**Vocales** **Sandra Jurado Sánchez**  
Científico Titular  
Instituto de Neurociencias, CSIC-UMH

**Enrique J. Cobos del Moral**  
Profesor Titular  
Facultad de Medicina, Universidad de Granada

**Pablo Pelegín Vivancos**  
Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, Universidad de Murcia

**Gestión** **Arturo García de Diego**  
Director Fundación Teófilo Hernando  
Instituto-Fundación Teófilo Hernando, UAM, Madrid

**Francisco José Fernández**  
Gerente Real Academia Nacional de Medicina de España, Madrid

**Luis Arostegui Plaza**  
Producción Técnica y Comunicación Real Academia Nacional de Medicina de España, Madrid

## Comisión Científica

**Presidente** **Eduardo Díaz-Rubio**  
Presidente de la RANME  
Académico de Número de la RANME  
Catedrático Emérito de Oncología. Universidad Complutense de Madrid

**Vocales** **Pedro Sánchez García**  
Académico de Número de la RANME. Catedrático Emérito de Farmacología  
Universidad Autónoma de Madrid. Presidente de Honor de la FTH

**José Miguel García Sagredo**  
Académico de Número de la RANME. Secretario General de la RANME  
Profesor Honorario, Universidad de Alcalá de Henares

**Antonio García García**  
Académico Correspondiente Honorario de la RANME. Presidente de la FTH  
Catedrático Emérito de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid

**Secretaria** **Manuela García López**  
Directora del Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento  
Catedrática de Farmacología  
Universidad Autónoma de Madrid

## Miembros del Foro

Enrique J. Cobos del Moral  
Rafael Fernández Leiro  
Juan Fortea Ormaechea  
Sandra Jurado Sánchez

Jordi Poater Teixidor  
Dolores Sánchez Niño  
Rafael León Martínez  
Pablo Pelegrín Vivancos

Jara Pérez Jiménez  
Alberto Ocaña Fernández  
Andrés A. Maldonado Morillo



# PROGRAMA

## Miércoles, 17/11/2021

**12:00** Inscripción y recogida de documentación

**12:30** Bienvenida  
**Eduardo Díaz-Rubio García**  
Presidente de la RANME

[ **Sesión I. Nuevos desarrollos en neurociencia**  
(Moderadores: Francisco José Rubia Vila, Antonio G. García, Enrique Cobos)

**13:00** La enfermedad de Alzheimer asociada al síndrome de Down  
**Juan Fortea Ormaechea**  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pablo, Barcelona

**13:20** Mecanismos de plasticidad y neuromodulación sináptica: Implicación en enfermedades neurológicas  
**Sandra Jurado Sánchez**  
Instituto de Neurociencias, CSIC-UMH, Alicante

**13:40** Desarrollo de fármacos multidiana para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.  
**Rafael León Martínez**  
Instituto de Química Médica, CSIC, Madrid

**14:00** **Fin de la Sesión I**

[ **Sesión II. Aproximaciones transversales al dolor y la inflamación**  
(Moderadores: José Manuel Ribera Casado, Manuela G. López, Sandra Jurado)

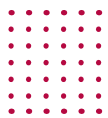
**16:00** Implicación del inflammasoma NLRP3 en sepsis  
**Pablo Pelegrín Vivancos**  
Hospital Virgen de la Arrixaca, Universidad de Murcia

**16:20** Interacciones neuroinmunitarias en el dolor crónico: modulación por los receptores sigma-1  
**Enrique Cobos del Moral**  
Universidad de Granada

**16:40** Reconstrucción quirúrgica del nervio periférico  
**Andrés Maldonado**  
Hospital Universitario de Getafe, Madrid

**17:00** Polifenoles de la dieta como potenciales coadyuvantes en patologías cardiometabólicas  
**Jara Pérez Jiménez**  
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, CSIC, Madrid

**17:30-19:00** **Sesión de Pósteres (10 comunicaciones)**



# PROGRAMA

Jueves, 18/11/2021

## [ Sesión III. Nuevas metodologías fundamentales y estrategias terapéuticas

(Moderadores: José Miguel García Sagredo, Pedro Sánchez García, Pablo Pelegrín)

**09:30** Mecanismo de reconocimiento molecular de la trimetil-lisina a partir de sistemas aromáticos fluorados

**Jordi Poater Teixidor**

Instituto de Química Teórica y Computacional, Universidad de Barcelona, Barcelona

**09:50** Crio-microscopía electrónica y su papel en investigación biomédica

**Rafael Fernández Leiro**

Centro Nacional de Investigación Oncológica, CNIO, Madrid

**10:10** Modulación terapéutica del factor anti-envejecimiento Klotho

**María Dolores Sánchez Niño**

IIS-Fundación Jiménez Díaz. Dpto. Farmacología, UAM, Madrid

**10:30** Desarrollo de nuevas estrategias para superar la resistencia a los fármacos antitumorales

**Eva María Galán Moya**

Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), UCLM, Albacete.

**10:50-12:30** **Sesión de Pósteres (10 comunicaciones)**

**12:30** Entrega de premios a los 3 mejores pósteres y clausura

**Eduardo Díaz-Rubio García**

Presidente de la RANME



**RANME**  
SOCIÉTAT D'INVESTIGADORS



# índice

MECANISMO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE LA TRIMETILISINA MEDIANTE PROTEÍNAS LECTORAS EPIGENÉTICAS MECHANISM OF BIOMOLECULAR RECOGNITION OF TRIMETHYLLYSINE BY EPIGENETIC READER PROTEINS Jordi Poater	11
INTERACCIONES NEUROINMUNITARIAS EN EL DOLOR NEUROPÁTICO: MODULACIÓN POR LOS RECEPTORES SIGMA-1 NEUROIMMUNEINTERACTIONS IN NEUROPATHIC PAIN: MODULATION BY SIGMA-1 RECEPTORS Enrique J. Cobos del Moral	11
RECEPTORES $\sigma$ 1 Y MODULACIÓN DEL DOLOR: UN “PUENTE” ENTRE EL RECEPTOR OPIOIDE $\mu$ Y EL TRPV1 $\sigma$ 1 RECEPTORS AND PAIN MODULATION: A “BRIDGE” BETWEEN THE $\mu$ -OPIOID RECEPTOR AND TRPV1 M. Carmen Ruiz-Cantero et al.	13
LA LAPAROTOMÍA EN EL RATÓN: UN MODELO DE DOLOR POSTOPERATORIO TRASLACIONAL LAPAROTOMY IN THE MOUSE: A MODEL OF TRANSLATIONAL POSTOPERATIVE PAIN Miriam Santos-Caballero et al.	15
MECANISMOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA Y NEUROMODULACIÓN: IMPLICACIONES EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS MECHANISMS OF SYNAPTIC PLASTICITY AND NEUROMODULATION: IMPLICATION IN NEUROLOGICAL DISEASE Sandra Jurado Sánchez	16
DESARROLLO Y PLASTICIDAD DE LOS SISTEMAS DE OXITOCINA Y VASOPRESINA EN EL HIPOTÁLAMO DEVELOPMENT AND PLASTICITY OF THE HYPOTHALAMIC OXYTOCINERGIC AND VASOPRESSINERGIC SYSTEMS M.P. Madrigal, S. Jurado	18
DINÁMICA Y MECANISMO MOLECULAR DE LA LIBERACIÓN DE OXITOCINA EN NEURONAS HIPOTALÁMICAS DYNAMICS AND MOLECULAR MECHANISM OF OXYTOCIN RELEASE IN HYPOTHALAMIC NEURONS Aznar-Escolano B., Madrigal M.P., Jurado S.	20
POLIFENOLES DE LA DIETA COMO POTENCIALES COADYUVANTES EN PATOLOGÍAS CARDIOMETABÓLICAS DIETARY POLYPHENOLS AS POTENTIAL COADJUVANTS IN CARDIOMETABOLIC PATHOLOGIES Jara Pérez-Jiménez	22
PAPEL DE LOS MICRORNAs EN LA RESPUESTA A UNA SUPLEMENTACIÓN CON ORUJO DE UVA EN EL CONTROL GLUCÉMICO INVOLVEMENT OF MICRORNAs IN THE RESPONSE TO GRAPE POMACE SUPPLEMENTATION REGARDING GLUCOSE HOMEOSTASIS Léniz A. et al.	23
EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO DE LOS FLAVANOLES EN EL METABOLISMO POSTPRANDIAL DE SUJETOS CON DIABETES TIPO 2 PRELIMINARY EVALUATION OF FLAVANOL EFFECTS ON POSTPRANDIAL METABOLISM IN SUBJECTS WITH TYPE 2 DIABETES Esther García-Díez et al.	26
IMPLICACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN SEPSIS IMPLICATION OF THE NLRP3 INFLAMMASOME IN SEPSIS Pablo Pelegrín	28
ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 CON MUTACIONES PRESENTES EN EL SÍNDROME PERIÓDICO ASOCIADO A CRIOPYRINA ACTIVATION AND REGULATION OF THE NLRP3 INFLAMMASOME WITH MUTATIONS LINKED TO CRYOPYRIN ASSOCIATED PERIODIC SYNDROMES Cristina Molina-López et al.	29
ACTIVACIÓN DE LOS INFLAMASOMAS PIRINA Y NLRP3 DURANTE LA SEPSIS ACTIVATION OF THE PYRIN AND NLRP3 INFLAMMASOMES DURING SEPSIS Laura Hurtado-Navarro et al.	31



LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN EL SÍNDROME DE DOWN: UNA FORMA DE ALZHEIMER GENÉTICAMENTE DETERMINADA ..... 35 DOWN SYNDROME ASSOCIATED ALZHEIMER'S DISEASE: A GENETICALLY DETERMINED FORM OF DEMENTIA Juan Fortea	35
AMYQ: UN ÍNDICE INDEPENDIENTE DE RM PARA ESTANDARIZAR LA CARGA DE AMILOIDE EN EL CEREBRO ..... 36 AMYQ: AN MRI-INDEPENDENT INDEX TO STANDARDIZE AMYLOID LOAD IN THE BRAIN Jordi Pegueroles et al.	36
MICROINFARTOS CORTICALES A LO LARGO DEL ESPECTRO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN ADULTOS CON SÍNDROME DE DOWN ..... 37 CORTICAL MICROINFARCTS ALONG THE ALZHEIMER'S DISEASE CONTINUUM IN ADULTS WITH DOWN SYNDROME Mateus Rozalem Aranha et al.	37
DESARROLLO DE FÁRMACOS MULTIDIANA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS ..... 38 MULTITARGET DRUG DEVELOPMENT FOR THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES Rafael León	38
NUEVOS INDUCTORES DE NRF2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON ..... 39 NOVEL NRF2 INDUCERS FOR THE TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE Pablo Duarte et al.	39
DESARROLLO DE NUEVOS COMPUESTOS MULTIDIANA DIRIGIDOS AL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ..... 40 DEVELOPMENT OF NEW MULTITARGET COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE Enrique Crisman et al.	40
DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA SUPERAR LA RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS ANTITUMORALES ..... 42 DEVELOPMENT OF NOVEL STRATEGIES TO OVERCOME RESISTANCE TO ANTICANCER DRUGS Miriam Nuncia-Cantarero et al.	42
USO DE INHIBIDORES DE PROTEÍNAS BET PARA CONTROLAR LA RESISTENCIA ADQUIRIDA EN TUMORES MAMARIOS ..... 43 USE OF BET PROTEIN INHIBITORS TO CONTROL ACQUIRED RESISTANCE IN MAMMARY TUMORS David Tebar-García et al.	43
EL USO DE INHIBIDORES EPIGENÉTICOS POTENCIA EL EFECTO DE LA TEMOZOLAMIDA EN MODELOS 2D Y 3D DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME ..... 44 THE USE OF EPIGENETIC INHIBITORS ENHANCES THE EFFECT OF TEMOZOLOMIDE IN 2D AND 3D MODELS OF GLIOBLASTOMA MULTIFORME Raquel López-Rosa et al.	44
RETOS EN CIRUGÍA DEL NERVI PERIFÉRICO. VISIÓN DEL CIRUJANO ..... 45 CHALLENGES IN PERIPHERAL NERVE SURGERY. THE SURGEON'S VIEW Lara Cristóbal et al.	45
MODULACIÓN TERAPÉUTICA DE LA PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE KLOTHO PARA RETRASAR EL ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD RENAL ..... 46 THERAPEUTIC MODULATION OF ENDOGENOUS KIDNEY KLOTHO EXPRESSION TO DELAY BIOLOGICAL AGING IN CHRONIC KIDNEY DISEASE Maria Dolores Sánchez Niño	46
PAPEL NEFROPROTECTOR DE CD74 EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA ..... 46 PROTECTIVE ROLE OF CD74 IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC KIDNEY DISEASE Maria Ignacia Ceballos Darnaude et al.	46
GDF15 MANTIENE LA EXPRESIÓN DE KLOTHO EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA Y LA FIBROSIS RENAL ..... 47 GDF15 PRESERVES KLOTHO EXPRESSION IN ACUTE KIDNEY INJURY AND KIDNEY FIBROSIS Lara Valiño-Rivas et al.	47

**LA OBRA DE REFERENCIA  
DE LEXICOGRAFÍA MÉDICA  
EN ESPAÑOL**

**D**ICCIONARIO  
DE  
**M**ÉRMINOS  
**M**ÉDICOS

CASI **52000 ENTRADAS**

CERCA DE  
**30000 SINÓNIMOS**

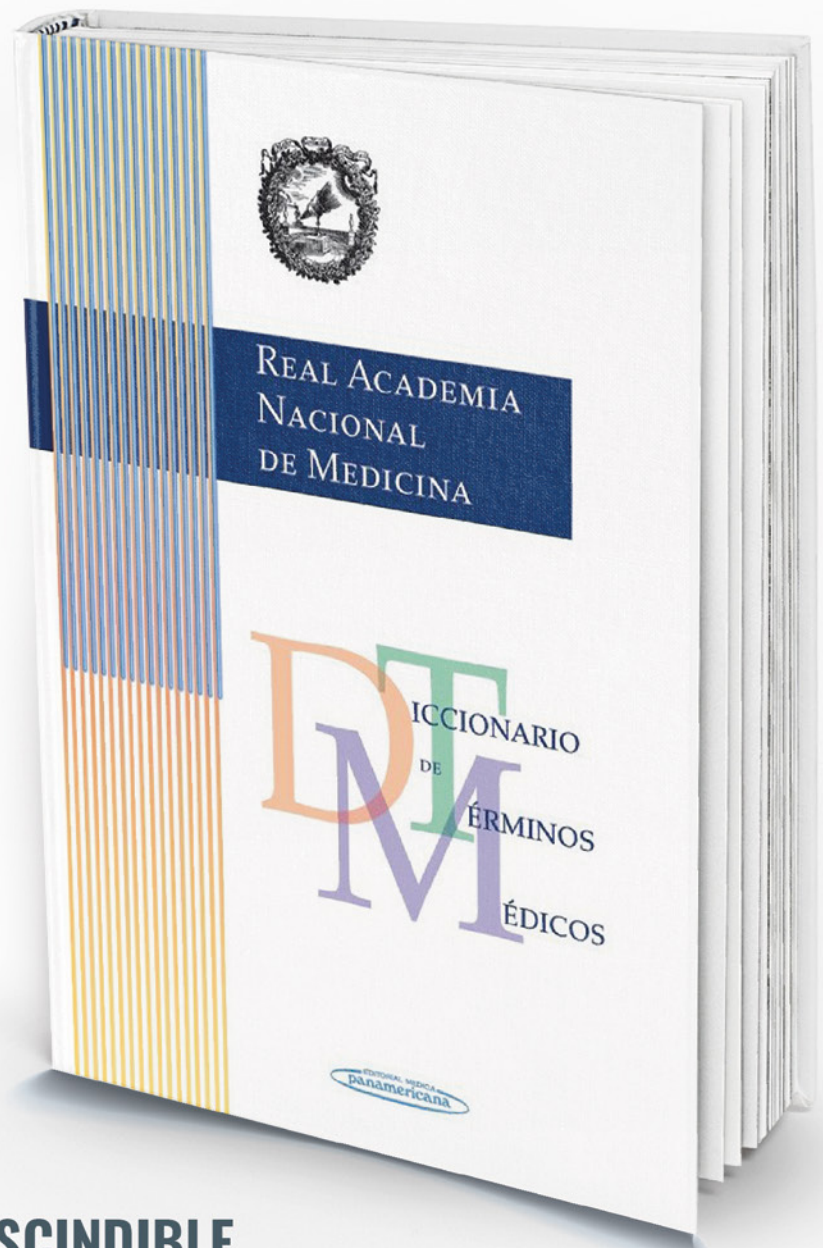
INFORMACIÓN ETIMOLÓGICA  
DE **7000 TÉRMINOS**

**27000 OBSERVACIONES**  
LINGÜÍSTICAS

EQUIVALENTES DE LOS  
**TÉRMINOS EN INGLÉS**

ETIMOLOGÍAS, SIGLAS,  
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

**VERSIÓN ELECTRÓNICA**



**UNA OBRA IMPRESCINDIBLE  
PARA TODOS LOS PROFESIONALES  
DE LA SALUD**



REAL ACADEMIA NACIONAL  
DE MEDICINA DE ESPAÑA

EDITORIAL MEDICA  
**panamericana**

**MECANISMO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE LA TRIMETILLISINA MEDIANTE PROTEÍNAS LECTORAS EPIGENÉTICAS****MECHANISM OF BIOMOLECULAR RECOGNITION OF TRIMETHYLlysINE BY EPIGENETIC READER PROTEINS***Jordi Poater**Departament de Química Inorgànica i Orgànica & IQTCUB, Universitat de Barcelona*

La comprensión del reconocimiento biomolecular de proteínas histonas modificadas postraduccionalmente es de vital importancia para la hipótesis del código de histonas. A pesar de los extensos estudios estructurales y de unión sobre la lectura de histonas, el lenguaje molecular mediante el cual se leen las modificaciones postraduccionales en las proteínas histonas sigue siendo poco conocido. Aquí presentamos estudios de química físico-orgánica sobre el reconocimiento de la trimetilisina cargada positivamente por un sistema aromático rico en electrones. El carácter aromático de dos residuos de triptófano que constituyen únicamente el sistema aromático de KDM5A se modificó mediante la incorporación de sustituyentes de flúor. Este trabajo demuestra que el reconocimiento biomolecular de trimetilisina mediante distintos sistemas aromáticos está asociado con interacciones catión- $\pi$  más débiles que son compensadas por la liberación mediada por trimetilisina energéticamente más favorable de moléculas de agua.

Por otro lado, buscamos establecer si la trimetilialisina, un análogo de la trimetilisina generado a través de la alquilación de cisteína, es un buen mimico de la trimetilisina para estudios sobre reconocimiento molecular por proteínas lectoras. Ambos péptidos de histona que contienen trimetilialisina y trimetilisina se han examinado para determinar su unión con cinco proteínas lectoras humanas empleando una combinación de análisis termodinámicos, simulaciones de dinámica molecular y análisis químico-cuánticos.

Colectivamente, nuestros hallazgos experimentales y computacionales revelan que la trimetilialisina y la trimetilisina exhiben características de unión muy similares para la asociación con proteínas lectoras humanas, lo que justifica el uso de trimetilialisina para estudios dirigidos a diseccionar el origen del reconocimiento biomolecular en procesos epigenéticos que desempeñan papeles importantes en humanos.

The understanding of biomolecular recognition of posttranslationally modified histone proteins is centrally important to the histone code hypothesis. Despite extensive binding and structural studies on the readout of histones, the molecular language by which posttranslational modifications on histone proteins are read remains poorly understood. Here

we report physical-organic chemistry studies on the recognition of the positively charged trimethyllysine by the electron-rich aromatic cage containing PHD3 finger of KDM5A. The aromatic character of two tryptophan residues that solely constitute the aromatic cage of KDM5A was fine-tuned by the incorporation of fluorine substituents. Our thermodynamic analyses reveal that the wild-type and fluorinated KDM5A PHD3 fingers associate equally well with trimethyllysine. This work demonstrates that the biomolecular recognition of trimethyllysine by fluorinated aromatic cages is associated with weaker cation- $\pi$  interactions that are compensated by the energetically more favourable trimethyllysine-mediated release of high-energy water molecules that occupy the aromatic cage.

On the other hand, we seek to establish whether trimethylthylisine, an analog of trimethyllysine generated through the alkylation of cysteine, is a good mimic of trimethyllysine for studies on molecular recognition by reader proteins. Both histone peptides that contain trimethylthylisine and trimethyllysine have been screened for binding to five human reader proteins using a combination of thermodynamic analysis, molecular dynamics simulations, and quantum-chemical analysis.

Collectively, our experimental and computational findings reveal that trimethylthylisine and trimethyllysine exhibit very similar binding characteristics for association with human reading proteins, which justifies the use of trimethyllysine for studies aimed at dissecting the origin of biomolecular recognition in epigenetic processes that perform important roles in humans.

**INTERACCIONES NEUROINMUNITARIAS EN EL DOLOR NEUROPÁTICO: MODULACIÓN POR LOS RECEPTORES SIGMA-1****NEUROIMMUNE INTERACTIONS IN NEUROPATHIC PAIN: MODULATION BY SIGMA-1 RECEPTORS***Enrique J. Cobos del Moral**Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada e Instituto de Investigación Biosanitaria ibs. GRANADA*

Las células inmunitarias y gliales juegan un papel muy relevante en el dolor crónico. Nuestro grupo de investigación (y por supuesto otros muchos) ha dedicado parte de su actividad al estudio de las interacciones entre neuronas y otros tipos de células en la generación del dolor crónico, y en particular del dolor neuropático. Cuando se produce un daño en un nervio, los somas de las neuronas sensoriales periféricas, localizados en los ganglios de las raíces dorsales (DRG, de sus siglas en inglés), emiten señales químicas que impulsan



la atracción de las células inmunitarias. Entre estas señales químicas destaca la quimioquina CCL-2, la cual es importante para el reclutamiento de los macrófagos al DRG. El daño nervioso no sólo produce la activación del sistema inmunitario innato, sino también la del sistema inmunitario adaptativo, puesto que reclutan células T a los DRG afectados. Esto, en su conjunto, produce un ambiente proinflamatorio muy acusado. Hemos demostrado que el desarrollo de alodinia mecánica en el ratón ocurre en paralelo a la expresión de marcadores inmunitarios en el DRG (determinados por microarrays), y de hecho, la eliminación de macrófagos o de células T produce una disminución considerable de la alodinia neuropática. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de las células inmunitarias en el desarrollo del dolor neuropático.

Por otro lado, el receptor sigma-1 es una proteína chaperona, la cual, tras su activación por el incremento del  $Ca^{2+}$  intracelular, migra desde localizaciones intracelulares a zonas cercanas a la membrana plasmática, donde modula un amplio abanico de receptores y canales iónicos neuronales. El papel del receptor sigma-1 en el dolor crónico ha sido estudiado en las últimas décadas. De hecho, en la actualidad hay un antagonista sigma-1 en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento del dolor (a cuyo desarrollo hemos contribuido), aunque sus mecanismos de acción analgésica no han sido totalmente dilucidados. Hemos demostrado recientemente que este receptor sigma-1 se localiza en todas las neuronas sensoriales periféricas, y que tras el daño nervioso se externaliza (lo cual indica su activación) especialmente en las neuronas lesionadas (ATF3+). Mediante el estudio del transcriptoma del DRG de ratones mutantes deficientes para el receptor sigma-1 (knockout sigma-1) tras el daño nervioso, determinamos que la inhibición de este receptor producía una disminución notable en transcritos indicativos de células inmunitarias (como macrófagos) y de diversas quimioquinas (como CCL-2) y de factores proinflamatorios. De hecho, los ratones knockout sigma-1 mostraron unos niveles marcadamente reducidos de macrófagos en el DRG tras el daño nervioso, así como una reducción de citoquinas proinflamatorias y de la alodinia neuropática.

Nuestros hallazgos indican que el receptor sigma-1 periférico juega un papel muy relevante en la interacción neuroinmunitaria en el DRG tras la lesión de un nervio periférico, y por lo tanto en los mecanismos fisiopatológicos del dolor neuropático, lo cual podría tener utilidad clínica.

**Agradecimientos:** Agencia Estatal de Investigación (10.13039/501100011033 - SAF2016-80540R y PID2019-108691RB-I00), Junta de Andalucía (grupo CTS-109 y proyecto P20.00132) y fondos FEDER.

Immune and glial cells play a very important role in chronic pain. Our research group (and of course

many others) has dedicated part of its activity to the study of the interactions between neurons and other cell types in the generation of chronic pain, and in particular neuropathic pain. When nerve damage occurs, the soma of peripheral sensory neurons, located in the dorsal root ganglia (DRG), release chemical signals that attract immune cells. Among these chemical signals, it is worth highlighting the chemokine CCL-2, as it is important for the recruitment of macrophages to the DRG. Nerve damage not only induces the activation of the innate immune system, but also the activity of the adaptive immune system, since there is a recruitment of T cells to the affected DRGs. This process, as a whole, results in a pronounced pro-inflammatory environment. We have shown that the development of mechanical allodynia in the mouse parallels with the expression of immune markers in the DRG (determined by microarrays), and in fact, depletion of macrophages or T cells produces a considerable decrease in neuropathic allodynia. These results highlight the importance of immune cells in the development of neuropathic pain.

On the other hand, the sigma-1 receptor is a chaperone protein, which, after its activation by the increase in intracellular  $Ca^{2+}$ , translocates from intracellular locations to areas close to the plasma membrane, where it modulates a wide variety of receptors and neuronal ion channels. The role of the sigma-1 receptor in chronic pain has been studied in the past decades. In fact, there is currently a sigma-1 antagonist in phase II clinical trials for pain treatment (and we have contributed to its preclinical development), although the mechanisms for its analgesic actions have not been fully elucidated. We have recently shown that this sigma-1 receptor is located in all peripheral sensory neurons, and that after nerve damage it is externalized (denoting its activation), especially in injured neurons (ATF3+). By studying the transcriptome of the DRG from mutant mice deficient for the sigma-1 receptor (sigma-1 knockout mice) after nerve damage, we found that sigma-1 receptor inhibition produced a marked decrease in transcripts from immune cells (such as macrophages) and of several chemokines (such as CCL-2) and pro-inflammatory factors. In fact, sigma-1 knockout mice showed markedly reduced levels of macrophages in the DRG after nerve injury, as well as a reduction in pro-inflammatory cytokines and neuropathic allodynia.

Our findings indicate that the peripheral sigma-1 receptor plays a very relevant role in the neuroimmune interactions in the DRG after peripheral nerve injury, and therefore in the pathophysiological mechanisms of neuropathic pain. These results might have a future clinical utility.

**Acknowledgments:** Spanish State Research Agency (10.13039/501100011033 - SAF2016-80540R and PID2019-108691RB-I00), Junta de Andalucía (group CTS-109 and grant P20.00132) and ERDF funds.

**RECEPTORES  $\sigma_1$  Y MODULACIÓN DEL DOLOR: UN "PUENTE" ENTRE EL RECEPTOR OPIOIDE  $\mu$  Y EL TRPV1**

**$\sigma_1$  RECEPTORS AND PAIN MODULATION: A "BRIDGE" BETWEEN THE  $\mu$ -OPIOID RECEPTOR AND TRPV1**

M. Carmen Ruiz-Cantero<sup>1</sup>, Elsa Cortés-Montero<sup>2</sup>, Aakanksha Jain<sup>3</sup>, Angeles Montilla-García<sup>1</sup>, Inmaculada Bravo-Caparrós<sup>1</sup>, Jaehoon Shim<sup>3</sup>, Pilar Sánchez-Blázquez<sup>2</sup>, Clifford J. Woolf<sup>3</sup>, José M. Baeyens<sup>1</sup>, Enrique J. Cobos<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Biomedical Research Center and Neurosciences Institute, University of Granada and Biosanitary Research Institute ibs.GRANADA, España.

<sup>2</sup> Departamento de Neurociencia Traslacional, Neurofarmacología, Instituto Cajal, CSIC, Madrid, España.

<sup>3</sup> Departamento de Neurobiología, Harvard Medical School, F.M. Kirby Neurobiology Center, Boston Children's Hospital, Boston, Estados Unidos.

<sup>4</sup> Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

Los alógenos químicos producidos durante el dolor patológico sensibilizan las neuronas sensoriales periféricas favoreciendo el desarrollo de la hiperalgesia. Mientras que la prostaglandina E2 (PGE2) y el factor de crecimiento nervioso (NGF) sensibilizan los nociceptores C peptidérgicos (TRPV1+), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) sensibiliza los C no peptidérgicos (IB4+). El receptor sigma-1 es una chaperona sensible al  $Ca^{2+}$  presente en las neuronas sensoriales periféricas, el cual se une a TRPV1 y a los receptores opioides  $\mu$  (MOR), aunque la repercusión funcional de estas interacciones es desconocida. En este trabajo mostramos que la administración de los antagonistas sigma-1 S1RA y BD-1063, en ratones, revirtió la hiperalgesia mecánica inducida

por PGE2 y NGF, pero no la hipersensibilidad mecánica inducida por GDNF. El efecto antihiperalgésico del antagonismo sigma-1 fue abolido por el agonista sigma-1 PRE-084, así como por el antagonista opioide periférico naloxona metiodida y el antagonista selectivo MOR ciprodime, pero no por el antagonista  $\kappa$  nor-binaltorpimina ni por el antagonista  $\delta$  naltrindol. Estos resultados indican que el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1 es mediado por la activación MOR periférica. Mediante ensayos inmunohistoquímicos, determinamos la presencia del agonista endógeno MOR endomorfin-2 (END2) en los nociceptores TRPV1+ pero no en los nociceptores IB4+. Dicha presencia fue confirmada usando el bisturi molecular resiniferatoxina, que eliminó selectivamente las neuronas TRPV1+ y con ello el marcaje de END2. Además, la administración de un anticuerpo frente a END2 en la pata sensibilizada revirtió el efecto antihiperalgésico inducido por los antagonistas sigma-1, indicando que la acción de este opioide endógeno es esencial para el efecto antihiperalgésico de los antagonistas sigma-1. Usando proteínas recombinantes, mostramos que el antagonista sigma-1 S1RA disocia al receptor sigma-1 del extremo C-terminal del TRPV1 e incrementa su unión al extremo C-terminal de MOR. En otras palabras, el antagonismo sigma-1 mueve a los receptores sigma-1 desde el TRPV1 a MOR como parte de su mecanismo de modulación opioide. Por lo tanto, el receptor sigma-1 podría participar en la comunicación entre TRPV1 y MOR. En cultivos de neuronas de la raíz dorsal (DRG, por sus siglas en inglés), PGE2 incrementó el flujo de calcio inducido por capsaicina, el agonista prototipo TRPV1. Este incremento en el flujo de calcio fue revertido por S1RA de una manera sensible al antagonista opioide naloxona, lo que concuerda con los efectos dependientes de la activación opioide del antagonismo sigma-1 observados *in vivo*. En resumen, nuestros resultados sugieren que el antagonismo

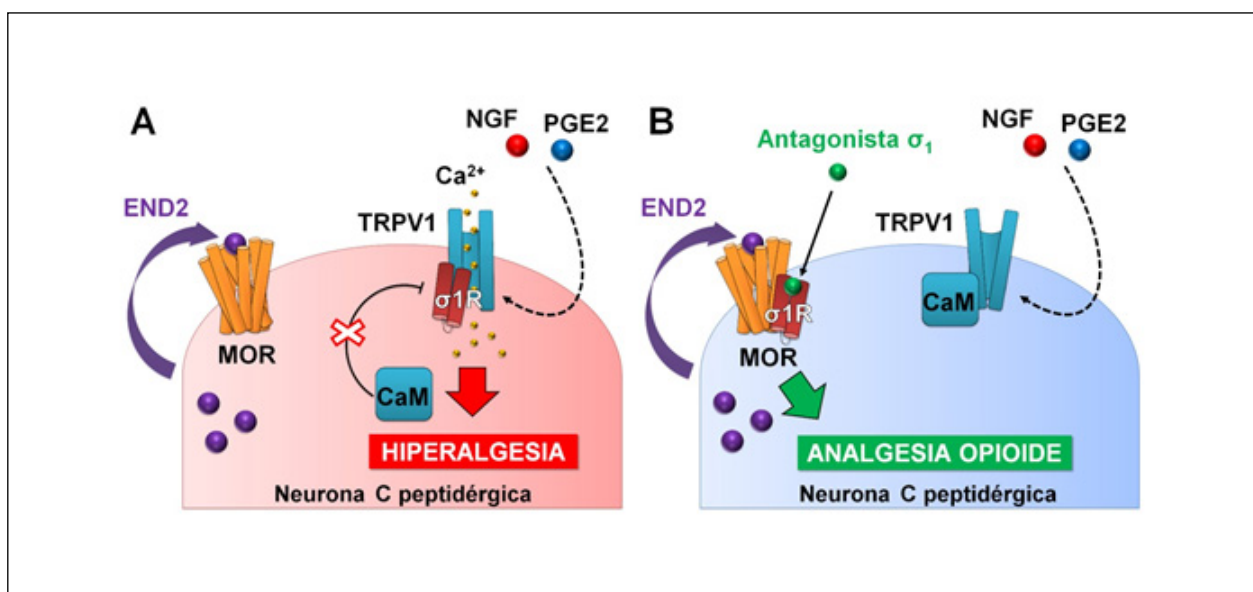


Figura 1. Hipótesis del mecanismo de acción del antagonismo del receptor sigma-1 en la hiperalgesia inducida por la sensibilización de las neuronas C peptidérgicas

sigma-1 disminuye la sensibilización periférica mediante el incremento del tono opioide endógeno en las neuronas C peptidérgicas, que producen END2, mientras que no altera la sensibilización de los nociceptores C no peptidérgicos. Nuestros hallazgos se resumen en la Figura 1.

**Agradecimientos:** Agencia Estatal de Investigación (10.13039/501100011033 - SAF2016-80540R y FPU16/03213), Universidad de Granada (PPJIB2019.11), Junta de Andalucía (grupo CTS 109) y fondos FEDER.

The algogenic chemicals produced during pathological pain sensitize peripheral sensory neurons, favoring the development of hyperalgesia. While prostaglandin E2 (PGE2) and nerve growth factor (NGF) sensitize peptidergic C-nociceptors (TRPV1+), glial-derived neurotrophic factor (GDNF) sensitizes non-peptidergic C (IB4+) neurons. The sigma-1 receptor is a Ca<sup>2+</sup>-sensitive chaperone present in peripheral sensory neurons, which binds to TRPV1 and  $\mu$ -opioid receptors (MOR). However, the functional impact of these interactions is unknown. In our present research, we show that the administration of the sigma-1 antagonists S1RA and BD-1063, in mice, reversed mechanical hyperalgesia induced by PGE2 and NGF, but not mechanical hypersensitivity induced by GDNF. The antihyperalgesic effect induced by sigma-1 antagonism was abolished by the sigma-1 agonist PRE-084, as well as by both the peripheral opioid antagonist naloxone methiodide and the selective MOR antagonist cyprodime, but not by the  $\kappa$  antagonist nor-binaltorpimine or by the  $\delta$  antagonist naltrindole. These results indicate that the antihyperalgesic effect of sigma-1 antagonists is mediated by peripheral MOR activation. Using immunohistochemical assays, we determined

the presence of the endogenous MOR agonist endomorphin-2 (END2) in TRPV1+ nociceptors, but not in IB4+ nociceptors. Using resiniferatoxin, a molecular scalpel, we selectively ablated both TRPV1+ neurons and END2 labeling, confirming the presence of this opioid peptide on peptidergic C-nociceptors. The administration of an antibody against END2 in the sensitized paw reversed the antihyperalgesic effect induced by sigma-1 antagonists, indicating that the action of this endogenous opioid peptide is essential for the antihyperalgesic effect of sigma-1 antagonists. Using recombinant proteins, we show that the sigma-1 antagonist S1RA dissociates the sigma-1 receptor from the C-terminus of TRPV1 and increases its binding to the C-terminus of MOR. In other words, sigma-1 antagonism moves sigma-1 receptors from TRPV1 to MOR as part of its mechanism for opioid modulation. Therefore, the sigma-1 receptor could participate in the communication between TRPV1 and MOR. We show that PGE2 increased calcium flux induced by capsaicin, the prototype TRPV1 agonist, in cultured dorsal root ganglia neurons (DRGs). This increase in calcium flux was reversed by S1RA, and in a naloxone-sensitive manner. These results are consistent with the *in vivo* effects induced by sigma-1 antagonism, which are dependent on opioid activation. In summary, our results suggest that sigma-1 antagonism decreases peripheral sensitization by the increase of the endogenous opioid tone in peptidergic C-neurons, which produce END2, while it does not alter sensitization of non-peptidergic C-nociceptors. Our findings are summarized in Figure 1.

**Acknowledgments:** Spanish State Research Agency (10.13039 / 501100011033 - SAF2016-80540R and FPU16 / 03213), University of Granada (PPJIB2019.11), Junta de Andalucía (CTS 109 group) and ERDF funds.

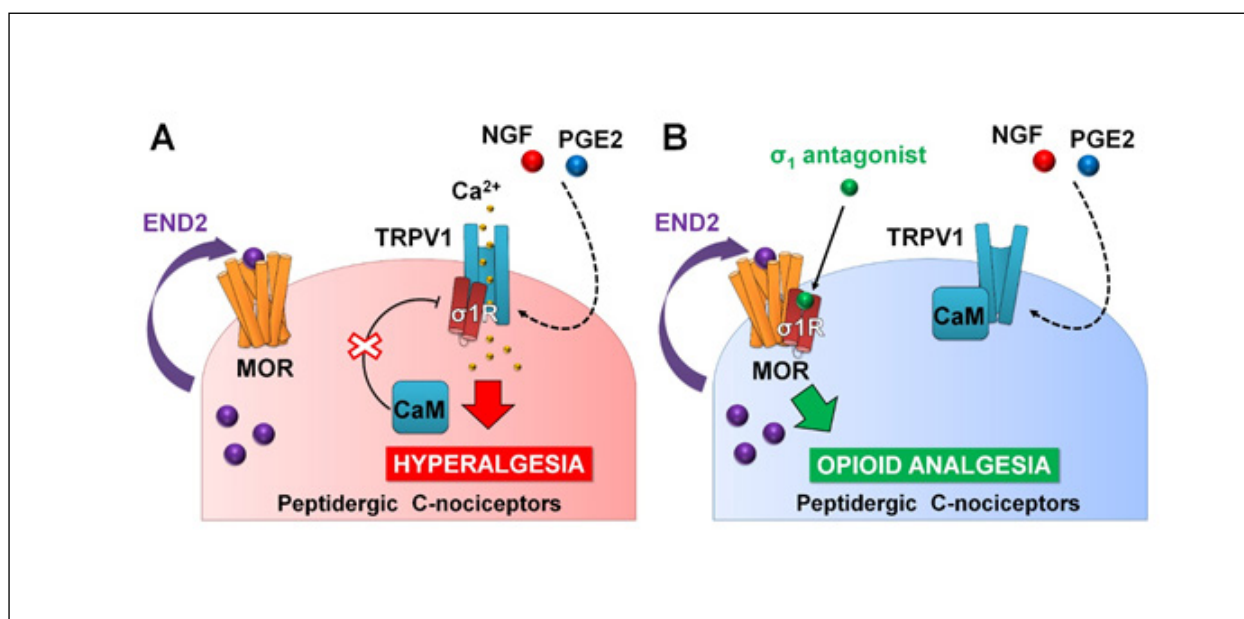


Figure 1. Hypothesis of the mechanism of action of sigma-1 receptor antagonism in the hyperalgesia induced by peptidergic C-neuron sensitization.



**LA LAPAROTOMÍA EN EL RATÓN: UN MODELO DE DOLOR POSTOPERATORIO TRASLACIONAL****LAPAROTOMY IN THE MOUSE: A MODEL OF TRANSLATIONAL POSTOPERATIVE PAIN***Miriam Santos-Caballero, Miguel Ángel Huerta, Makeya Abduljabbar Hasoun, M Carmen Ruiz-Canero, Rafael González-Cano, Enrique J Cobos**Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica e Instituto de Neurociencias, Universidad Granada, e Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA*

Más de la mitad de los pacientes que se someten a cirugía experimentan dolor moderado o intenso en el periodo postoperatorio inmediato, a pesar del tratamiento analgésico. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento del dolor postoperatorio. La laparotomía es el paso inicial para muchas cirugías abdominales, los cuales son los tipos de cirugía más frecuentes. Por lo tanto, sería interesante caracterizar el dolor inducido por una laparotomía en animales de experimentación, y así facilitar en el futuro el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas para su tratamiento. El dolor postquirúrgico puede clasificarse en tres tipos: dolor en reposo, dolor inducido por el movimiento, y la hipersensibilidad sensorial que se extiende a áreas cercanas a la herida quirúrgica. De estos, sólo la hipersensibilidad sensorial se evalúa rutinariamente en animales de experimentación. Nuestro objetivo fue caracterizar las tres facetas del dolor inducido por la laparotomía en el ratón. La laparotomía consistió en una incisión de 1,5 cm a lo largo de la línea alba hasta alcanzar la cavidad abdominal. Usamos una sutura discontinua para cerrar la musculatura abdominal y el peritoneo, y un punto de colchono horizontal para cerrar la piel. Valoramos la hipersensibilidad cutánea mediante el umbral de von Frey, el dolor en reposo mediante el análisis de las expresiones faciales de los ratones usando un algoritmo de inteligencia artificial basado en una red neuronal convolucional, y el dolor inducido por el movimiento mediante el análisis de la actividad exploratoria de los animales usando un actímetro de infrarrojos. El umbral sensorial abdominal disminuyó desde 1,7g hasta 0,06g a las 4h tras la laparotomía. Este umbral se mantuvo hasta el día 3, y fue restableciéndose paulatinamente hasta normalizarse completamente el día 10 tras la cirugía. Nuestro algoritmo de inteligencia artificial detectó un 13,89% de fotogramas en los que los animales laparotomizados mostraban caras de dolor en registros en video obtenidos a las 4h tras la cirugía, mientras que este valor fue de sólo un 3,34% en el grupo control. Además, la laparotomía indujo una disminución prominente de la actividad exploratoria de los animales (76,01 vs 41,94m en 15 minutos de evaluación). La administración subcutánea de ibuprofeno (64 mg/kg), revirtió casi completamente la hipersensibilidad cutánea (76,77%;  $p < 0,01$ ) y el dolor en reposo (73,65%;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, el dolor inducido por el movimiento fue resistente al efecto del ibuprofeno,

de manera que este fármaco fue capaz de revertir sólo un 59,37% de la disminución en la actividad exploratoria inducida por el proceso quirúrgico. Por lo tanto, consideramos que la laparotomía en el ratón es un buen modelo para el estudio de las distintas facetas del dolor postoperatorio (hipersensibilidad sensorial, dolor en reposo y dolor en movimiento), y es adecuada para la valoración de fármacos analgésicos.

**Agradecimientos:** Agencia Estatal de Investigación (10.13039/501100011033 - PID2019-108691RB-I00, FPU16/03213 y PRE2020-096203), Junta de Andalucía (grupo CTS-109) y fondos FEDER.

More than half of the patients who undergo surgery experience moderate or severe pain in the immediate postoperative period, despite analgesic treatment. Therefore, the development of new strategies for the treatment of postoperative pain are needed. Laparotomy is the initial step for many abdominal surgeries, which are the most common types of surgery. Therefore, it would be interesting to characterize laparotomy induced-pain in experimental animals, to facilitate the future development of new pharmacological strategies for its treatment. Post-surgical pain can be classified into three types: pain at rest, pain induced by movement, and the sensory hypersensitivity that develops to areas close to the surgical wound. Among these three types of pain, only sensory hypersensitivity is routinely evaluated in experimental animals. Our goal was to characterize these three facets of laparotomy-induced pain in the mouse. Laparotomy consisted of a 1.5 cm incision along the linea alba to gain access to the abdominal cavity. We use a discontinuous suture to close the abdominal muscles and peritoneum, and a horizontal mattress stitch to close the skin. We assessed skin hypersensitivity using the von Frey threshold, pain at rest by analyzing the facial expressions of the mice using an artificial intelligence algorithm based on a convolutional neural network, and movement-induced pain by analyzing the exploratory activity of animals using an infrared actimeter. The abdominal sensory threshold decreased from 1.7g to 0.06g at 4h after laparotomy. This threshold was maintained until day 3, and was gradually restored until it was completely normalized on day 10 after surgery. Our artificial intelligence algorithm detected 13.89% of frames in which the laparotomized animals showed painful faces in recordings made at 4h after surgery, while this value was only 3.34% in the control group. Furthermore, laparotomy induced a prominent decrease in the exploratory activity of the animals (76.01 vs 41.94m in 15 minutes of evaluation). Subcutaneous administration of ibuprofen (64 mg / kg) almost completely reversed skin hypersensitivity (76.77%;  $p < 0.01$ ) and pain at rest (73.65%;  $p < 0.05$ ). However, pain induced by movement was resistant to the effect of ibuprofen, so that this drug was able to reverse only 59.37% of the decrease in exploratory activity induced by the surgical process. Therefore, we consider that



laparotomy in the mouse is a good model for the study of the different facets of postoperative pain (sensory hypersensitivity, pain at rest and pain in movement), and is adequate for the evaluation of analgesic drugs.

**Acknowledgments:** Spanish State Research Agency (10.13039 / 501100011033 - PID2019-108691RB-I00, FPU16 / 03213 and PRE2020-096203), Junta de Andalucía (group CTS-109) and ERDF funds.

**MECANISMOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA Y NEUROMODULACIÓN: IMPLICACIONES EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS**

**MECHANISMS OF SYNAPTIC PLASTICITY AND NEUROMODULATION: IMPLICATION IN NEUROLOGICAL DISEASES**

*Sandra Jurado Sánchez*

*Instituto de Neurociencias CSIC-UMH, Alicante*

Los trastornos sociales son un síntoma comórbido común de varias afecciones patológicas, como el síndrome del espectro autista y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Los trastornos sociales se caracterizan

por su heterogeneidad sintomática que incluye déficits en la interacción y comunicación social, conductas repetitivas y alteraciones cognitivas que tienen un alto impacto en la calidad de vida. Debido a su amplio espectro, los déficits sociales se consideran una preocupación médica creciente, ya que el número de personas afectadas ha aumentado rápidamente en los últimos años, exponiendo un preocupante escenario. Además, la agresividad y las respuestas sociales aberrantes son síntomas comunes de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, de creciente incidencia en sociedades cada vez más envejecidas. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los procesos neurodegenerativos afectan a la regulación de la interacción social han sido poco estudiados.

Actualmente no existen tratamientos efectivos para los trastornos de la conducta social, aunque la oxitocina (OXT), un neuropéptido endógeno involucrado en el estrés y la interacción social, se ha identificado como una potencial diana terapéutica para aliviar déficits sociales. Ensayos clínicos basados en la administración exógena de OXT han producido resultados prometedores pero inconsistentes, probablemente debido a la baja permeabilidad de la OXT administrada exógenamente (por ejemplo, intranasal) a través de la barrera hematoencefálica. Estos resultados indican la necesidad de explorar estrategias alternativas para estimular el sistema oxitocinérgico endógeno, ya sea activando el receptor de OXT o induciendo su liberación en el sistema nervioso central (**Figura 1**). A pesar de su importancia para regular funciones homeostáticas

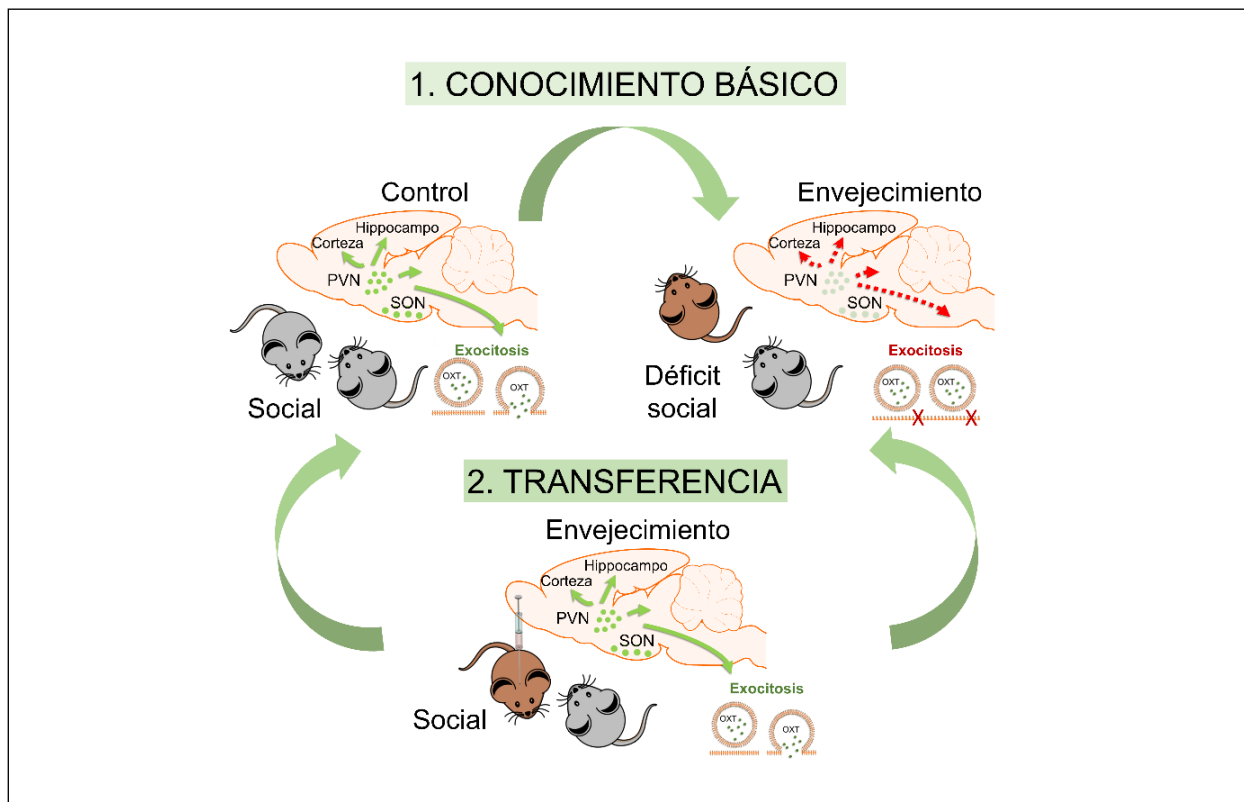


Figura 1.

y comportamientos complejos, aún se desconocen muchos detalles sobre los mecanismos que regulan la liberación de OXT en el cerebro. Esta falta de información contrasta con el amplio conocimiento disponible sobre los mecanismos implicados en la exocitosis de neurotransmisores clásicos como el glutamato o GABA. En gran medida, este escenario ha sido provocado por la falta de herramientas moleculares que permitan la identificación y estudio de vesículas de núcleo denso, que almacenan diferentes neuromoduladores como la OXT. Nuestro laboratorio ha implementado una estrategia multidisciplinaria basada en nuevas técnicas de clarificación de tejido iDISCO<sup>+</sup>, imagen de ultra resolución 3D, electrofisiología y optogenética para analizar las propiedades y mecanismos reguladores del sistema oxitocinérgico durante el desarrollo y el envejecimiento. Nuestro trabajo ha permitido identificar moléculas clave implicadas en la secreción de OXT. Este conocimiento constituye la base para desarrollar nuevas herramientas para regular la liberación de neuromoduladores como la OXT en el sistema nervioso central. Además, estas nuevas herramientas permitirán analizar el papel de la OXT en la plasticidad sináptica, una propiedad neuronal que permite la adaptación de los circuitos neuronales, y que se encuentra alterada durante trastornos neurodegenerativos.

Social disorders are a common comorbid symptom of several pathological conditions, such as autism spectrum syndrome and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. Social disorders are

characterized by their symptomatic heterogeneity including deficits in social interaction and communication, repetitive behaviors and cognitive alterations that have a high impact on quality of life. Given their broad spectrum, social deficits are considered a growing medical concern since the number of people affected by social disorders such as social anxiety has increased rapidly in recent years exposing a concerning scenario. Furthermore, aggressiveness and aberrant social responses are common symptoms of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, of growing incidence in increasingly aging societies. However, the mechanisms by which neurodegeneration affects the regulation of social interaction have been scarcely studied.

Currently there are no effective treatments for social behavior disorders, however oxytocin (OXT), an endogenous neuropeptide involved in stress and social interaction, it has recently been identified as a potential therapeutic target to alleviate social deficits. Clinical trials based on OXT's exogenous administration have yielded promising but inconsistent results, probably due to the low permeability of exogenously administered (e.g. intranasal) OXT across the blood-brain barrier. These results indicate the need to explore alternative strategies to stimulate the endogenous oxytocinergic system either by activating the OXT receptor or inducing its release in the central nervous system (**Figure 1**). Despite its importance in regulating homeostatic functions and complex behaviors, many details about the mechanisms that regulate OXT release in

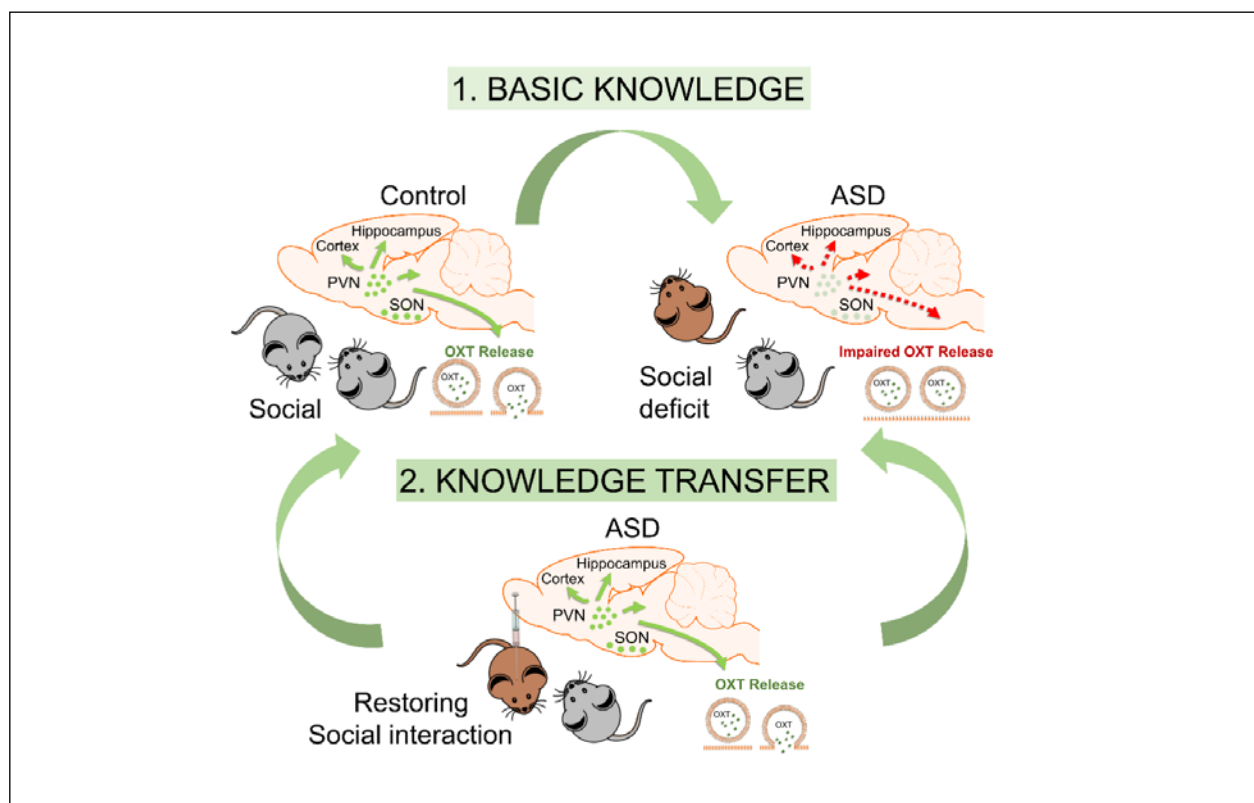


Figure 1.

the brain are still unknown. This lack of information contrasts with the extensive knowledge available on the mechanisms involved in the exocytosis of classical neurotransmitters such as glutamate or GABA. This scenario is partly due to the lack of molecular tools to unambiguously identify and study dense core vesicles, which store many different brain neuromodulators such as OXT. Our laboratory has implemented a multidisciplinary strategy based on novel iDISCO<sup>+</sup> tissue clarification techniques, 3D ultra-resolution imaging, electrophysiology, and optogenetics to analyze the properties and regulatory mechanisms of the oxytocinergic system during development, natural and pathological aging. Our work has revealed key molecules involved in OXT secretion, which has allowed us to develop new tools to regulate the release of neuromodulators such as OXT in the central nervous system to analyze their role in synaptic plasticity, a neuronal property that allows neuronal circuit adaptation, and which is altered during neurodegeneration.

#### DESARROLLO Y PLASTICIDAD DE LOS SISTEMAS DE OXITOCINA Y VASOPRESINA EN EL HIPOTÁLAMO

##### DEVELOPMENT AND PLASTICITY OF THE HYPOTHALAMIC OXYTOCINERGIC AND VASOPRESINERGIC SYSTEMS

*M.P. Madrigal, S. Jurado*

*Instituto de Neurociencias CSIC-UMH, Alicante*

Los neuropéptidos oxitocina (OXT) y arginina vasopresina (AVP) juegan un papel crítico en la regulación de funciones homeostáticas y comportamientos complejos como la interacción social. Alteraciones en la función de estos sistemas se han relacionado con déficits cognitivos y sociales, sin embargo, aún se desconocen muchos detalles sobre el desarrollo y la especificación de estos circuitos neuronales. Ambos neuropéptidos se sintetizan principalmente en núcleos hipotalámicos como el núcleo paraventricular y supraóptico (PVN y SON).

Nuestro estudio ha implementado novedosas técnicas de clarificación de tejido (iDISCO<sup>+</sup>) y microscopía de ultraresolución 3D (**Figura 1A**) para analizar la formación de estos circuitos durante el desarrollo del cerebro del ratón y las propiedades de plasticidad celular en respuesta a periodos críticos como la maternidad o la experiencia sexual en el animal adulto. Nuestros resultados indican que durante la etapa postnatal temprana existe un elevado número de neuronas hipotalámicas que coexpresan OXT y AVP, coincidiendo con un período crítico para la interacción social. Esta población mixta disminuye drásticamente en el cerebro adulto, lo que sugiere que la maduración del sistema requiere de la activa-

ción de procesos de plasticidad celular (**Figura 1B**). Reconstrucciones 3D del cerebro adulto han revelado que las neuronas de OXT y AVP en el área retroquiasmática (RCH) y el núcleo accesorio (AN) también experimentan fenómenos de plasticidad celular en respuesta a la experiencia sexual y la maternidad. Nuestras observaciones indican una prevalencia de neuronas AVP en el SON de hembras vírgenes que se convierten en neuronas positivas a OXT después de dar a luz, al contrario de lo observado en el AN.

Por otra parte, hemos analizado otros tipos neuronales en el hipotálamo como neuronas inhibitorias positivas a GAD67 y neuronas dopamínicas identificadas mediante el marcador de monoamina tirosina hidroxilasa (TH). Nuestros resultados indican la presencia de neuronas positivas para GAD67 en el hipotálamo, pero una mínima expresión en células de OXT o AVP. Además, encontramos que la experiencia sexual induce la expresión de TH en una subpoblación de neuronas de AVP y OXT en el RCH. Nuestros hallazgos proporcionan nueva información básica para comprender la especificación de los sistemas de OXT y AVP durante el desarrollo y sus propiedades plásticas durante periodos críticos en el animal adulto.

The neuropeptides oxytocin (OXT) and arginine vasopressin (AVP) play critical roles in the regulation of homeostatic functions and complex behaviors such as social interaction. Alterations of these systems have been related to cognitive and social deficits, however, many details about the development and specification of these neural circuits remain unknown. Both neuropeptides are mainly synthesized in hypothalamic nuclei such as the paraventricular and supraoptic nucleus (PVN and SON).

Our study has implemented novel tissue clarification techniques (iDISCO<sup>+</sup>) and 3D ultra-resolution microscopy (**Figure 1A**) to analyze the formation of these circuits during mouse brain development and the properties of cellular plasticity in response to critical periods such as maternity or sexual experience in the adult animal. Our results indicate that during early postnatal stages there is a high number of hypothalamic neurons that co-express OXT and AVP, coinciding with a critical period for social interaction. This mixed population decreases dramatically in the adult brain, suggesting that the maturation of these systems requires a switch in their internal program which modifies neuropeptide expression via cellular plasticity mechanisms (**Figure 1B**). Furthermore, 3D reconstruction of the adult brain indicates that OXT and AVP neurons in the retrochiasmatic area (RCH) and the accessory nucleus (AN) also undergo cellular plasticity processes in response to sexual experience and motherhood. Our observations indicate a prevalence of AVP neurons in the SON of naïve females that become OXT-positive neurons after giving birth, contrary to that observed in the AN.





## DINÁMICA Y MECANISMO MOLECULAR DE LA LIBERACIÓN DE OXITOCINA EN NEURONAS HIPOTALÁMICAS

### DYNAMICS AND MOLECULAR MECHANISM OF OXYTOCIN RELEASE IN HYPOTHALAMIC NEURONS

Aznar-Escolano B., Madrigal M.P., Jurado S.  
Instituto de Neurociencias CSIC-UMH, Alicante

El sistema oxitocinérgico regula funciones homeostáticas vitales y distintos aspectos de la interacción social como la memoria social. La disregulación de este sistema se ha implicado en desórdenes neurológicos caracterizados por déficits sociales como el trastorno del espectro autista. A pesar de su importante acción neuromoduladora, aún se desconocen muchos detalles sobre las propiedades y el mecanismo de liberación de la oxitocina (OXT) en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Las neuronas oxitocinérgicas del hipotálamo son las responsables de modular los niveles de OXT en el cerebro principalmente a través de eventos de liberación somatodendrítica. Sin embargo, la maquinaria de fusión responsable de la secreción de OXT no ha sido caracterizada en detalle, principalmente por la carencia de marcadores específicos. El análisis de la expresión de proteínas SNARE y sinaptotagminas, reveló que dos proteínas SNARE: SNAP-47 y SNAP-23 se localizan en el compartimento somatodendrítico de las neuronas oxitocinérgicas, sugiriendo un papel en la exocitosis de OXT (**Figura 1A**). Nuestros datos indican que la expresión de estas isoformas se encuentra regulada durante el desarrollo. Así, mientras que SNAP-47 está presente en el hipotálamo desde el estadio prenatal, la expresión de SNAP-23 no es detectable hasta la edad adulta.

Técnicas de *chasing* vesicular en célula única han demostrado un aumento significativo de la probabilidad de liberación de OXT en respuesta a la estimulación neuronal durante los primeros segundos (60 s), mientras que tiempos de estimulación prolongados (p.ej. 10 min) no afectan a la probabilidad de liberación sugiriendo una depleción de vesículas de OXT listas para ser liberadas (**Figura 1B**). Nuestros resultados indican que la exocitosis de OXT preferentemente ocurre en regiones enriquecidas con SNAP-47 (**Figura 1C**), a través un mecanismo parcialmente independiente de la entrada de calcio. Paralelamente se ha realizado un análisis exhaustivo de la dinámica y propiedades de liberación de OXT en neuronas hipotalámicas en cultivo combinando novedosas técnicas de imagen con la línea del ratón transgénico OXT-tdTomato (**Figura 1D**), que permite la identificación de las vesículas de OXT. La visualización de vesículas somatodendríticas de OXT ha revelado la existencia de poblaciones vesiculares con diferentes dinámicas en respuesta a la estimulación neuronal. Se identificaron cuatro grupos principales: **i**) vesículas dinámicas, las

cuales se movilizan durante los primeros 10 s de estimulación, **ii**) vesículas tardías, el grupo más abundante, con cambios de desplazamiento tras 20-40 s de estimulación (**Figura 1E**); **iii**) vesículas desacopladas, las cuales experimentan cambios de movilidad durante el periodo final de estimulación; y **iv**) vesículas estables (sin movilidad detectable). Registros electrofisiológicos preliminares indican que las neuronas oxitocinérgicas en cultivo presentan cinéticas lentas de despolarización, lo que podría subyacer la dinámica tardía de las vesículas de OXT y su dependencia parcial a la entrada de calcio. Nuestros resultados han revelado la existencia de diferentes grupos de vesículas de OXT, que se movilizan de forma diferente en respuesta al mismo estímulo, una característica hasta ahora desconocida y que puede ser relevante para la modulación fina del comportamiento.

The oxytocinergic system regulates vital homeostatic functions and different aspects of social interaction such as social bonding or social memory. Dysregulation of this system has been implicated in neurological disorders characterized by social deficits such as autism spectrum disorder. Despite its important neuromodulatory action, many details about the properties and release mechanism of oxytocin (OXT) in the Central Nervous System (CNS) are still unknown.

Oxytocinergic neurons in the hypothalamus are responsible for modulating OXT levels in the brain mainly through somatodendritic release events. However, the fusion machinery responsible for OXT secretion has not been characterized in detail, mainly due to the lack of specific markers for these vesicles in neurons. Analysis of the expression of SNARE and synaptotagmin proteins revealed that two SNARE proteins: SNAP-47 and SNAP-23 are found in the somatodendritic compartment of oxytocinergic neurons, suggesting a role in OXT exocytosis (**Figure 1A**). Our data indicate that the expression of these isoforms is developmentally regulated. Thus, whereas SNAP-47 is present in the hypothalamus from the prenatal stage, the expression of SNAP-23 is not detectable until adulthood.

Single cell vesicular *chasing* techniques have demonstrated a significant increase in the probability of OXT release in response to neuronal stimulation during the first seconds of stimulation (60 s), whereas longer stimulation times (10 min) do not affect the release probability suggesting a depletion of OXT vesicles ready to be released (**Figure 1B**). Our results indicate that OXT exocytosis occurs preferentially in regions enriched with SNAP-47 (**Figure 1C**), through a mechanism partially independent of calcium influx. In parallel, an exhaustive analysis of the dynamic properties of OXT release in cultured hypothalamic neurons has been carried out combining novel imaging techniques and the transgenic mouse line OXT-tdTomato (**Figure 1D**), which allows the unambiguous identification of OXT vesicles. Visualization of somatodendritic OXT vesicles has revealed the existence of distinct vesicular populations with different dynamics in response to neuronal stimula-

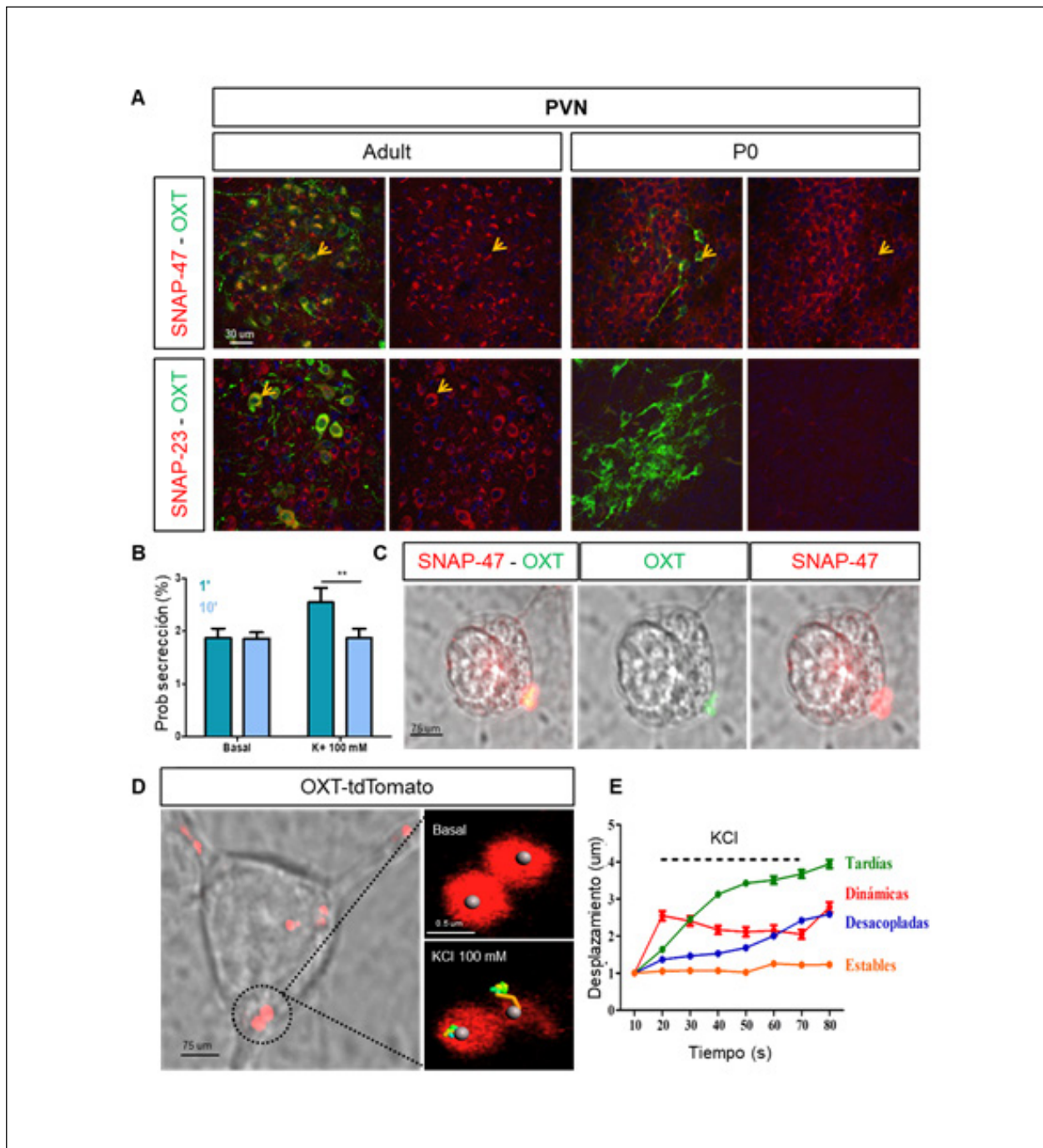


Figura 1. Análisis de la secreción y dinámica de las vesículas de OXT. A) Inmunohistoquímica en rodajas coronales del núcleo paraventricular del hipotálamo en cerebro adulto y PO en donde puede identificarse la expresión de oxitocina (OXT) (verde), SNAP-47 (rojo) y núcleos celulares (azul). Las flechas indican co-localización entre OXT y SNAP-47. B) Probabilidad de secreción de OXT en cultivos primarios de hipotálamo en respuesta a tratamientos durante 1 y 10 min con medio o basal o medio de estimulación (KCl 100 mM). C) Experimentos de chasing vesicular en donde se identifica la liberación de vesículas de OXT (verde) en regiones enriquecidas con SNAP-47 (rojo). D) Neurona hipotalámica procedente de un ratón OXT-tdTomato. Se observan las vesículas de OXT (rojo). E) Clasificación de vesículas de OXT según su respuesta a la estimulación.

Figure 1. Analysis of the dynamics and secretion of OXT vesicles. A) Immunohistochemistry in coronal slices of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in adult brain and P0 where the expression of oxytocin (OXT) (green), SNAP-47 (red) and cell nuclei (blue) can be identified. Arrows indicate co-localization between OXT and SNAP-47. B) Probability of OXT secretion in primary hypothalamic cultures in response to treatments for 1 and 10 min with basal or stimulation medium (KCl 100 mM). C) Vesicular chasing experiments revealed the release of OXT vesicles (green) in regions enriched with SNAP-47 (red). D) Hypothalamic neuron from an OXT-tdTomato mouse. OXT vesicles are identified in red. E) Classification of OXT vesicles according to their response to stimulation.

tion. Four main groups have been identified: **i)** dynamic vesicles, mobilized during the first 10 s of stimulation, **ii)** delayed vesicles, the most abundant group, with displacement changes after 20-40 s of stimulation (**Figure 1E**); **iii)** uncoupled vesicles, which undergo mobility changes during the final period of stimulation; and **iv)** stable vesicles (no detectable mobility). Preliminary electrophysiological recordings indicate that cultured oxytocinergic neurons show slow depolarization kinetics, which could underlie the slow dynamics of OXT vesicles and their partial dependence to calcium influx. Our results revealed the existence of different groups of OXT vesicles, which are distinctly mobilized in response to the same stimulus, exposing an unknown feature that may be relevant for the fine tuning of behavior.

### POLIFENOLES DE LA DIETA COMO POTENCIALES COADYUVANTES EN PATOLOGÍAS CARDIOMETABÓLICAS

#### DIETARY POLYPHENOLS AS POTENTIAL COADJUVANTS IN CARDIOMETABOLIC PATHOLOGIES

Jara Pérez-Jiménez

*Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid*

Las patologías cardiometabólicas, como la diabetes mellitus tipo 2, las enfermedades cardiovasculares o el hígado graso no alcohólico han mostrado un enorme incremento durante las últimas décadas, convirtiéndose en un importante problema de salud pública. Aunque son patologías multifactoriales, que involucran múltiples procesos bioquímicos, se han mostrado a asociaciones fuertes y consistentes (tanto directas como inversas) entre su aparición y determinados hábitos alimentarios. Por esta razón, existe un gran interés en esclarecer de qué manera determinados componentes de la dieta pueden contribuir a la prevención o modulación de estas patologías.

Los polifenoles son un amplio grupo de compuestos químicos presentes en los alimentos de origen vegetal. Son potentes antioxidantes que inicialmente se conocían solo por esa actividad, pero investigaciones posteriores han demostrado que, de hecho, exhiben múltiples mecanismos de acción una vez ingeridos: inhibición enzimática, acciones epigenéticas, modulación de vías de señalización. Globalmente, estos efectos conducen a mejoras en la homeostasis de los glúcidos, la inflamación o el estrés oxidativo. Además, los polifenoles han presentando fuertes interacciones con la microbiota colónica en dos sentidos: estimulación del crecimiento de especies beneficiosas y generación, debido a la acción de las mismas, de nuevos metabolitos fenólicos biodisponibles, que son agentes clave en los efectos sobre la salud de los polifenoles.

Nuestro grupo de investigación se dedica al estudio de los polifenoles no extraíbles, que son compuestos fenólicos o bien de alto peso molecular o bien de bajo peso molecular asociados a macromoléculas como la fibra dietética. Hemos estudiado estos compuestos desde varias perspectivas: caracterización analítica de alimentos y subproductos ricos en polifenoles no extraíbles, evaluación de su ingesta en diferentes poblaciones, estudio de su metabolismo y evaluación de sus efectos en la salud. En este sentido, hemos realizado varios ensayos clínicos en sujetos con riesgo cardiometabólico, encontrando que estos compuestos son capaces de mejorar el perfil lipídico en sujetos con hipercolesterolemia, o la insulina en ayunas en sujetos con al menos dos factores de síndrome metabólico. Además, hemos explorado el papel potencial del perfil de la microbiota y los miARNs circulantes en la respuesta a la suplementación con polifenoles no extraíbles, con objeto de poder explicar la alta variabilidad interindividual observada. Nuestro objetivo actual es determinar si la suplementación aguda con polifenoles no extraíbles, utilizando materiales alimenticios seleccionados ricos en estos compuestos, es capaz de mejorar la homeostasis de la glucosa postprandial en sujetos con diabetes tipo 2.

Por tanto, la evidencia científica actual, obtenida por nuestro grupo de investigación y muchos otros que trabajan en el tema, muestra que los polifenoles son constituyentes dietéticos prometedores que pueden ser utilizados como coadyuvantes en patologías como la diabetes tipo 2, permitiendo un retraso en las múltiples alteraciones bioquímicas asociadas con la progresión de la enfermedad.

**Agradecimientos:** Agencia Estatal de Investigación (AGL2014-55102-JIN, RTI2018-095059-B-I00), con cofinanciación de fondos FEDER (UE).

Cardiometabolic pathologies, such as type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases or non-alcoholic fatty liver disease have widely increased during last decades, becoming a major public health problem. Although they are multifactorial pathologies, involving several biochemical processes, they have shown strong and consistent associations (both in direct and inverse modes) with certain dietary habits. For this reason, there is a wide interest in the elucidation on how specific dietary constituents may contribute to the prevention or modulation of these pathologies.

Polyphenols are a wide group of chemical compounds present in food of vegetal origin. They are potent antioxidants but, although they were initially known just because of that activity, further research has shown that, indeed, they exhibit several mechanisms of action once ingested: enzyme inhibition, epigenetic actions, modulation of signalling pathways. Overall, these effects lead to improvements in glucid homeostasis, inflammation or oxidative stress. Additionally, polyphenols have strong interactions with colonic microbiota in two senses: stimulation of the growth of beneficial species and, due to the action of these microbes, generation of new bioavailable metabolites, which are key agents in the health effects of polyphenols.



Our research team is devoted to the study of non-extractable polyphenols, which are either high molecular weight or low molecular weight phenolic compounds associated with macromolecules such as dietary fibre. We have studied these compounds from several perspectives: analytical characterization of foods and byproducts rich in non-extractable polyphenols, evaluation of their intake in different populations, characterization of their metabolic fate and assessment of their health effects. In this sense, we have conducted several clinical trials in subjects at cardiometabolic risk, finding that these compounds are able to improve lipid profile in hypercholesterolemia subjects or fasting insulin in subjects with at least two factors of metabolic syndrome. Moreover, we have explored the potential role of microbiota profile and circulating miRNA in the response to non-extractable polyphenol supplementation, with the aim of understanding the high inter-individual variability which was observed. Our current aim is to determine whether the acute supplementation with non-extractable polyphenols, using selected food materials rich in these compounds, is able to improve postprandial glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes.

Therefore, current scientific evidence, obtained by our research team and many others working on the topic, show that polyphenols are promising dietary constituents able to be used as coadjuvants in pathologies such as type 2 diabetes, allowing a delay in the multiple biochemical alterations associated with the progression of the disease.

**Acknowledgments:** Spanish Research Agency (AGL2014-55102-JIN, RTI2018-095059-B-I00), with co-funding from FEDER funds (EU).

### PAPEL DE LOS MICRORNAS EN LA RESPUESTA A UNA SUPLEMENTACIÓN CON ORUJO DE UVA EN EL CONTROL GLUCÉMICO

#### INVOLVEMENT OF MICRORNAS IN THE RESPONSE TO GRAPE POMACE SUPPLEMENTATION REGARDING GLUCOSE HOMEOSTASIS

Léniz A<sup>1,2,3,4</sup>, Matínez-Maqueda D<sup>5</sup>, Fernández-Quintela A<sup>2,3,4</sup>, Pérez-Jiménez J<sup>5</sup>, Portillo M<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Araba Integrated Health Care Organization, Basque Health Service (Osakidetza)

<sup>2</sup> Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy and Lucio Lascaray Research Center, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vitoria, Spain

<sup>3</sup> Bioaraba Health Research Institute, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain

<sup>4</sup> CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBER-OBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain

<sup>5</sup> Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de síntomas caracterizado por hipertensión, niveles altos de triglicéridos y bajos de HDL, obesidad e hiperglucemia. Aunque no se trate de una enfermedad *per se*, es un importante contribuyente al desarrollo de otras patologías como la diabetes de tipo 2 o los eventos cardiovasculares, presentando una prevalencia estimada del 30% en la sociedad occidental. Los mecanismos que originan el SM no han sido descritos en su totalidad. Se sabe que algunas moléculas bioactivas presentes en la dieta tienen efectos beneficiosos en el debut y el pronóstico de este síndrome. Entre dichas moléculas cabe destacar los compuestos fenólicos presentes en uvas.

Los microRNAs (miRNAs) son fragmentos (18-22 nucleótidos) de RNA no codificantes que actúan modificando el proceso de traducción o degradando el mRNA. Pueden regular hasta el 30% de las reacciones metabólicas del organismo y se pueden encontrar en la circulación sanguínea, considerándose por ello biomarcadores de fácil acceso.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue analizar el posible papel de los miRNAs en los mecanismos de acción que median en los efectos beneficiosos del orujo de uva (subproducto de vinificación rico en polifenoles) en el control glucémico de pacientes con riesgo cardiometabólico y su papel en la variabilidad interindividual de la respuesta al producto.

Para ello, se llevó a cabo un estudio de intervención aleatorizado y cruzado en el que se suplementó con orujo de uva la dieta habitual de 49 sujetos con al menos dos factores de SM durante un periodo de 6 semanas. A continuación, los participantes fueron clasificados entre respondedores y no respondedores según la mejora observada en los niveles de insulina (**Figura 1**). Se extrajeron muestras de sangre antes y después de la suplementación, se aisló el mRNA de las muestras y se determinó la expresión de miRNAs mediante secuenciación de nueva generación en una submuestra. Los cambios observados se confirmaron en todas las muestras mediante RT-PCR y se buscaron dianas de los miRNAs mediante análisis bioinformático.

Se observó que el miR-222 y el miR-30c, que están relacionados con la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, disminuyeron su expresión tras la suplementación en sujetos respondedores, considerándose importantes mediadores en el aumento de la glucólisis, captación de glucosa y captación de glucosa por el músculo (**Figura 2**). Además, los respondedores presentaron mayores concentraciones de miR-122 y consecuentemente, lo que se traduciría en menores niveles de piruvato quinasa y receptor de la adiponectina 1 (**Figura 3**).

Por tanto, se puede concluir que los miRNAs miR-222 y miR-30c tienen un papel fundamental en los efectos beneficiosos de una suplementación con extracto de uvas en el control glucémico de personas con SM. Además, el miR-222 se puede considerar un biomarcador de respuesta de estos pacientes al tratamiento con orujo de uva.

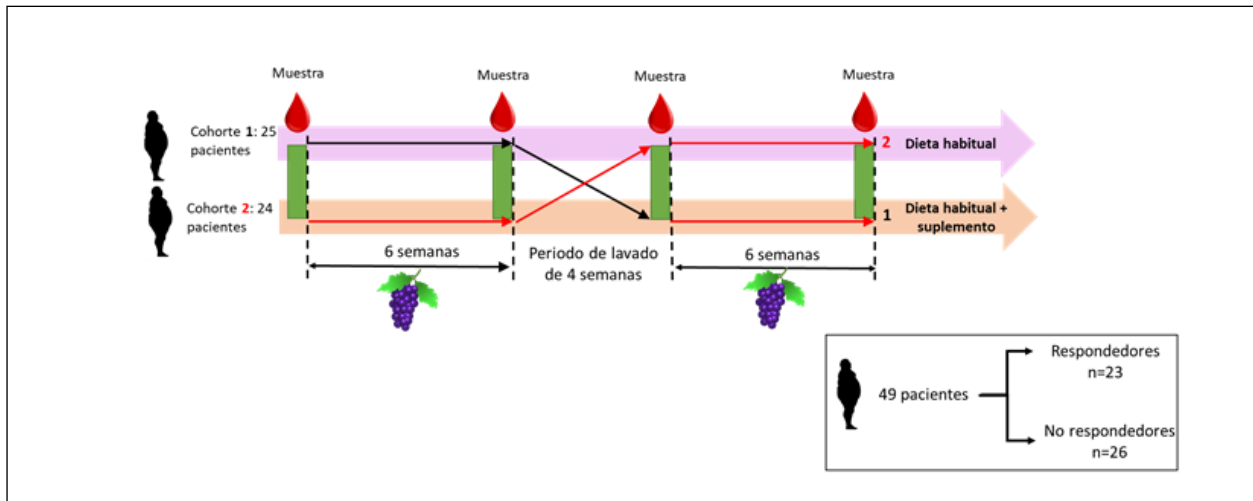


Figura 1. Diseño experimental del estudio de intervención aleatorizado y cruzado. Modificado de Léniz A et al. Foods 2021, 10, 2059.

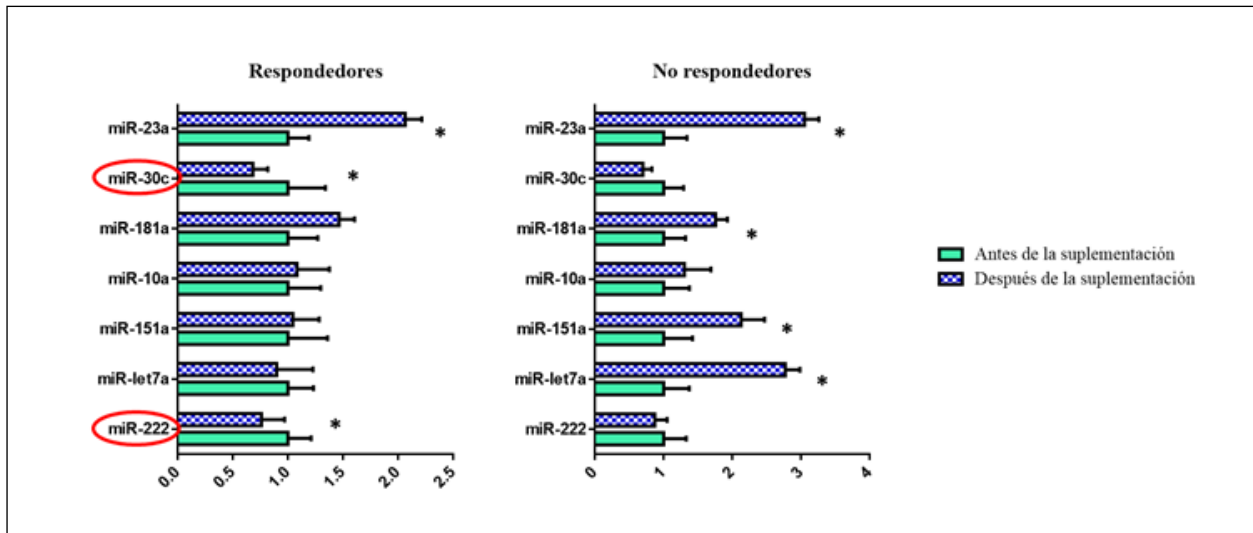


Figura 2. Diferencias en la expresión de miRNAs antes y después de la suplementación en respondedores y no respondedores, en función de la reducción de los niveles de insulina basal tras la suplementación. \* $P < 0,05$ . Modificado de Léniz A et al. Foods 2021, 10, 2059.

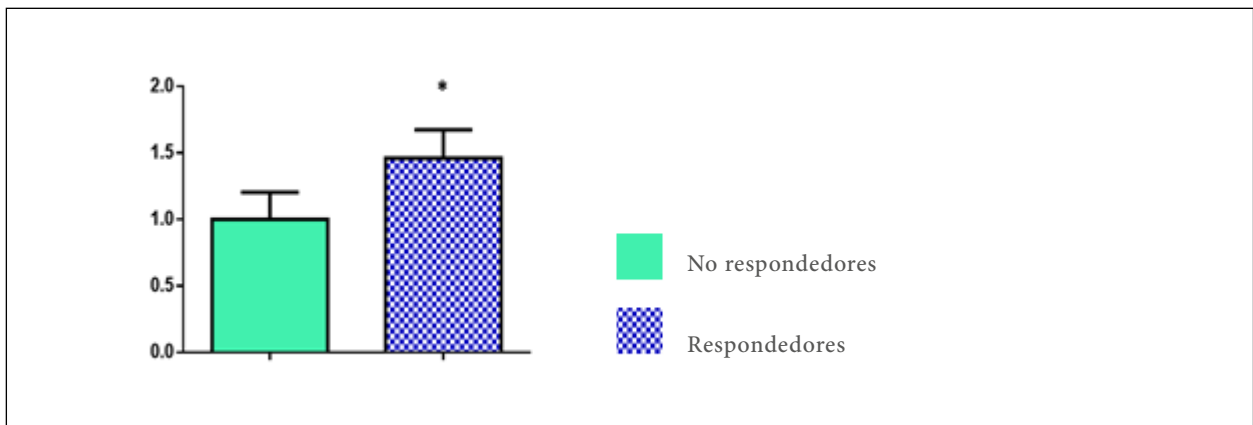


Figura 3. Diferencias en la expresión de miR-222 entre sujetos respondedores y no respondedores, según su reducción de la insulina basal tras la suplementación. \* $P < 0,05$ . Modificado de Ramos-Romero S, Léniz A et al. Mol Nutr Food Res.2021 Jan;65(2):e2000113.

**Agradecimientos:** Ministerio de Economía y Competitividad (MINNECO-FEDER, AGL2014-55102-JIN), Universidad del País Vasco GIU18-173 e Instituto de Salud Carlos III (CIBERobn).

Metabolic syndrome (MetS) is a cluster of risk factors characterized by hypertension, high triglyceride and low HDL levels, obesity and hyperglycaemia. Despite the fact that it is not a disease by itself, it is a major contributor to the appearance of cardiovascular diseases or type 2 diabetes mellitus, presenting an estimated prevalence of 30% in Western.

Mechanistic processes underlying the development of MetS have not been fully elucidated. Some bioactive molecules naturally present in the diet have demonstrated to have beneficial effects in the management of the progression of the MetS; such is the case of phenolic compounds, which can be found in grapes.

MicroRNAs (miRNAs) are small (usually 18-22 nucleotides long) non-coding RNAs able either to modify the translation process or to degrade mRNA. Almost 30% of human biochemical processes are estimated to be regulated by miRNAs. They can be found in peripheral blood, being considered easily accessible biomarkers.

Thus, the aim of this study was to analyse the potential involvement of miRNAs in the mechanisms of action underlying the positive effect of a grape pomace (a polyphenol-rich byproduct from wine making) supplementation in patients with cardiometabolic risk and their role in the inter-individual variability in the response to that supplementation.

To achieve that objective, an intervention randomized cross-over study was carried out,

where the habitual diet of 49 subjects with at least two MetS factors was supplemented with grape pomace for 6 weeks. Then, participants were classified between responder and non-responders, according to the reduction in fasting insulin after the treatment (Figure 1). Blood samples were extracted before and after the supplementation and were frozen until further analysis. mRNA was isolated from the samples and miRNA expression was determined through Next Generation Sequencing in a reduced number of individuals (n=6 per group). Differential expression of miRNAs changes were confirmed by RT-PCR in the whole cohort, and miRNAs' targets were assessed by bioinformatics analysis.

It was observed that miR-222 and miR-30c, which are known to be related to insulin resistance and type 2 diabetes mellitus, were downregulated after the supplementation in responder subjects, being important contributors to the increase of glycolysis and glucose uptake in skeletal muscle (Figure 2). Furthermore, patients who showed a positive response to the treatment presented higher concentration of miR-222, and thus, lower levels of pyruvate kinase and adiponectin receptor 1 (Figure 3).

Therefore, it can be concluded that miR-222 and miR-30c play a pivotal role in the beneficial effects in glucose homeostasis of a grape pomace supplementation in subjects with MetS. Moreover, miR-222 can be proposed as a biomarker to predict the response of these patients to the nutritional treatment with grape pomace.

**Acknowledgements:** Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINNECO-FEDER, grants AGL2014-55102-JIN), University of the Basque Country (GIU18-173) and Carlos III Research Institute (CIBERobn).

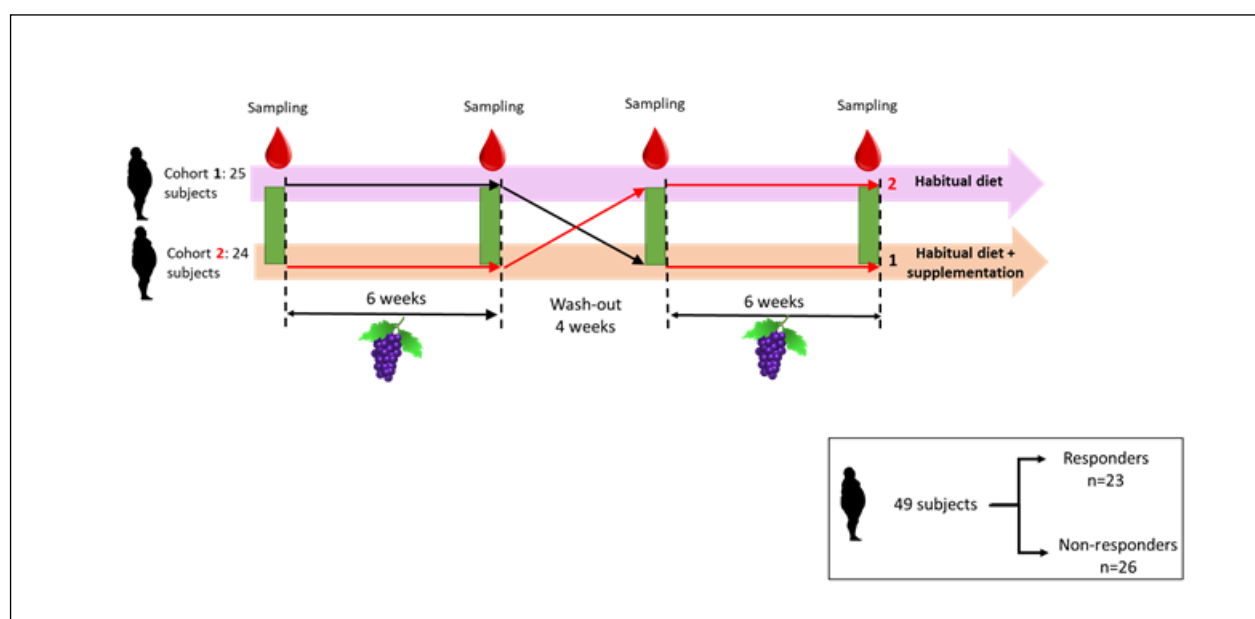


Figure 1. Experimental design of the randomized cross-over study. Modified from Léniz A et al. Foods 2021, 10, 2059.

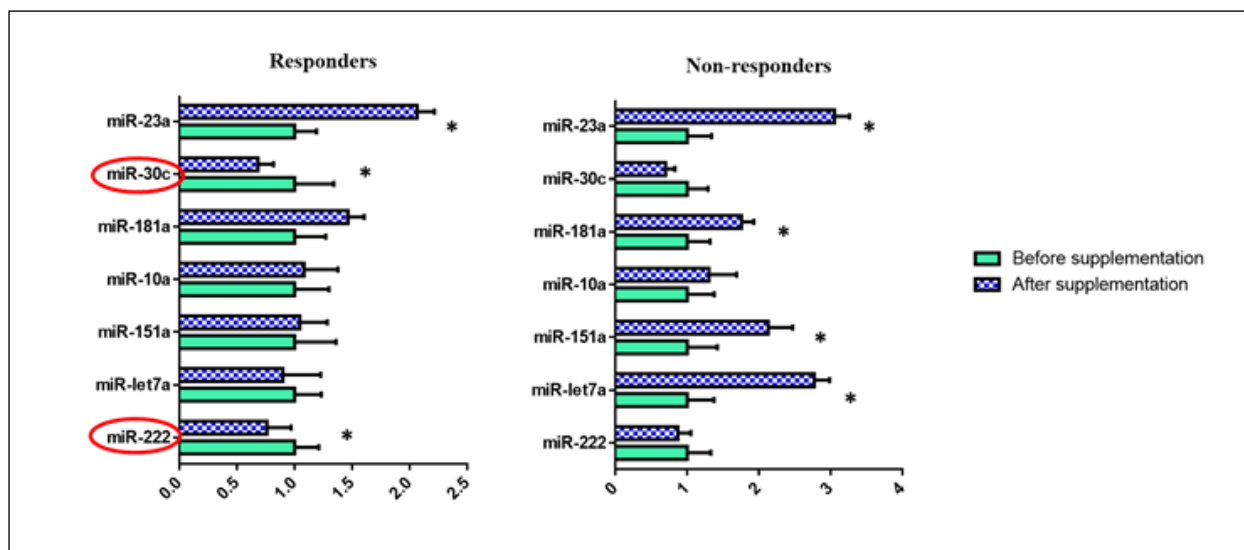


Figure 2. Differentially expressed miRNAs before and after supplementation in responder and non-responder subjects based on fasting insulin reduction after supplementation..

\* $P < 0,05$ . Modified from Léniz A et al. Foods 2021, 10, 2059.

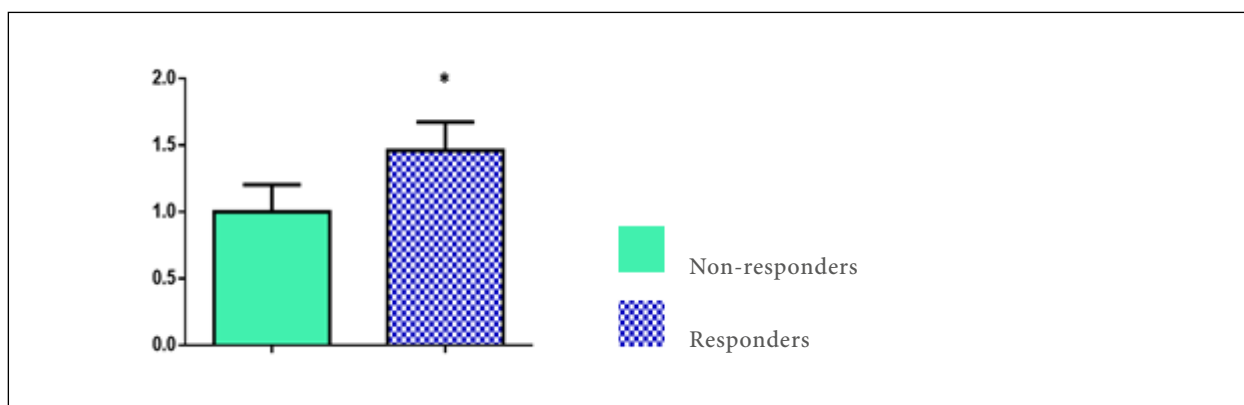


Figura 3. Differences in the expression of miR-222 between responder and non-responder subjects based on fasting insulin reduction after supplementation.

\* $P < 0,05$ . Modified from Ramos-Romero S, Léniz A et al. Mol Nutr Food Res.2021 Jan;65(2):e2000113.

### EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO DE LOS FLAVANOLES EN EL METABOLISMO POSTPRANDIAL DE SUJETOS CON DIABETES TIPO 2

#### PRELIMINARY EVALUATION OF FLAVANOL EFFECTS ON POSTPRANDIAL METABOLISM IN SUBJECTS WITH TYPE 2 DIABETES

Esther García-Díez<sup>1</sup>, María Ángeles Martín<sup>1,2</sup>, José Ignacio Vicente-Díez<sup>3</sup>, Sara García-Cabrera<sup>3</sup>, Sonia Ramos<sup>1</sup>, Jara Pérez-Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid

<sup>2</sup> CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Madrid,

<sup>3</sup> Centro de Salud Monóvar, Gerencia Asistencial de Atención Primaria, Servicio Madrileño de Salud, Madrid.

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se ha convertido en la enfermedad metabólica con mayor prevalencia mundial. Su desarrollo se debe principalmente a defectos en la secreción o acción de la insulina. Esto provoca hiperglucemia crónica, cuyo mal control acaba originando una alteración del perfil lipídico (aumento de los triglicéridos y en ocasiones aumento del colesterol LDL y disminución del colesterol HDL), junto con inflamación y estrés oxidativo, procesos exacerbados en el estado postprandial. En la actualidad, existe un gran interés en el estudio de aproximaciones dietéticas para retrasar o modular las alteraciones asociadas a esta patología. Así, los polifenoles son compuestos antioxidantes presentes en alimentos de origen vegetal, existiendo una evidencia creciente sobre su potencial (tanto para los compuestos intactos como para los metabolitos colónicos) en la modulación de la DMT2 por

diversos mecanismos de acción, como la inhibición de enzimas digestivas, o la estimulación de la secreción de insulina.

Para probar los efectos de los polifenoles de la dieta -concretamente flavanoles de alto peso molecular- en el metabolismo postprandial de sujetos con DMT2, se ha diseñado un producto fácilmente incorporable a la dieta habitual. Se trata de una mezcla de cacao puro y harina de algarroba en una proporción 60:40. Presenta un alto contenido en polifenoles ( $16,7 \pm 0,6$  g/100 g), donde aproximadamente el 70% son flavanoles, y en fibra dietética ( $55,7 \pm 0,9$  g/100 g). El producto se ha validado en un análisis sensorial hedónico ( $n=100$ ) donde se comparó con otros preparados comerciales con distintos porcentajes de cacao (22%, 70% y 100%). En este análisis, la mezcla de cacao y algarroba fue calificada como aceptable, con puntuaciones en algunos parámetros similares a las de productos comerciales, aumentando la calificación al realizar un segundo análisis sensorial en el que se proporcionaba información adicional sobre sus posibles efectos en salud.

Esta mezcla de cacao y algarroba será evaluada en un ensayo clínico nutricional aleatorizado y cruzado con un tamaño muestral de 25 sujetos (variable principal, insulina postprandial). En el ensayo se recogerán muestras de sangre, orina y heces -además de cuestionarios de saciedad- con objeto de estudiar las modificaciones postprandiales a) tras un desayuno rico en grasa y azúcares (control); b) tras ingerir al mismo tiempo el desayuno y el producto; y c) tras tomar el producto diez horas antes del desayuno (asociadas al efecto de los metabolitos colónicos). El ensayo clínico está actualmente en fase de reclutamiento, habiéndose inscrito hasta el momento doce sujetos con las siguientes características basales (media  $\pm$  DS): edad,  $60,5 \pm 5,1$  años; índice de masa corporal,  $31,1 \pm 3,2$  kg/m<sup>2</sup>; hemoglobina glicosilada,  $6,1 \pm 0,4$  %; todos ellos siguiendo tratamiento exclusivo con metformina como antidiabético.

Se espera que este ensayo clínico aporte resultados preliminares sobre el potencial de los polifenoles de alto peso molecular en la modulación de las alteraciones postprandiales presentes en la DMT2.

**Agradecimientos:** Agencia Estatal de Investigación (RTI2018-095059-B-I00), con cofinanciación de fondos FEDER (UE). Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y Fondo Social Europeo (PEJ-2020-AI/BIO-18529).

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) has become the metabolic disease with the highest worldwide prevalence. Its development is mainly due to defects in the secretion or action of insulin. This causes chronic hyperglycaemia, whose bad control may originate alterations in lipid profile (increase in triglycerides and sometimes also

in LDL cholesterol, together with a decrease in HDL cholesterol), together with inflammation and oxidative stress, processes that are exacerbated in the postprandial state. At present, there is great interest in the study of dietary approaches to delay or modulate the alterations associated with this pathology. In this context, polyphenols are antioxidant compounds present in foods of plant origin, with growing evidence on their potential (as intact compounds and as metabolites generated by the intestinal microbiota) for modulating T2DM by various mechanisms of action, such as the inhibition of digestive enzymes, or the stimulation of insulin secretion, among others.

In order to evaluate the effects of dietary polyphenols - specifically high molecular weight flavanols - on the postprandial metabolism of subjects with T2DM, a product easily incorporated into the usual diet was designed. It is a mixture of pure cocoa and carob flour in a 60:40 ratio. It has a high content in polyphenols ( $16.7 \pm 0.6$  g / 100 g), where approximately 70% are flavanols, and in dietary fiber ( $55.7 \pm 0.9$  g / 100 g). The product was validated in a hedonic sensory analysis ( $n=100$ ) where it was compared with other commercial preparations with different percentages of cocoa (22%, 70% and 100%). In this analysis, the cocoa and carob mixture was rated as acceptable, with scores in some parameters similar to those of commercial products. Indeed, the rating was increased when performing a second sensory analysis in which additional information was provided on the potential health effects of the product.

This cocoa-carob mixture will be evaluated in a randomized, crossover nutritional clinical trial. For this, a sample size of 25 subjects has been established, taking postprandial insulin as the primary outcome. In the trial, blood, urine and faecal samples will be collected -in addition to satiety questionnaires- in order to study postprandial modifications a) after a high-fat high-sugar breakfast (control); b) after eating breakfast and the product at the same time; and c) after taking the product ten hours before breakfast (associated with the effect of the colonic metabolites). The clinical trial is currently in the recruitment phase, having enrolled twelve subjects with the following baseline characteristics (mean  $\pm$  SD): age,  $60.5 \pm 5.1$  years; body mass index,  $31.1 \pm 3.2$  kg / m<sup>2</sup>; glycated haemoglobin,  $6.1 \pm 0.4$ %; all of them following exclusive treatment with metformin as antidiabetic drug.

This clinical trial is expected to provide preliminary results on the potential of high molecular weight polyphenols in modulating postprandial changes in T2DM.

**Acknowledgments:** Spanish Research Agency (RTI2018-095059-B-I00), with co-funding from FEDER funds (EU). Department of Education, Youth and Sports of Madrid Region (CM) and European Social Fund (PEJ-2020-AI/BIO-18529).



## IMPLICACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN SEPSIS

### IMPLICATION OF THE NLRP3 INFLAMMASOME IN SEPSIS

**Pablo Pelegrín**

*Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias (IMIB-Arrixaca), Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, España*

La respuesta inflamatoria es uno de los principales mecanismos efectores del sistema inmunitario innato coordinado por una serie de receptores y señales solubles, entre los que se encuentran los receptores de reconocimiento de patrones y las citoquinas. La inflamación se desencadena tras la activación de dichos receptores en células inmunitarias innatas tras el reconocimiento de moléculas presentes en patógenos o de moléculas liberadas en los procesos de muerte celular, y coordina una respuesta que culmina en la eliminación del patógeno o en la reparación tisular. La desregulación de la respuesta inflamatoria puede desencadenar su cronificación y el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, metabólicas o degenerativas. El inflamasoma se forma por un receptor intracelular del tipo de reconocimiento de patrones y entre los distintos inflama-

somas, el formado por el receptor NLRP3, es el principal que se activa en respuesta a señales de patógenos o del hospedador. Además, determinadas mutaciones ganancia-de-función en el gen *NLRP3* se asocian a síndromes autoinflamatorios. La activación del inflamasoma NLRP3 conlleva una serie de pasos de oligomerización que culminan con la activación de caspasa-1 (Figura 1).

Esta caspasa procesa y activa distintas pro-citoquinas de la familia de la interleuquina (IL)-1. Además, caspasa-1 procesa la proteína gasdermina D, cuyo extremo amino-terminal escindido homooligomeriza y formar poros en la membrana plasmática por los que se liberan las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-18 de la célula. La membrana plasmática que contiene estos poros puede repararse, pero si la estimulación de caspasa-1 continúa en el tiempo, la membrana termina destruyéndose por la entrada de agua incontrolada a la célula, resultando en un tipo de muerte celular necrótica denominada piroptosis. La piroptosis también libera otro contenido intracelular, incluyendo oligómeros de inflamasoma y ADN mitocondrial que contribuirán a la propagación de la respuesta inflamatoria.

La sepsis se caracteriza por ser un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica inducida por una infección y es la principal causa de muerte en las unidades de cuidados intensivos de los hospitales. El inflamasoma NLRP3 participa en la respuesta inflamatoria en sepsis y se ha descrito que ratones deficientes en NLRP3, así como ratones tratados

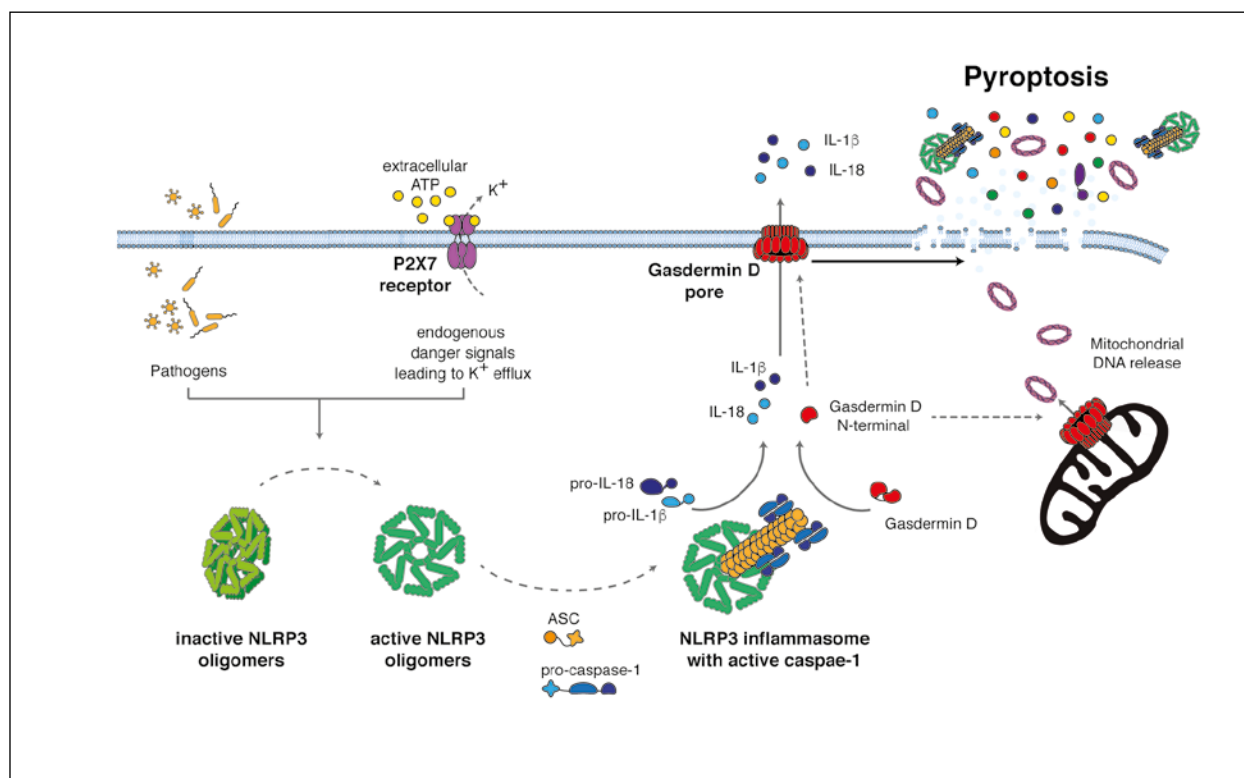


Figura 1. Esquema ilustrativo de la activación del inflamasoma NLRP3.  
Figure 1. Diagram showing the activation of the NLRP3 inflammasome.

con inhibidores de NLRP3, presentan una mayor supervivencia en modelos de sepsis. No obstante, en clínica los pacientes con sepsis desarrollan un estado inmunosupresor tras la respuesta inflamatoria, y es debido a ese estado inmunosupresor y las complicaciones causadas por infecciones secundarias, las que comprometen la viabilidad de los pacientes. Por tanto, el manejo clínico de los pacientes con sepsis es complicado y a día de hoy no existe un marcador pronóstico que discrimine de forma temprana aquellos pacientes que vayan a desarrollar complicaciones. La activación NLRP3 en muestras de sangre de pacientes sépticos a tiempos tempranos resultó en la estratificación de dichos pacientes, al haber un grupo con una deficiencia en su activación. Este grupo tuvo más complicaciones y acumuló la mayoría de muertes, sugiriendo que la determinación del grado de activación del inflammasoma NLRP3 podría constituir un marcador temprano para poder pronosticar la evolución de los pacientes sépticos.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por proyectos de investigación de FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-Agencia Estatal de Investigación (SAF2017-88276-R; PID2020-116709RB-I00), Fundación Séneca (20859/PI/18, 21081/PDC/19 y 00003/COVI/20), Instituto de Salud Carlos III (DTS21/00080), Comisión Europea H2020-SC1-2020-Single-Stage-RTD (965196 - PlasticHeal) y del *European Research Council* (ERC-2013-CoG 614578 y ERC-2019-PoC 899636).

The inflammatory response is a main effector mechanism of the innate immune system and it is coordinated by a signalling network triggered by different receptors and soluble factors, among them the pattern recognition receptors and cytokines play a central role. Inflammation coordinate the elimination of pathogens and initiate the regeneration of tissues and therefore is triggered by the engagement of these receptors in innate immune cells by ligand molecules from pathogens or necrotic cells. Dysregulation of the inflammatory response may lead to cornification and the development of chronic inflammatory, metabolic or degenerative diseases. The inflammasome is formed by an intracellular receptor of the pattern recognition family and among the different inflammasomes, the NLRP3 inflammasome, is the main that recognise pathogen- and host-derived signals. Gain-of-function mutations in *NLRP3* gene are associated to auto-inflammatory syndromes. The activation of the NLRP3 inflammasome follows a series of oligomerization steps that culminate with the activation of caspase-1 (Figure 1). This caspase is able to process different pro-cytokines of the interleukin (IL)-1 family to their active forms, such as IL-1 $\beta$  and IL-18. Also, caspase-1 process the protein gasdermin D, and its amino-terminal fragment oligomerize and form pores in the plasma membrane that are a release pathway for IL-1 $\beta$  and IL-18. The pores formed by gasdermin D in the plasma membrane could be repaired, but if caspase-1 activation prolongs in the time, the cell swells by massive water intake and

results in a type of inflammatory type of necrosis cell death called pyroptosis. Pyroptosis also results in the release of other intracellular content, as inflammasome oligomers and mitochondrial DNA that contributes to the propagation of the inflammatory response.

Sepsis is a systemic inflammatory response syndrome induced by an infection and constitute the main cause of deaths in the critical care units of the hospitals. The NLRP3 inflammasome participate in the inflammatory response in sepsis, and knock-out mice for NLRP3 or mice treated with specific NLRP3 inhibitors present an increased survival in sepsis models. However, in clinics septic patients develop an immunosuppression state after the inflammatory response that is the causative of secondary infections and complications that compromise the survival of septic patients. Therefore, the clinical management of septic patients is complex and up to date, there is any available prognostic marker to early discriminate septic patients that will develop future complications. The activation of the NLRP3 inflammasome in blood samples from septic patients at early time-points was able to stratify these patients, with a group presenting a defect in its activation. This septic patient group presented more complications and accumulated the majority of deaths, suggesting that the determination of the activation level of NLRP3 inflammasome could constitute a promising early prognostic marker to evaluate the evolution of the septic patients.

**Acknowledgements** This work was supported by grants to P.P. from *FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-Agencia Estatal de Investigación* (grant SAF2017-88276-R; PID2020-116709RB-I00), *Fundación Séneca* (grants 20859/PI/18, 21081/PDC/19 and 0003/COVI/20), *Instituto de Salud Carlos III* (DTS21/00080), *European Commission* H2020-SC1-2020-Single-Stage-RTD (965196 - PlasticHeal) and *European Research Council* (grants ERC-2013-CoG 614578 and ERC-2019-PoC 899636).

### ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 CON MUTACIONES PRESENTES EN EL SÍNDROME PERIÓDICO ASOCIADO A CRIPIRINA

### ACTIVATION AND REGULATION OF THE NLRP3 INFLAMMASOME WITH MUTATIONS LINKED TO CRYOPYRIN ASSOCIATED PERIODIC SYNDROMES

Cristina Molina-López<sup>1</sup>, Diego Angosto-Bazarra<sup>1</sup>, Ana Tapia-Abellán<sup>1</sup>, Laura Hurtado-Navarro<sup>1</sup>, Pablo Pelegrín<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias (IMIB-Arrixaca), Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, España



Los síndromes periódicos asociados a criopirina (CAPS) son una serie de condiciones hereditarias que debutan temprano con auto-inflamación producida por distintas mutaciones de ganancia-de-función (GdF) en el gen *NLRP3*, originando una activación del inflammasoma *NLRP3* y sobreproducción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18.

La activación del inflammasoma *NLRP3* silvestre se induce por señales endógenas de daño tisular o exógenas asociadas a patógenos. Este inflammasoma está formado por la proteína *NLRP3*, la proteína adaptadora ASC y la enzima efectora pro-caspasa-1. Al formarse el inflammasoma, la pro-caspasa-1 se activa y escinde IL-1 $\beta$  e IL-18 a su forma madura. También procesa la proteína gasdermina D (GSDMD), cuyo extremo aminoterminal forma poros en la membrana plasmática, induciendo la liberación de contenido intracelular y originando una muerte celular denominada piroptosis. Sin embargo, el mecanismo de activación y regulación del inflammasoma *NLRP3* con mutaciones GdF está poco estudiado. En este trabajo estudiamos cómo la proteína *NLRP3* con mutaciones GdF se activa en condiciones libre de patógenos en pacientes con CAPS, cómo el MCC950 (un inhibidor específico de *NLRP3*) puede inhibir esta activación, qué moléculas además de IL-1 $\beta$  e IL-18 se liberan aguas abajo de la activación del inflammasoma mutante y, cómo se regula post-traduccionalmente el inflammasoma *NLRP3* con mutaciones GdF.

Este trabajo ha empleado macrófagos inmortalizados de ratón deficientes en *Nlrp3* con un sistema inducible Tet-ON para expresar varios *NLRP3* humano con mutaciones GdF presentes en pacientes con CAPS que se compararon con macrófagos transducidos con un vector vacío o un vector que expresa *NLRP3* silvestre. Sangre de pacientes con CAPS se empleó para estudiar la producción de IL-1 $\beta$  y la formación de oligómeros de ASC como indicador de activación de *NLRP3*. Las células fueron tratadas con LPS, Pam3CSK<sub>4</sub>, IL-6, S100A9, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , palmitato, ATP o cristales de ácido úrico a diferentes concentraciones y tiempos en ausencia o presencia de MCC950 o de distintos inhibidores de deubiquitinasa. El comité de ética clínica aprobó este estudio.

A diferencia de la expresión de *NLRP3* silvestre, la expresión de *NLRP3* con mutaciones GdF resulta en una activación del inflammasoma y consecuentemente de caspasa-1 y el posterior procesamiento de GSDMD, seguido de la liberación de ciertas proteínas celulares como IL-18, P2X7 y LDH. Por otra parte, solo se observó liberación de IL-1 $\beta$  tras el tratamiento con LPS, Pam3CSK<sub>4</sub>, IL-6, palmitato y S100A9, ya que activan a NF- $\kappa$ B y la expresión del gen de la *Il1b*. El inhibidor MCC950 confirmó la implicación de *NLRP3* al bloquear la liberación de IL-1 $\beta$ , IL-18, HMBG1, IL-1 $\alpha$ , P2X7, cistatina B y anexina-1, pero no de TNF- $\alpha$ . Distintos inhibidores de deubiquitinasa fueron capaces de reducir la activación de *NLRP3* con

mutaciones GdF al reducir el procesamiento de GSDMD y la liberación de IL-1 $\beta$ .

Las mutaciones de GdF en *NLRP3* inducen una activación basal del inflammasoma respecto a *NLRP3* silvestre, y aunque esta activación está estrechamente ligada al nivel de expresión, su activación se puede regular e incrementar en respuesta a diferentes señales endógenas (como son IL-6, palmitato o S100A9) y además post-traduccionalmente por la de-ubiquitinación.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por proyectos de investigación de FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-Agencia Estatal de Investigación (SAF2017-88276-R; PID2020-116709RB-I00), Fundación Séneca (20859/PI/18, 21081/PDC/19 y 00003/COVI/20), Instituto de Salud Carlos III (DTS21/00080), Comisión Europea H2020-SC1-2020-Single-Stage-RTD (965196 - PlasticHeal) y del *European Research Council* (ERC-2013-CoG 614578 y ERC-2019-PoC 899636). Laura Hurtado-Navarro tiene una beca de la Fundación Séneca (Región de Murcia, Spain) 21214/FPI/19. Cristina Molina-López tiene una beca de Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-Agencia Estatal de Investigación (PRE2018-087063).

Cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) are a group of hereditary auto-inflammatory disorders that result from the gain-of-function mutations in the *NLRP3* gene, resulting in the autoactivation of the *NLRP3* inflammasome and the overproduction of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18. For wild-type *NLRP3*, different pathogen and host-related signals are required to activate the *NLRP3* inflammasome, which is formed by *NLRP3*, the adaptor protein ASC and the effector enzyme pro-caspase-1. Once the inflammasome is formed, pro-caspase-1 is activated and cleaves pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 to their active forms and gasdermin D which then its N-terminal fragment form pores in the plasma membrane, through where IL-1 $\beta$ , IL-18 and intracellular content are released. Gasdermin D pores then drives a specific type of cell death called pyroptosis. However, the activation and regulation mechanism of mutant *NLRP3* is still poorly known.

Questions such as how the activity of mutated *NLRP3* is regulated in sterile conditions in patients; whether MCC950 (a specific inhibitor of *NLRP3*) is able to inhibit this activation; what molecules besides IL-1 $\beta$  and IL-18 are implicated downstream the activation pathway; and how *NLRP3* mutant is regulated at post-translational level are still unknown.

*Nlrp3*-deficient immortalized mouse macrophages with a Tet-ON inducible system were used to express several *NLRP3* variants with mutations present in CAPS patients and compared to macrophages transduced with empty vector or

with wild-type NLRP3. CAPS patient blood was used to study IL-1 $\beta$  production and formation of ASC oligomers as readouts of NLRP3 activation. Cells were treated with LPS, Pam3CSK<sub>4</sub>, IL-6, S100A9, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , palmitate, ATP, or uric acid crystals at different concentrations and times in the absence or presence of MCC950 or with different de-ubiquitinase inhibitors. The clinical ethics committee of the Clinical University Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia) approved this study.

Contrasting with the expression of wild-type NLRP3, the sole expression of mutant NLRP3 results in a constitutive activation of the inflammasome with the activation of caspase-1 and gasdermin D cleavage, followed by the release of several cellular proteins as IL-18, P2X7 or LDH. IL-1 $\beta$  release was only observed after LPS, Pam3CSK<sub>4</sub>, IL-6, palmitate and S100A9 treatment, compounds that activate NF- $\kappa$ B and the subsequent expression of *Il1b* gene. MCC950 was able to block the release of IL-1 $\beta$ , IL-18, HMGB1, IL-1 $\alpha$ , P2X7, cystatin B, annexin-1 but not TNF- $\alpha$ , confirming NLRP3 activation. Deubiquitinase inhibitors were able to reduce NLRP3 activation and IL-1 $\beta$  release when mutant NLRP3 was expressed, suggesting that ubiquitination of mutant NLRP3 restrict its activity.

Gain-of-function NLRP3 mutations present a basal activation with respect to wild-type NLRP3, and its activation tightly depends on its expression levels, but could be further increased by different endogenous host-derived signals, such as IL-6, palmitate or S100A9 proteins. Additionally, mutated auto-active NLRP3 is post-translational regulated by ubiquitination, that impairs its auto-activation. This study shed new light into the origins of non-infectious inflammatory flares in CAPS patients.

**Acknowledgements:** This work was supported by grants to P.P. from FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-Agencia Estatal de Investigación (grant SAF2017-88276-R; PID2020-116709RB-I00), Fundación Séneca (grants 20859/PI/18, 21081/PDC/19 and 0003/COVI/20), Instituto de Salud Carlos III (DTS21/00080), European Commission H2020-SC1-2020-Single-Stage-RTD (965196 - PlasticHeal) and European Research Council (grants ERC-2013-CoG 614578 and ERC-2019-PoC 899636). Laura Hurtado-Navarro was supported by the fellowship 21214/FPI/19 (Fundación Séneca, Región de Murcia, Spain). Cristina Molina-López was supported by the fellowship PRE2018-087063 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-Agencia Estatal de Investigación, Spain).

## ACTIVACIÓN DE LOS INFLAMASOMAS PIRINA Y NLRP3 DURANTE LA SEPSIS

### ACTIVATION OF THE PYRIN AND NLRP3 INFLAMMASOMES DURING SEPSIS

Laura Hurtado-Navarro<sup>1</sup>, Laura Martínez-Alarcón<sup>1</sup>, Graciela Valero-Navarro<sup>1,2</sup>, Carlos García-Palenciano<sup>1,3</sup>, Pablo Pelegrín<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias (IMIB-Arrixaca), Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España

<sup>2</sup>Servicio de Cirugía General, Hospital Universitario JM Morales Meseguer, Murcia, España

<sup>3</sup>Servicio de Anestesiología y Reanimación, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, España

La sepsis es una de las principales causas de muerte en las unidades de cuidados intensivos y se define como una respuesta inflamatoria sistémica seguida por un estado de inmunosupresión. Se conoce que el inflammasoma NLRP3 participa en dicho proceso, sin embargo, el papel de otros inflammasomas, como Pirina, no está totalmente caracterizado.

Se recogieron muestras de 20 individuos con una sepsis de origen intraabdominal, 19 individuos sometidos a una cirugía abdominal que no desarrollaron sepsis y 29 controles sanos. El Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia) aprobó este estudio y sus procedimientos. El inflammasoma NLRP3 se estimuló en sangre completa con LPS+ATP y el inflammasoma Pirina con LPS+TcdB. La determinación de oligómeros de ASC en monocitos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>-</sup>) se realizó por citometría de flujo y la determinación de citoquinas por ELISA. Se evaluaron parámetros clínicos, hematológicos y bioquímicos de todos los pacientes.

A las 24h del inicio del episodio séptico, los pacientes presentaban marcadores de inflamación sistémica como PCR y PCT elevados en plasma (Figura 1). La liberación de IL-1 $\beta$  en las muestras de sangre y la formación de oligómeros de ASC en monocitos tras la estimulación de NLRP3 resultó en una respuesta diferencial entre los pacientes sépticos, identificando entre ellos un grupo de 10 individuos con una respuesta inmunocomprometida del inflammasoma NLRP3 y 4 individuos con una respuesta normal del mismo (Figura 2A). Sin embargo, todos los individuos estudiados presentaron una respuesta normal cuando se activaba el inflammasoma Pirina (Figura 2B).

Los pacientes inmunocomprometidos para NLRP3 presentaron elevados distintos parámetros de severidad, tanto bioquímicos como clínicos, como las escalas SOFA y APACHEII, así como un peor pronóstico al necesitar más días en la unidad de cuidados intensivos, días con ventilación mecánica y elevada mortalidad (Figura 2).

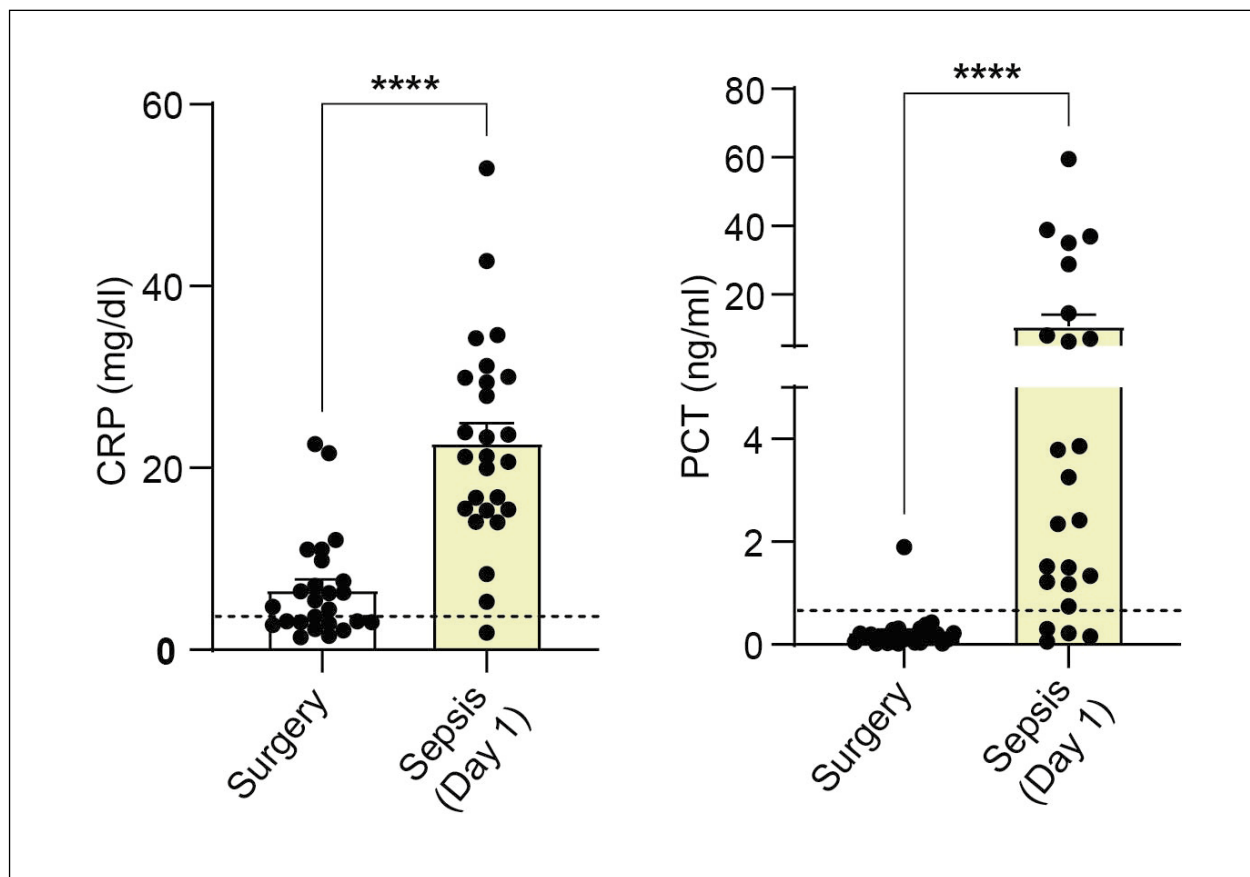


Figura 1. Concentración de PCR y PCT en el plasma de los pacientes tras 24h de una cirugía abdominal sin desarrollo de sepsis y de los pacientes sépticos tras 24h de la admisión en las unidades de cuidados intensivos. Las líneas discontinuas indican los valores estándar de dichas proteínas en el plasma de la población sana y cada punto representa un paciente individual reclutado en el estudio.

Figure 1. Plasma concentration of CRP and PCT in abdominal surgery patients (24 h after abdominal surgery) and intra-abdominal origin septic patients within the first 24 h of admission to the surgical critical unit. Dotted lines represent standard threshold for CRP and PCT in healthy population and each dot represents an individual patient recruited in this study.

La concentración de PCR y PCT en plasma disminuyó después de 3 y 5 días del episodio séptico en todos los pacientes, indicando una resolución gradual de la inflamación sistémica. En el alta hospitalaria, aquellos pacientes inmunocomprometidos para NLRP3 que sobrevivieron y se recuperaron, presentaron una mejora en la respuesta del inflammasoma NLRP3. Esto sugiere que la alteración en la respuesta del inflammasoma NLRP3 es un estado transitorio durante el episodio séptico (Figura 3).

Nuestro estudio confirma que durante la fase inflamatoria inicial de la sepsis existe una respuesta diferencial del inflammasoma NLRP3 en los pacientes sépticos. Por otra parte, la respuesta del inflammasoma Pirina fue similar en todos los pacientes, lo que indica que este inflammasoma presenta unos mecanismos regulatorios diferentes durante la sepsis. Por tanto, la inhibición del inflammasoma NLRP3 durante la sepsis podría considerarse un indicador temprano de inmunosupresión en pacientes críticos, mientras que el inflammasoma Pirina emerge como un control positivo de la respuesta inflamatoria a este proceso. Además, la recuperación de la respuesta del inflammasoma NLRP3 en monocitos podría considerarse un

indicador de la recuperación de la respuesta inmunitaria en los pacientes sépticos.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por proyectos de investigación de FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-Agencia Estatal de Investigación (SAF2017-88276-R; PID2020-116709RB-I00), Fundación Séneca (20859/PI/18, 21081/PDC/19 y 00003/COVI/20), Instituto de Salud Carlos III (DTS21/00080), Comisión Europea H2020-SC1-2020-Single-Stage-RTD (965196 - PlasticHeal) y del *European Research Council* (ERC-2013-CoG 614578 y ERC-2019-PoC 899636). Laura Hurtado-Navarro tiene una beca de la Fundación Séneca (Región de Murcia, Spain) 21214/FPI/19.

Sepsis is the leading cause of death in critical care units and it is defined by a systemic inflammatory response which is followed with an immunosuppression of the host. While the function of the NLRP3 inflammasome is involved in sepsis, the function of other inflammasomes, like the Pyrin inflammasome, is not well known.

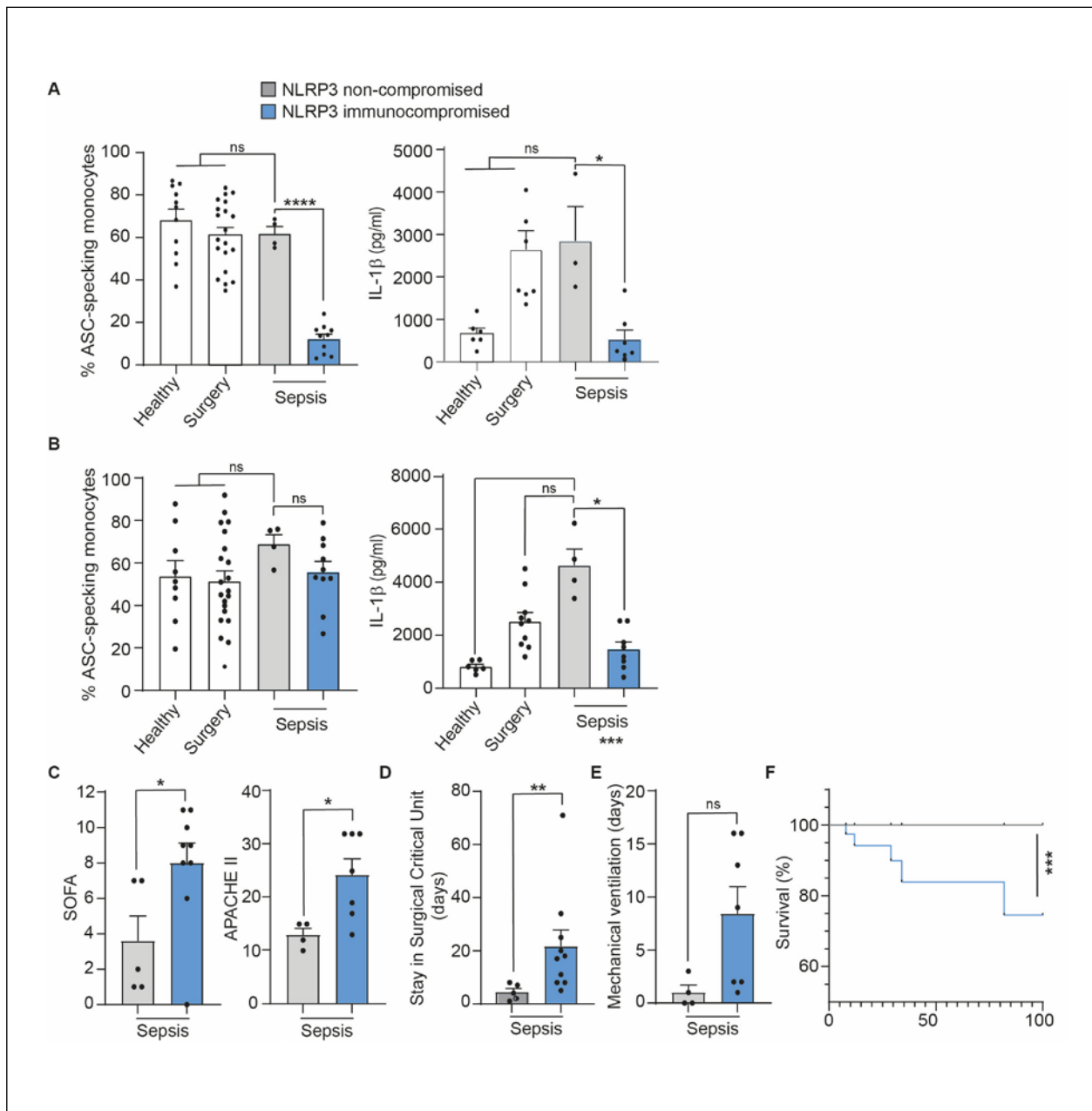


Figura 2. Panel A. Porcentaje de monocitos con oligómeros intracelulares de ASC (izquierda) y ELISA de IL-1β (derecha) en ensayos de sangre completa procedentes de los pacientes sépticos tras 24h de la admisión en las unidades de cuidados intensivos (barras grises y azules) y en los grupos control (barras blancas) después de la activación del inflammasoma NLRP3 con LPS (1 μg/ml, 2 h) y ATP (3 mM, 30 min). Panel B. Porcentaje de monocitos con oligómeros intracelulares de ASC (izquierda) y ELISA de IL-1β (derecha) en ensayos de sangre completa procedentes de los pacientes sépticos tras 24h de la admisión en las unidades de cuidados intensivos (barras grises y azules) y en los grupos control (barras blancas) después de la activación del inflammasoma Pirina con LPS (1 μg/ml, 2 h) y TcdB (1 μg/ml, 1 h). Panel C. Escalas SOFA y APACHEII para los pacientes sépticos. Panel D. Números de días en las unidades de cuidados intensivos de los pacientes sépticos. Panel E. Número de días con ventilación mecánica de los pacientes sépticos. Panel F. Supervivencia de los pacientes sépticos. El grupo de pacientes con una respuesta normal para el inflammasoma NLRP3 está representado con una línea gris y el grupo inmunocomprometido para dicho inflammasoma una línea azul.

Figure 2. Panel A. Percentage of monocytes with intracellular ASC specks (left) and ELISA for IL-1β (right) in whole blood samples from septic patients within the first 24h of admission to the surgical critical unit (grey and blue bars) and control groups (white bars) after NLRP3 inflammasome activation by LPS (1 μg/ml, 2 h) and ATP (3 mM, 30 min) treatment. Panel B. Percentage of monocytes with intracellular ASC specks (left) and ELISA for IL-1β (right) in whole blood samples from septic patients within the first 24h of admission to the surgical critical unit (grey and blue bars) and control groups (white bars) after Pirin inflammasome activation by LPS (1 μg/ml, 2 h) and TcdB (1 μg/ml, 1 h) treatment. Panel C. SOFA and APACHEII score for septic patients. Panel D. Number of days of septic patients in the Critical Care Unit. Panel E. Number of days of septic patients with mechanical ventilation. Panel F. Septic patients' survival. NLRP3 non-immunocompromised patient group is represented with a grey line and immunocompromised patient group with a blue line.



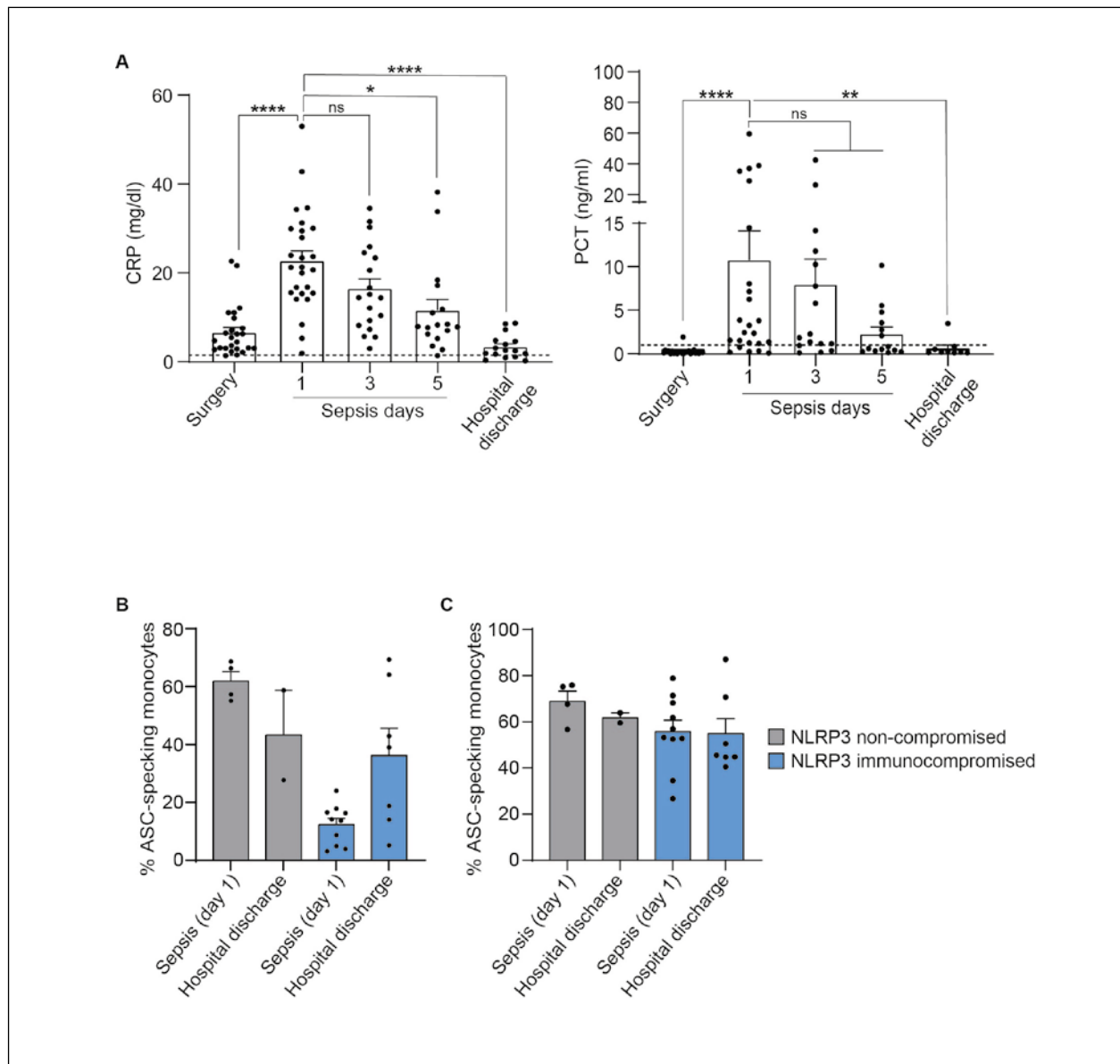


Figura 3. Panel A. Concentración de proteína C reactiva y procalcitonina en el plasma de los pacientes sépticos en los días 1, 3 y 5 tras el inicio de la sépsis, así como en el momento del alta hospitalaria. Las líneas discontinuas indican los valores estándar de dichas proteínas en la población sana. Panel B, C. Porcentaje de monocitos con oligómeros intracelulares de ASC después de la activación del inflammasoma NLRP3 con LPS (1 µg/ml, 2 h) y ATP (3 mM, 30 min) (Panel B) o tras la activación del inflammasoma Pirina con LPS (1 µg/ml, 2 h) y TcdB (1 µg/ml, 1 h) (Panel C) en ensayos de sangre completa procedentes de los pacientes sépticos sin inmunosupresión del inflammasoma NLRP3 (barras grises) o con inmunosupresión del inflammasoma NLRP3 (barras azules).

Figure 3. Panel A. Concentrations of C-reactive protein and procalcitonin in plasma of septic patients at days 1, 3 and 5 during sepsis and at the moment of hospital discharge. Dotted lines represent standard threshold for CRP and PCT in healthy population. Panel B, C. Percentage of monocytes with intracellular ASC specks after NLRP3 inflammasome activation by LPS (1 µg/ml, 2 h) and ATP (3 mM, 30 min) treatment (Panel B) or after Pyrin inflammasome activation by LPS (1 µg/ml, 2 h) and TcdB (1 µg/ml, 1 h) treatment (Panel C) in whole blood samples from septic patients non-immunocompromised (grey bars) or immunocompromised for NLRP3 (blue bars).

Individuals with intra-abdominal origin sepsis (n=20), abdominal surgery individuals that had not developed sepsis (n=19), and a healthy control group (n=29) were recruited. The clinical ethics committee of the Clinical University Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia, Spain) approved this study and its procedures. NLRP3 inflammasome was stimulated

in whole blood by LPS+ATP and Pyrin inflammasome with LPS+TcdB. Flow cytometry was used to determine the formation of ASC specks formation in monocytes (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>-</sup>) and ELISA to determine cytokine secretion. The evolution of clinical parameters, haematological features and plasma biochemistry parameters were evaluated.

Systemic inflammatory markers like CRP or PCT were elevated in septic patients' plasma 24h after sepsis initiation when compared to the control groups (Figure 1), indicating an inflammatory state of the septic patients. The release of IL-1 $\beta$  in whole blood samples and the formation of ASC specks in monocytes after NLRP3 stimulation resulted in a differential response among septic patients, identifying a group of 10 individuals with an impaired NLRP3 inflammasome activation and 4 individuals with a normal response of the NLRP3 inflammasome (Figure 2A). However, all septic patients presented a non-impaired activation of the Pysin inflammasome (Figure 2B).

Septic patients with impaired NLRP3 inflammasome had biochemical and clinical scores of disease severity above the average. Specifically, SOFA and APACHEII were higher at admission in the group with NLRP3 inflammasome impairment (Figure 2), and these individuals also present worst disease progression measured as days in the critical care unit, days with mechanical ventilation and mortality (Figure 2).

Plasma concentration of CRP and PCT decreased after 3 and 5 days of sepsis onset in all septic patients, indicating a gradual resolution of systemic inflammation (Figure 3A). At hospital discharge, NLRP3-immunocompromised septic patients who survived and recovered from sepsis had an improvement on NLRP3 activation. Non-compromised NLRP3 septic patients had normal ASC-speck formation during the course of sepsis (Figure 3B-C). This suggests that NLRP3 inflammasome impairment during sepsis is a transitory state.

Our study confirms that during the initial inflammatory response in sepsis there is a differential response of the NLRP3 inflammasome in septic patients. The identification of NLRP3-immunocompromised septic patients was optimized in a whole blood assay and accounted for most late deaths and have the worse prognosis. Whereas, the Pysin inflammasome response was similar in patients and suggests that Pysin inflammasome present different regulation mechanisms inflammasome during sepsis.

The impairment of the NLRP3 inflammasome in septic patients might serve as an early indication of immunosuppression in critical patients, while the Pysin inflammasome emerge as a positive control of inflammasome activation. Moreover, restoration of NLRP3 inflammasome activation in monocytes could be a good indicator of immune recovery in septic patients.

**Acknowledgements:** This work was supported by grants to P.P. from FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-Agencia Estatal de Investigación (grant SAF2017-88276-R; PID2020-116709RB-I00), Fundación Séneca (grants 20859/PI/18, 21081/PDC/19 and 0003/COVI/20), Instituto de Salud Carlos III (DTS21/00080), European Commission H2020-SC1-2020-Single-Stage-RTD (965196 - PlasticHeal) and European Research Council (grants ERC-2013-CoG 614578 and ERC-2019-PoC 899636). Laura Hurtado-Navarro was supported by the fellowship 21214/FPI/19 (Fundación Séneca, Región de Murcia, Spain).

## LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN EL SÍNDROME DE DOWN: UNA FORMA DE ALZHEIMER GENÉTICAMENTE DETERMINADA

### DOWN SYNDROME ASSOCIATED ALZHEIMER'S DISEASE: A GENETICALLY DETERMINED FORM OF DEMENTIA

Juan Fortea<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Sant Pau Memory Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> CIBERNED, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Barcelona Down Medical Center, Fundació Catalana de Síndrome de Down, Barcelona, Spain

El síndrome de Down es una forma de enfermedad de Alzheimer determinada genéticamente debido al efecto de la dosis del gen de la proteína precursora del amiloide. Como resultado, la patología de la enfermedad de Alzheimer se desarrolla en el cerebro desde la adolescencia y, a los 40 años, todos los individuos tienen placas de amiloide y ovillos neurofibrilares compuestas por la proteína tau hiperfosforilada. El riesgo acumulado de desarrollar demencia por enfermedad de Alzheimer supera ampliamente el 90% en la séptima década de la vida. En consecuencia, la enfermedad de Alzheimer es ahora el principal problema médico y la principal causa de muerte en esta población. Recientemente se ha puesto de manifiesto en estudios patológicos y de biomarcadores que la fisiopatología y una historia natural de la enfermedad de Alzheimer es muy similar a la descrita en la enfermedad de Alzheimer esporádica y autosómica dominante. Sin embargo, el infradiagnóstico es frecuente debido a la falta de conocimiento por parte de médicos y familiares y a los desafíos diagnósticos que plantea la discapacidad intelectual asociada al síndrome de Down. Los biomarcadores, incluidos los plasmáticos, han mostrado resultados muy prometedores en el diagnóstico, pero actualmente solo se utilizan en escasos centros en contexto de investigación. No existen tratamientos para prevenir la enfermedad a pesar de que el síndrome de Down es probablemente la mejor población para realizar ensayos de prevención de la enfermedad de Alzheimer, ya que es una población única y relativamente prevalente con una etiología conocida. La investigación en síndrome de Down es fundamental para mejorar la calidad de vida y encontrar tratamientos para la enfermedad de Alzheimer que puedan beneficiar tanto al síndrome de Down como a la población en general.

Down syndrome is form of genetically determined Alzheimer's disease due to the amyloid precursor protein gene dose effect. As a result Alzheimer's disease pathology develops in the brain since adolescence and by age 40 all individuals have amyloid plaques and tau neurofibrillary tangles. The lifetime risk to develop Alzheimer's disease dementia is well over 90% by the seventh decade of life.

Consequently, Alzheimer's disease is now the main medical problem and the leading cause of death in this population. Increasing evidence from pathological and biomarker studies show a very similar pathophysiology and natural history to that described in sporadic and autosomal dominant Alzheimer's disease. However, underdiagnosis is frequent due to a lack of awareness and diagnostic challenges posed by the intellectual disability associated with Down syndrome. Biomarkers, including those in plasma, have shown very promising results in diagnosis, but are currently only used in rare research settings. Most importantly, there are no treatments to prevent the disease despite the fact Down syndrome is probably the best population in which to conduct Alzheimer's disease prevention trials as it is a unique and relatively prevalent population with a known aetiology. Research in Down syndrome is essential to improve the quality of life and find treatments for Alzheimer's disease that might benefit both the Down syndrome and the general population.

### AMYQ: UN ÍNDICE INDEPENDIENTE DE RM PARA ESTANDARIZAR LA CARGA DE AMILOIDE EN EL CEREBRO

#### AMYQ: AN MRI-INDEPENDENT INDEX TO STANDARDIZE AMYLOID LOAD IN THE BRAIN

Jordi Pegueroles<sup>1,3</sup>, Eduard Vilaplana<sup>1,3</sup>, Daniel Alcolea<sup>1,3</sup>, Victor Montal<sup>1,3</sup>, Alexandre Bejanin<sup>1,3</sup>, Mateus Aranha<sup>1,3</sup>, Miguel Angel Santos-Santos<sup>1,3</sup>, Ignasi Carrió<sup>2</sup>, Valle Camacho<sup>2</sup>, Rafael Blesa<sup>1,3</sup>, Alberto Lleó<sup>1,3</sup>, Juan Fortea<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Sant Pau Memory Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Department of Nuclear Medicine, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

**Introducción:** Los métodos de cuantificación de amiloide con trazadores PET requieren de una resonancia magnética estructural (RM) para la normalización espacial, y usan diferentes regiones de referencia para escalar la imagen.

Además, los diferentes trazadores tienen distintos umbrales de positividad. Este trabajo proporciona una nueva medida estandarizada para la cuantificación del amiloide que salva estas limitaciones: el AMYQ.

**Métodos:** Seleccionamos todas las imágenes PET de amiloide con trazadores de Flúor (F18) de la "Australian Imaging, Biomarker & Lifestyle Flagship Study of Ageing" (AIBL) y "Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative" (ADNI) con la

correspondiente RM estructural. Una submuestra disponía también de datos neuropatológicos. Se creó una plantilla de PET de amiloide usando análisis de componentes principales (PCA). Mediante esta plantilla PET, se normalizaron las imágenes PET individuales y se calculó el AMYQ. Comparamos el rendimiento de AMYQ con la escala Centiloide en el diagnóstico clínico y neuropatológico. Además, evaluamos la habilidad del AMYQ de discriminar la positividad de PET cuantificada con RM.

**Resultados:** AMYQ se relacionó con las medidas neuropatológicas de amiloide y tuvo un rendimiento excelente para discriminar controles de pacientes con enfermedad de Alzheimer (área bajo la curva = 0.86). AMYQ se asoció con el centiloide en la muestra combinada de los tres trazadores (coeficiente de correlación intra-clase = 0.88) y mostró una área bajo la curva de entre 0.94 y 0.99 para discriminar la positividad de PET usando diferentes umbrales de Centiloide.

**Conclusiones:** AMYQ es un nuevo índice estándar de carga de amiloide que no requiere de RM y es aplicable a los tres trazadores 18F de PET de amiloide.

**Introduction:** Positron emission tomography (PET) amyloid quantification methods require magnetic resonance imaging (MRI) for spatial registration and use of different a priori reference regions to scale the images. Furthermore, different tracers have distinct thresholds for positivity. This work provides a new standard measure of amyloid burden to overcome these limitations: AMYQ.

**Methods:** We selected all 18Fluor-radiolabeled amyloid PET scans from AIBL and ADNI and the corresponding structural MRI. A subset also had neuropathological data. We created an amyloid PET template using a principal component analysis (PCA). Through this PET template, individual amyloid PET scans were spatially normalized and AMYQ was computed. We compared the performance of AMYQ with the Centiloid scale on clinical and neuropathological diagnostic performance. Additionally, we assessed the performance of AMYQ in discriminating amyloid PET positive from amyloid PET negative quantified with the MRI.

**Results:** AMYQ was related with amyloid neuropathological burden and had excellent diagnostic performance to discriminate controls from patients with Alzheimer's disease (AD) (area under the curve = 0.86). AMYQ had a high agreement with the Centiloid scale in the combined sample of the three tracers (intraclass correlation coefficient = 0.88) and showed an AUC between 0.94 and 0.99 to discriminate PET positivity when using different Centiloid cutoffs.

**Conclusions:** AMYQ is a new standard index of amyloid burden that do not require MRI and is applicable to the three 18Fluor-radiolabeled amyloid tracers.



**MICROINFARTOS CORTICALES A LO LARGO DEL ESPECTRO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN ADULTOS CON SÍNDROME DE DOWN**

**CORTICAL MICROINFARCTS ALONG THE ALZHEIMER'S DISEASE CONTINUUM IN ADULTS WITH DOWN SYNDROME**

Mateus Rozalem Aranha<sup>1,2</sup>, Alexandre Bejanin<sup>1,2</sup>, Victor Montal<sup>1,2</sup>, Jordi Pegueroles<sup>1,2</sup>, Maria Carmona-Iragui<sup>1,2,3</sup>, Laura Videla<sup>1,2,3</sup>, Bessy Benejam<sup>1,2,3</sup>, Sílvia Valldeneu<sup>1,2</sup>, Isabel Barroeta<sup>1,2,3</sup>, Miren Altuna<sup>1,2</sup>, Susana Fernández<sup>3</sup>, Diana Garzón<sup>1,2</sup>, Concepción Padilla<sup>1,2</sup>, M. Florencia Iulita<sup>1,2,4</sup>, Daniel Alcolea<sup>1,2</sup>, Sofía González-Ortiz<sup>5</sup>, Rafael Blesa<sup>1,2</sup>, Alberto Lleó<sup>1,2</sup>, Juan Fortea<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Sant Pau Memory Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> CIBERNED, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Barcelona Down Medical Center, Fundació Catalana de Síndrome de Down, Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Women's Brain Project, Switzerland

<sup>5</sup> Parc de Salut, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

**Introducción:** Microinfartos corticales (MIC) son biomarcadores de daño vascular cerebral detectables visualmente en exámenes de resonancia magnética (RM) 3T, están relacionados con deterioro cognitivo y son más frecuentes en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA). Todavía, ningún estudio sobre MIC en personas con síndrome de Down (SD), una forma genética de la EA, ha sido realizado. Por lo tanto, nuestro objetivo es cuantificar los MIC en una cohorte de base poblacional de adultos con SD y acceder la relación de estas lesiones con la edad, el sexo, el estadio clínico y el genotipo APOE.

**Métodos:** Estudio transversal. Analizamos imágenes cerebrales de RM 3T de 78 adultos con SD (31 asintomáticos, 24 con EA prodrómica y 23 EA demencia) de la cohorte DABNI (Down Alzheimer Barcelona Neuroimaging Initiative) y de 10 controles euploides cognitivamente normales de la cohorte SPIN (Sant Pau Initiative in Neurodegeneration). Las imágenes de RM 3T fueron analizadas por un neuroradiólogo (ciego para el diagnóstico clínico, la edad y el genotipo APOE) de acuerdo con protocolo validado previamente para detectar y segmentar manualmente los MIC. En primer lugar, comparamos la presencia, el número y el volumen de MIC en distintos estadios clínicos de la EA de alzheimer, en portadores y no-portadores del alelo ε4 del gen APOE y en hombres y mujeres utilizando los testes Chi-cuadrado, Mann-Whitney o Kruskal-Wallis cuando apropiado. Por fin, investigamos la asociación del número y volumen de MIC con la edad utilizando el test de correlación de Spearman.

**Resultados:** MIC son detectables en 64% de los adultos con SD y en 30% de los controles euploides. No encontramos diferencias significativas en la prevalencia, el número o el volumen de MIC entre participantes con SD asintomáticos,

prodrómicos y dementes ( $p_{\text{qui-cuadrado}}=0.806$ ,  $p_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.547$  y  $p_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.585$ ), entre hombres y mujeres ( $p_{\text{chi-cuadrado}}=0.762$ ,  $p_{\text{Mann-Whitney}}=0.431$  y  $p_{\text{Mann-Whitney}}=0.313$ ), y entre portadores y no-portadores de APOE ε4 ( $p_{\text{qui-cuadrado}}=0.815$ ,  $p_{\text{Mann-Whitney}}=0.968$  y  $p_{\text{Mann-Whitney}}=1.000$ ). Tampoco observamos correlación del número y del volumen de MIC con la edad ( $p_{\text{Spearman}}=0.740$ ,  $r^2=-0.04$  y  $p_{\text{Spearman}}=0.875$ ,  $r^2=-0.02$ , respectivamente).

**Conclusiones:** MIC son detectables en adultos con SD utilizando RM 3T, con altamente frecuentes en esta población y son más frecuentes en personas con SD que en controles euploides. Todavía no encontramos correlaciones entre la prevalencia, el número o el volumen de MIC con los estadios clínicos de la EA, el genotipo APOE, el sexo o la edad.

**Background:** Cortical microinfarcts (CMI) are emerging biomarkers of vascular damage that are visually detectable with 3T-MRI, associated with cognitive decline, and more frequent in AD patients. However, no study assessed CMI in Down syndrome (DS), a genetically determined form of AD. Therefore, we aimed to quantify CMI in a population-based cohort of adults with DS and assess the relationship with age, sex, clinical status, and APOE genotype.

**Methods:** Cross-sectional study. We analyzed 3T-MRI of 78 adults with DS (31 asymptomatic, 24 prodromal AD, and 23 AD dementia individuals) from the Down Alzheimer Barcelona Neuroimaging Initiative (DABNI) cohort and 10 cognitively normal euploid controls from Sant Pau Initiative in Neurodegeneration (SPIN) cohort. An expert neuroradiologist blind to clinical diagnosis, age, and APOE status visually analyzed the 3T-MRI images following previously validated protocol to detect and manually segment CMI. First, we compared the presence, number and volume of CMI in the different clinical groups along the AD continuum, in APOEε4 carriers vs. non-carriers, and in males vs. females using Chi-square, Mann-Whitney, or Kruskal-Wallis tests when appropriate. Then, we assessed the association of the number and volume of CMI with age using Spearman's correlation test.

**Results:** CMI were detected in 64% of adults with DS and in 30% of euploid controls. We found no significant differences on the prevalence, number or volume of CMI between asymptomatic, prodromal and demented DS participants ( $p_{\text{qui-cuadrado}}=0.806$ ,  $p_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.547$  and  $p_{\text{Kruskal-Wallis}}=0.585$ ), between men and women ( $p_{\text{chi-cuadrado}}=0.762$ ,  $p_{\text{Mann-Whitney}}=0.431$  and  $p_{\text{Mann-Whitney}}=0.313$ ), and between APOE ε4 carriers and non-carriers ( $p_{\text{qui-cuadrado}}=0.815$ ,  $p_{\text{Mann-Whitney}}=0.968$  and  $p_{\text{Mann-Whitney}}=1.000$ ). We also did not observe correlation between CMI's number or volume with age ( $p_{\text{Spearman}}=0.740$ ,  $r^2=-0.04$  and  $p_{\text{Spearman}}=0.875$ ,  $r^2=-0.02$ , respectively).

**Conclusions:** CMI are detectable in adults with DS using 3T-MRI, are highly prevalent in this population and are more frequent in DS subjects than in euploid controls. However, we found no relationship between prevalence, number or volume of CMI and AD clinical stages, APOE ε4 status, sex or age.

## DESARROLLO DE FÁRMACOS MULTIDIANA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

### MULTITARGET DRUG DEVELOPMENT FOR THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Rafael León

Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC)

Las enfermedades neurodegenerativas (ENDs) serán el desafío en salud más importante de nuestra generación. Impulsadas por el aumento de la esperanza de vida, un número creciente de personas se ven afectadas por las ENDs. Aunque se han realizado intensos esfuerzos de investigación, la mayoría de los intentos de desarrollar un tratamiento eficaz han fracasado. Las ENDs comparten numerosas características patológicas, incluidas la agregación anormal de proteínas, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, el fallo del sistema de autofagia y la neuroinflamación crónica.

Teniendo en cuenta que el envejecimiento es el principal factor de riesgo de las ENDs y que este proceso va acompañado de un aumento progresivo en la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), parece plausible que la sobreproducción de ERO podría participar de forma temprana en el inicio de las ENDs. Las ERO aumentan la frecuencia de mutaciones del ADN mitocondrial provocando disfunción mitocondrial. El estrés oxidativo exacerbado provoca la oxidación de proteínas que lleva a un procesamiento incorrecto de estas, promoviendo la formación de agregados proteicos. Además, está bien establecido que tanto el estrés oxidativo como los agregados proteicos inducen la activación glial, lo que conduce a un estatus de neuroinflamación crónica. De hecho, diversos estudios demuestran una correlación directa entre la neuroinflamación y un peor pronóstico de muchas ENDs. Por otra parte, está demostrado que la capacidad de degradación autofágica disminuye durante el envejecimiento. Estas observaciones demostraron que existen distintos procesos de retroalimentación patológica que promueven el avance de la enfermedad culminando en un círculo fisiopatológico vicioso que acelera el avance de esta.

En respuesta al estrés oxidativo, las células han desarrollado un sistema de defensa endógeno, la vía antioxidante de fase II Nrf2-ARE. El factor de transcripción Nrf2 es un potente inductor de la respuesta celular para combatir el estrés oxidativo. Además, la vía Nrf2 regula la respuesta pro-inflamatoria, por lo que cualquier deficiencia en la señalización de Nrf2, como la que ocurre con el envejecimiento, puede empeorar el fenotipo inflamatorio. Además, Nrf2 induce la expresión de una proteína adaptadora de autofagia NDP52, lo que facilita la eliminación de agregados proteicos aberrantes, reduciendo el fallo del sistema autofágico descrito en varias ENDs.

Enfermedades de alta complejidad como las ENDs, a menudo explotan las mismas estrategias presentes en sistemas biológicos normales para favorecer su avance. Las ENDs intervienen a múltiples niveles creando una red patológica en lugar de deberse a un único evento para provocar la aparición de la enfermedad. La redundancia de los sistemas de señalización, la retroalimentación y otras estrategias de la red garantizan que las condiciones patológicas sean resistentes a las perturbaciones dentro de su arquitectura. Por lo tanto, las terapias dirigidas a una única diana fracasan, en diversos casos, porque las características de la red patológica no se tienen en cuenta durante la identificación de la diana. Por otro lado, se ha demostrado que las terapias multidiana son eficaces en diversas enfermedades complejas.

Los fármacos multidiana pueden describirse como combinaciones de terapias monodiana, en las que los distintos principios activos se integran en una única entidad química. Por tanto, en nuestra opinión fármacos multidiana basados en redes patológicas podrían ser eficaces en el tratamiento enfermedades complejas contrarrestando el avance de la red patológica. Los fármacos multidiana amplían el número de dianas farmacológicamente relevantes al introducir un conjunto de efectos indirectos dependientes de la red, aumentando así el tamaño del efecto farmacológico.

Por tanto, se describe el desarrollo de nuevos fármacos multidiana para diferentes ENDs que explotan la respuesta antioxidante y antiinflamatoria intrínseca, la respuesta de fase II Nrf2-ARE como diana principal a combinar con otras dianas terapéuticas críticas en la red patológica de las ENDs.

**Agradecimientos:** Agradecemos la financiación recibida del IS Carlos III (Ref: PI17/01700), Comunidad de Madrid y Fondos estructurales de la UE ref: S2017/BDM-3827.

Neurodegenerative diseases (NDDs) are destined to become the most significant health challenge of our generation. Driven by the increase in life expectancy, an ever-increasing number of people are affected by NDDs. Although intense research efforts have been made, most attempts to develop a treatment have failed. NDDs share many pathological hallmarks, including abnormal protein aggregation, mitochondrial dysfunction, extensive oxidative stress, autophagy failure and neuroinflammation.

Considering that ageing is the strongest risk factor for NDDs and that this process is accompanied by a progressive increase in the generation of Reactive Oxygen Species (ROS), it seems plausible that overproduction of ROS could be an early factor in the initiation of NDDs. ROS augment the frequency of mitochondrial DNA mutations that could lead to mitochondrial dysfunction. Extensive oxidative stress induces

protein damage leading to protein misprocessing and the formation of protein aggregates. It is well established that both, extensive oxidative stress and protein aggregates induce glial activation, leading to chronic neuroinflammation. In fact, compelling studies show a direct correlation between inflammation and a worse prognosis of many NDDs. Another important point is that autophagic degradation capacity declines during ageing. These observations demonstrated that there are several pathological feedback processes that exacerbate the pathology culminating in a vicious pathophysiological cycle.

In response to oxidative stress, cells have developed an endogenous defence system, the Nrf2-ARE phase II antioxidant pathway. The mammalian nuclear transcription factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a potent inducer of cellular defence responses to combat oxidative stress. Moreover, Nrf2 signalling protects against inflammatory disorders, thereby, any deficiency in Nrf2 signalling, such as the one occurring with aging, can worsen the inflammatory phenotype. Furthermore, Nrf2 induces the expression of an autophagy adaptor protein NDP52, facilitating aberrant protein aggregates clearance, alleviating the autophagic failure described in several NDDs.

Complex diseases often exploit the same strategies present in healthy networks to gain a robust status. NDDs present multiple disruptions within the host pathological-network structure rather than single event. Signalling redundancy, feedback, and another network strategies, ensure that complex pathological conditions will be resistant to disturbances within its architecture. Hence, single-target therapies fail in many cases because pathology-network characteristics are not accounted during target identification. On the other hand, multi-target therapies have been proven to be effective for many complex diseases.

Multitarget drugs can be perceived as siblings of combinatorial therapies, where the different agents are compressed into a single, integrated chemical entity. Multitarget drug designs based on Pathological-Networks can stop complex diseases by identifying targets that can relieve the early symptoms of the disease while counteracting its pathological network advance. Multi-target drugs expand the number of pharmacologically relevant targets by introducing a set of indirect, network-dependent effects, thus, increasing the size of the druggable proteome.

Thus, here we present the development of novel multitarget drugs towards different NDDs exploiting the intrinsic Nrf2-ARE phase II antioxidant and anti-inflammatory pathway as primary target to be combined with other critical nodes at the pathological network.

**Acknowledgments:** We thank IS Carlos III (Ref: PI17/01700) and Comunidad de Madrid y Fondos estructurales de la UE ref: S2017/BDM-3827.

## NUEVOS INDUCTORES DE NRF2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

### NOVEL NRF2 INDUCERS FOR THE TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE

Pablo Duarte<sup>1,2</sup>, Patrycja Michalska<sup>3</sup>, Enrique Crisman<sup>1,2,4</sup>, Juan Felipe Franco-González<sup>1</sup>, Ángel Cores<sup>4</sup>, José Carlos Menéndez<sup>4</sup>, Antonio Cuadrado<sup>5</sup>, and Rafael León<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC), 28006 Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Imperial College London, London, UK.

<sup>4</sup> Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IS), Hospital Universitario de la Princesa, 28006 Madrid, Spain.

<sup>4</sup> Unidad de Química Orgánica y Farmacéutica, Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

<sup>5</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Centro de Investigación Biomédica en Red Sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Investigación Sanitaria La Paz (IdiPaz), Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols' UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente. La falta de tratamientos efectivos capaces de detener la progresión de la enfermedad resalta la importancia de desarrollar nuevas terapias. La depleción de dopamina y la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas, junto con la presencia de depósitos  $\alpha$ -sinucleína, se consideran eventos principales en la EP. Además, el estrés oxidativo juega un papel importante en la progresión de la enfermedad, conduciendo a la desregulación de la homeostasis proteica, daño mitocondrial y neuroinflamación. Estos factores, a su vez, dan lugar a un aumento del estrés oxidativo generando un bucle que acelera el proceso de neurodegeneración.

El amplio espectro de funciones fisiológicas reguladas por el factor de transcripción *NF-E2-related factor 2* (NRF2) lo posiciona como una buena diana para el desarrollo de tratamientos para enfermedades multifactoriales complejas como la EP. En ese sentido, hemos desarrollado dos familias de nuevos inductores de NRF2 con actividades complementarias, teniendo en cuenta que NRF2 regula un gran número de genes citoprotectores relacionados con el estrés oxidativo, la inflamación y la homeostasis proteica. Además de esto, los nuevos compuestos están diseñados para inhibir selectivamente la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B), involucrada en el control del estrés oxidativo. Es importante destacar que los inhibidores de MAO-B se llevan utilizando años en la clínica para tratar los síntomas de la EP.

Con esta base, hemos desarrollado una primera familia de 9 nuevos compuestos multi-diana con varias actividades: inducción de NRF2, inhibición potente y selectiva de MAO-B y neuroprotección



en modelos relacionados con el estrés oxidativo. Además, llevamos a cabo un modelo de rodajas de estriado de rata adulta con rotenona y 6-hidroxidopamina como tóxicos. Los compuestos restauraron la muerte celular, estrés oxidativo y modularon proteínas relacionadas con el proceso neurodegenerativo. Fueron capaces también de revertir el proceso inflamatorio inducido por LPS en cultivos primarios de glía, disminuyendo la producción de óxido nítrico y citocinas pro-inflamatorias. Nuestro estudio también incluyó un programa *in silico* para caracterizar los mecanismos de inhibición de MAO-B.

A partir de esta información, el objetivo es tratar de mejorar la potencia de inhibición de MAO-B, reducir la toxicidad celular y mejorar las propiedades farmacológicas en cuanto a biodisponibilidad y permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los nuevos compuestos. Para ello, hemos construido una nueva quimioteca de unos 500 compuestos para llevar a cabo un proceso de cribado virtual. Tras la evaluación de los resultados, hemos seleccionado una nueva familia de 30 compuestos, que han sido sintetizados y sometidos a una evaluación farmacológica completa. Estos nuevos compuestos mostraron un mejor perfil con un aumento en la potencia de inducción de NRF2, selectividad de MAO-B y permeabilidad al sistema nervioso central por difusión pasiva. También demostraron un mejor perfil neuroprotector, una toxicidad celular reducida y mantuvieron propiedades antioxidantes y antiinflamatorias complementarias. Además de esto, hemos dilucidado los mecanismos para controlar la homeostasis proteica del compuesto líder de esta segunda familia, mostrando una activación de la vía del sistema ubiquitina-proteasoma y la macroautofagia.

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease. The lack of effective treatments able to stop the progression of the disease highlights the importance of finding new therapies. Physiopathological features such as dopamine depletion and selective destruction of dopaminergic neurons, together with the presence of  $\alpha$ -synuclein protein deposits, are considered main events in PD. Importantly, oxidative stress plays a major role in the disease progression leading to deregulation of protein processing, mitochondrial damage, and neuroinflammation. These factors, in turn, lead to the increase of oxidative stress generating a loop that accelerates the neurodegeneration process.

The broad spectrum of physiological roles regulated by transcription factor NF-E2-related factor 2 (NRF2) positions it as a good target for the development of innovative treatments for chronic diseases characterized by a complex network of pathological pathways. In that sense, we have developed two families of new NRF2 inducers with complementary activities for the treatment of PD, regarding that NRF2 regulates a plethora of cytoprotective genes related to oxidative stress, inflammation, and protein homeostasis, among other processes involved in the onset of PD. Apart from this, the novel compounds are also designed to selectively inhibit monoamine oxidase B (MAO-B). This enzyme is involved in

controlling oxidative stress, regarding dopamine metabolism, and MAO-B inhibitors have been used for years in clinic to treat PD symptoms.

Based on this, we have a first small chemical library of 9 new multitarget compounds combining several activities: NRF2 inducing capacity, MAO-B potent and selective inhibition, and neuroprotective ability in oxidative stress-related models. In addition, we performed a more complex model of adult rat striatal slices treated with rotenone and 6-hydroxydopamine as toxic. Selected compounds were protective in terms of cell death, oxidative stress, and modulation of several proteins related with neurodegeneration. Hit compounds were also capable of restoring LPS-induced inflammatory conditions in primary glial cultures leading to a decrease in the production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines. Our study also included an *in silico* program to characterize the mechanisms of MAO-B inhibition.

Regarding the information from this first family of compounds, the next objective is mainly trying to improve the potency for MAO-B inhibition, reduce cell toxicity, and also improve drug-like properties regarding half-life and blood-brain barrier permeability of the novel compounds. To this end, we have built a new chemical library of almost 500 compounds and subjected it to a virtual screening program. After evaluation of the results, we selected a new family of 30 compounds, we synthesized them, and we performed a complete pharmacological evaluation. These novel compounds showed a better profile with improved NRF2 induction potency, MAO-B selectivity, and central nervous system permeability by passive diffusion. They also demonstrated a better neuroprotective profile, reduced cell toxicity, and maintained complementary antioxidant and anti-inflammatory-related properties. In addition to this, we have also elucidated the mechanisms for controlling protein homeostasis of the lead compound from this family, showing an upregulation of the ubiquitin-proteasome system pathway and activation of macroautophagy.

#### DESARROLLO DE NUEVOS COMPUESTOS MULTITARIANOS DIRIGIDOS AL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

#### DEVELOPMENT OF NEW MULTITARGET COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

Enrique Crisman<sup>1,2,3</sup>, Sheila Abril<sup>1</sup>, Laura Vozmediano<sup>1</sup>, Esteban Daudén<sup>1</sup> and Rafael León<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC).

<sup>2</sup> Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IS), Hospital Universitario de la Princesa.



La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que constituye la principal causa de demencia y la sexta causa de muerte a nivel mundial. La ausencia de fármacos capaces de frenar la progresión de la enfermedad convierte la búsqueda de tratamientos eficaces en uno de los grandes retos científicos del siglo XXI. Aunque la etiología de la EA no es del todo comprendida, existe evidencia de que hay varios procesos degenerativos que contribuyen a la enfermedad, como el estrés oxidativo (EO), la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial, la dishomeostasis del calcio y la desregulación de la autofagia, entre otros. Estos procesos están estrechamente interconectados, lo que pone de manifiesto la naturaleza multifactorial de la enfermedad. Dada la complejidad de la EA, los ligandos dirigidos a múltiples dianas surgen como una estrategia prometedora para su tratamiento. En esta línea, hemos considerado dos dianas que tienen un papel clave en varios de los procesos relacionados con la etiopatología de la EA: activación del *NF-E2 p45-related factor 2* (NRF2) y modulación del receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ -nAChR). NRF2 es un factor de transcripción que constituye el principal mecanismo de defensa celular contra el EO. Además, NRF2 juega un papel clave en la regulación de la autofagia, inflamación y proteostasis. Por otro lado, la estimulación del  $\alpha 7$ -nAChR se ha relacionado con una disminución en la producción de péptido  $\beta$ -amiloide así como con una reducción en la hiperfosforilación de tau, neuroinflamación y pérdida de memoria a corto plazo en modelos *in vivo* de EA.

En este trabajo, hemos sintetizado y evaluado farmacológicamente una nueva familia de compuestos capaces de inducir NRF2 y modular selectivamente el  $\alpha 7$ -nAChR. Adicionalmente, han mostrado un efecto neuroprotector en un modelo *in vitro* de EO así como en un modelo *in vitro* de hiperfosforilación de tau. Sin embargo, los compuestos evaluados han sido identificados como sustrato de los sistemas de eflujo de la barrera hematoencefálica (BHE) en estudios de distribución cerebral *in vivo*. Utilizando estos resultados, hemos seleccionado un compuesto *hit* con el objetivo de aumentar su potencia como modulador del  $\alpha 7$ -nAChR y reducir su reconocimiento por los sistemas de eflujo. Mediante modelado por homología, *docking* y simulaciones de dinámica molecular, hemos predicho el modo de unión del compuesto *hit* al  $\alpha 7$ -nAChR e identificado dos regiones (aquí denominados A y B) que no participan en su unión al receptor y que por tanto son susceptibles de modificación. Adicionalmente, hemos localizado una cavidad no ocupada cerca de la región A en la cual varios fragmentos moleculares son capaces de alojarse, identificados mediante un cribado virtual. La sustitución de la región A por estos fragmentos ha conducido a una nueva familia de derivados con una mayor afinidad teórica por el  $\alpha 7$ -nAChR. Además, se han incluido varias modificaciones en la región B con el fin de mejorar la permeabilidad del compuesto a la BHE, guiadas por el algoritmo CNS-MPO. Así, mediante un diseño racional *in silico*, hemos obtenido dos nuevas familias de compuestos con mejores propiedades farmacológicas y farmacocinéticas teóricas.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that constitutes the main cause of dementia and the sixth leading cause of death worldwide. The absence of drugs able to stop disease progression makes the search for effective treatments one of the great scientific challenges of the 21st century. Although the etiology of AD is not fully understood, there is accumulating evidence that there are several degenerative events that contribute to the disease, such as oxidative stress (OS), neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, calcium dyshomeostasis and deregulation of autophagy, among others. These AD-contributing processes are tightly interconnected, which highlight the multifactorial nature of the disease. Given AD complexity, multitarget-directed ligands arise as a promising strategy for its treatment. In this line, we have considered two targets that have a key role in several of the aforementioned processes related to AD etiopathology: activation of NF-E2 p45-related factor 2 (NRF2) and modulation of nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ -nAChR). NRF2 is a transcription factor that constitutes the main cellular defensive mechanism against OS. Additionally, NRF2 plays a critical role in the regulation of autophagic processes, inflammatory stress and proteostasis. In a similar fashion, stimulation of  $\alpha 7$ -nAChR has been related to a decrease in  $\beta$ -amyloid peptide production, reduction of tau hyperphosphorylation, neuroinflammation and short-term memory loss term in *in vivo* models of AD.

In this work, we have synthesized and pharmacologically evaluated a new family of compounds able to activate NRF2 and selectively modulate the  $\alpha 7$ -nAChR. Furthermore, these compounds have exerted a neuroprotective effect in OS and tau hyperphosphorylation *in vitro* models. However, the evaluated compounds were identified as substrate of the efflux systems of the blood-brain barrier (BBB) in *in vivo* brain distribution studies. Using these results as a starting point, we have selected a *hit* compound for modification, aiming to increase its potency as  $\alpha 7$ -nAChR modulator and reduce its recognition by the BBB efflux systems. In this line, by means of homology modeling, docking and molecular dynamics simulations, we have predicted the binding mode of the *hit* compound to the  $\alpha 7$ -nAChR and identified two chemical moieties (herein named A and B) that do not drive receptor binding and are thus susceptible of modification. Based on this binding mode, we have identified a non-occupied cavity close to moiety A. Using a fragment-based virtual screening we have identified several molecular fragments able to interact with the residues of this cavity. Substitution of moiety A by these fragments has led to a new family of derivatives with a higher predicted affinity for the  $\alpha 7$ -nAChR. Additionally, we have included several modifications on moiety B in order to improve compounds BBB permeability, guided by the CNS-MPO algorithm. In this fashion, we have obtained two new family of compounds with improved predicted pharmacological and pharmacokinetic properties by means of an *in silico*-guided strategy for their design.

## DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA SUPERAR LA RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS ANTITUMORALES

### DEVELOPMENT OF NOVEL STRATEGIES TO OVERCOME RESISTANCE TO ANTICANCER DRUGS

Miriam Nuncia-Cantarero<sup>1</sup>, David Tébar-García<sup>1,2</sup>, Raquel López-Rosa<sup>1,2</sup>, María del Mar Noblejas-López<sup>1,2</sup>, Cristina Nieto-Jiménez<sup>5</sup>, Leticia Serrano-Oviedo<sup>2</sup>, Esther Sánchez-López<sup>3</sup>, Ana Sanchez-Mozo<sup>3</sup>, Rosa Barbella Aponte<sup>4</sup>, Virginia Adamoli<sup>4</sup>, Monica Gómez-Juarez<sup>2</sup>, Alberto Ocaña<sup>2,5</sup> y Eva M. Galán-Moya<sup>1,2,6\*</sup>

<sup>1</sup> Regional Centre for Biomedical Research, University of Castilla-La Mancha, Albacete, Spain.

<sup>2</sup> Translational Research Unit, Albacete University Hospital, Albacete, Spain.

<sup>3</sup> Surgery Department, Albacete University Hospital, Albacete, Spain.

<sup>4</sup> Anatomic Pathology Service, Albacete University Hospital, Albacete, Spain.

<sup>5</sup> Experimental Therapeutics Unit, Medical Oncology Department, Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Instituto de Investigación Sanitaria (IdISSC) and CIBERONC, Madrid, Spain. <sup>6</sup> Nursery faculty, Castilla-La Mancha University (UCLM), Albacete, Spain.

Desde hace décadas, la quimioterapia ha sido el tratamiento farmacológico estándar para la mayoría de los pacientes oncológicos. Sin embargo, aunque la respuesta inicial al tratamiento es buena, los pacientes suelen acabar desarrollando resistencias que dificultan el manejo de la enfermedad, lo que urge a diseñar nuevas estrategias terapéuticas capaces de superar este problema. Las mejoras de las técnicas de secuenciación y análisis genético están cambiando la forma de abordar esta enfermedad. Estas nuevas tecnologías están permitiendo la identificación de nuevas dianas terapéuticas en numerosos tipos de cáncer.

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) se caracteriza por la ausencia de receptores hormonales (estrógeno y progesterona) y del receptor HER2, lo que impide el uso de fármacos dirigidos a estas proteínas, que sí son efectivos en los otros subtipos de cáncer de mama. Hasta la fecha, las únicas drogas dirigidas aprobadas para el tratamiento del CMTN son los inhibidores de PARP, el olaparib y el talazoparib, pero solo para aquellas pacientes que presenten mutaciones en el gen *BRCA*, lo que ocurre solo en alrededor del 20% del total de pacientes diagnosticadas con esta enfermedad. Por ello, la quimioterapia es la única opción para la mayoría de las pacientes de CMTN.

En primera línea, los fármacos más utilizados son las antraciclínicas y los taxanos, y para aquellas pacientes que no responden, los quimioterápicos más usados son los platinos (cisplatino y carboplatino). En los últimos años, nuestro grupo ha desarrollado diferentes modelos *in vitro* de resistencia a quimioterapia, tanto intrínseca como adquirida, que nos han permitido, por un lado, identificar nuevos objetivos drogables en CMTN y, por otro lado, evaluar la acción anti-tumoral de compuestos dirigidos contra estos objetivos.

Usando tejido adiposo peritumoral fresco de pacientes de CMTN (CEIm 08/2017, GAI Albacete) y células tumorales de este subtipo (MDA-MB-231, BT549, HS578T y HCC3153), hemos diseñado modelos de resistencia intrínseca que mimetizan el microambiente tumoral *in vitro*. También se generaron modelos en 3D (tumoresferas) para recapitular mejor las características de la población de células madre tumorales quimio-resistentes presente en los tumores. Para el desarrollo de modelos de resistencia adquirida, las líneas tumorales fueron expuestas a concentraciones crecientes del quimioterápico (IC30-IC70) usando una estrategia de pulsos periódicos. Los modelos fueron caracterizados mediante qPCR usando un panel de marcadores. El impacto de los fármacos sobre las células tumorales fue evaluado *in vitro* mediante la técnica del MTT (proliferación), ensayos de clonogénicos (iniciación tumoral) y matrigel (invasión), y por citometría de flujo (muerte celular), demostrando la utilidad de estos modelos para evaluar respuesta a quimioterapia. Para evaluar el efecto *in vivo*, se usaron modelos ortotópicos en ratones inmunodeprimidos (BALB-nu).

Nuestros resultados sugieren varias opciones terapéuticas interesantes. Por un lado, hemos identificado un panel de marcadores que podría resultar de utilidad para estratificar a pacientes de CMTN, actuando como biomarcador de respuesta y de pronóstico de las pacientes. Por otro lado, hemos identificado nuevas dianas terapéuticas cuya inhibición farmacológica revierte o evita la resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino, lo que puede tener relevancia terapéutica para aquellos pacientes que están siendo tratados con derivados del platino.

For decades, chemotherapy has been the standard drug treatment for most cancer patients. However, although the initial response is good, patients often end up developing resistance that hinders the management of the disease, which urges the design of new therapeutic strategies capable of overcoming this problem. Improvements in sequencing and genetic analysis techniques are changing the approach to this disease. These new technologies are allowing the identification of novel therapeutic targets in numerous types of cancer.

Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the absence of hormone receptors (estrogen and progesterone) and the HER2 receptor, which precludes the use of drugs targeting these proteins, which are effective in the other breast cancer subtypes. To date, the only targeted drugs approved for the treatment of TNBC are PARP inhibitors, olaparib and talazoparib, but only for those patients with mutations in the *BRCA* gene, which occurs in only about 20% of all patients diagnosed with this disease. Chemotherapy is therefore the only option for most TNBC patients.

In the first line, the most commonly used drugs are anthracyclines and taxanes, and for those patients who do not respond, the most commonly used chemotherapeutics are platinum (cisplatin

and carboplatin). In recent years, our group has developed different *in vitro* models of resistance to chemotherapy, both intrinsic and acquired, which have allowed us, on the one hand, to identify new druggable targets in TNBC and, on the other hand, to evaluate the anti-tumor action of compounds directed against these targets.

Using fresh peritumoral adipose tissue from TNBC patients (CEIm 08/2017, GAI Albacete) and tumor cells of this subtype (MDA-MB-231, BT549, HS578T and HCC3153), we have designed intrinsic resistance models that mimic the tumor microenvironment *in vitro*. 3D models (tumorspheres) were also generated to better recapitulate the characteristics of the chemo-resistant tumor stem cell population present in tumors. For the development of acquired resistance models, tumor lines were exposed to increasing concentrations of the chemotherapeutic (IC30-IC70) using a periodic pulsing strategy. The models were characterized by qPCR using a panel of markers. The impact of the drugs on tumor cells was evaluated *in vitro* by MTT (proliferation), clonogenic (tumor initiation) and matrigel (invasion) assays, and by flow cytometry (cell death), demonstrating the usefulness of these models to evaluate response to chemotherapy. To evaluate the *in vivo* effect, orthotopic models were used in immunosuppressed mice (BALB-nu).

Our results suggest several interesting therapeutic options. On the one hand, we have identified a panel of markers that could be useful for stratifying TNBC patients, acting as a biomarker of patient response and prognosis. On the other hand, we have identified new therapeutic targets whose pharmacological inhibition reverses or prevents resistance to cisplatin-based chemotherapy, which may have therapeutic relevance for those patients being treated with platinum derivatives.

### USO DE INHIBIDORES DE PROTEÍNAS BET PARA CONTROLAR LA RESISTENCIA ADQUIRIDA EN TUMORES MAMARIOS

#### USE OF BET PROTEIN INHIBITORS TO CONTROL ACQUIRED RESISTANCE IN MAMMARY TUMORS

David Tebar-García<sup>1</sup>, Raquel López-Rosa<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> del Mar Noblejas-Lopez<sup>1,2</sup>, Miriam Nuncia-Cantarero<sup>1</sup>, Cristina Nieto-Jimenez<sup>3</sup>, Miguel Burgos<sup>1,2</sup>, Alberto Ocaña<sup>3</sup>, Eva M. Galan-Moya<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup> Translational Oncology Laboratory, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla La Mancha, Albacete, Spain.

<sup>2</sup> Translational Research Unit, University Hospital, Albacete, Spain.

<sup>3</sup> Experimental Therapeutics Unit, Medical Oncology Department, Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Instituto de Investigación Sanitaria (IdISSC) and CIBERONC, Madrid, Spain.

<sup>4</sup> Nursery faculty, Castilla-La Mancha University (UCLM), Albacete, Spain.

**Introducción:** El cáncer de mama triple negativo (TNBC) es el subtipo de cáncer de mama que más heterogeneidad presenta debido en gran parte a una presencia elevada de células madre tumorales (CSC, del inglés *Cancer Stem Cells*). Además, este subtipo tumoral no presenta dianas terapéuticas específicas, lo que restringe su tratamiento a radioterapia y quimioterapia tradicional. Estos tratamientos afectan en gran medida a células tumorales normales, pero las CSC suelen presentar resistencia intrínseca a estos tratamientos. Por ese motivo, esta población celular se ve aumentada conforme los tumores adquieren resistencia al tratamiento.

Las proteínas BET son efectores epigenéticos conocidos por controlar la expresión de los marcadores de CSC y, por lo tanto, los inhibidores de BET (BETi), como JQ1, podrían ser una alternativa de tratamiento que controlase la población de CSC dentro del tumor y ayudase a revertir la quimiorresistencia. Como ocurre en las líneas parentales según datos publicados anteriormente en el laboratorio, donde JQ1 consigue reducir estos marcadores y por lo tanto, esta población se ve reducida.

**Materiales y métodos:** Para este trabajo, se generaron modelos celulares de resistencia a quimioterapia tradicional en células de TNBC. A través de estudios de qPCR se analizó la expresión de un panel de marcadores de CSC en las células generadas comparándolas con las líneas sensibles y se evaluó el impacto de JQ1 sobre dichos marcadores. También se realizaron ensayos de proliferación MTT, de progresión tumoral y de iniciación tumoral, a través de la formación de colonias, en células resistentes en respuesta a este BETi. La respuesta a este inhibidor sobre la apoptosis de la población de células resistentes fue evaluada mediante el análisis de unión de Anexina V por citometría de flujo.

**Resultados:** Las células TNBC con resistencia adquirida a la quimioterapia se observó un aumento de la expresión en marcadores de CSC. Al tratar las células con JQ1 se consiguió reducir la expresión de estos marcadores, a pesar encontrarse aumentados en el modelo resistente. Además, estos fármacos ralentizaron la proliferación celular y obstaculizaron la progresión tumoral de las células resistentes a la quimioterapia, evitando también la formación de colonias, lo que se traduce en una reducción de la recaída de estos tumores tras el tratamiento. La evaluación de la apoptosis confirmó que los BETi provocaron muerte celular en estos modelos. Todos estos resultados han sido estudiados en comparación con la línea sensible, donde no se puede observar una reducción de estas propiedades estudiadas.

**Conclusiones:** Los inhibidores de BET disminuyen los marcadores de CSCs en el TNBC, lo cual lo consigue mejor en el modelo resistente, a pesar de su sobreexpresión, consigue reducir además las propiedades de las CSC (proliferación, progresión e iniciación tumoral). Por ello, podría



constituir una buena estrategia para revertir la resistencia en tumores TNBC resistentes, como tratamiento único o en combinación con otros quimioterápicos.

**Background:** Triple negative breast cancer (TNBC) is the most heterogeneous breast cancer subtype due largely to a high presence of tumor stem cells (CSCs). Moreover, this tumor subtype has no specific therapeutic targets, which restricts its treatment to traditional radiotherapy and chemotherapy. These treatments largely affect normal tumor cells, but CSCs often show intrinsic resistance to these treatments. For this reason, this cell population is increased as tumors become resistant to treatment.

BET proteins are epigenetic effectors known to control the expression of CSC markers, and therefore BET inhibitors (BETi), such as JQ1, could be a treatment alternative that controls the CSC population within the tumor and helps reverse chemoresistance. As occurs in parental lines according to previously published data in the laboratory, where JQ1 manages to reduce these markers and therefore, this population is reduced.

**Materials and methods:** For this work, cellular models of resistance to traditional chemotherapy were generated in TNBC cells. Through qPCR studies, the expression of a panel of CSC markers in the generated cells was analyzed by comparing them with the sensitive lines and the impact of JQ1 on these markers was evaluated. MTT proliferation, tumor progression and tumor initiation assays, through colony formation, were also performed on resistant cells in response to this BETi. The response to this inhibitor on apoptosis of the resistant cell population was assessed by flow cytometry analysis of Annexin V binding.

**Results:** TNBC cells with acquired resistance to chemotherapy showed increased expression of CSC markers. Treating the cells with JQ1 reduced the expression of these markers, although they were increased in the resistant model. In addition, these drugs slowed cell proliferation and hindered tumor progression of chemotherapy-resistant cells, also preventing colony formation, which translates into a reduction in the relapse of these tumors after treatment. Apoptosis assessment confirmed that BETi caused cell death in these models. All these results have been studied in comparison with the sensitive line, where no reduction of these studied properties can be observed.

**Conclusions:** BET inhibitors decrease CSCs markers in TNBC, which is better achieved in the resistant model, despite their overexpression, and reduce CSCs properties (proliferation, progression, and tumor initiation). Therefore, it could be a good strategy to reverse resistance in resistant TNBC tumors, as a single treatment or in combination with another chemotherapeutics.

## EL USO DE INHIBIDORES EPIGENÉTICOS POTENCIA EL EFECTO DE LA TEMOZOLAMIDA EN MODELOS 2D Y 3D DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

### THE USE OF EPIGENETIC INHIBITORS ENHANCES THE EFFECT OF TEMOZOLOMIDE IN 2D AND 3D MODELS OF GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Raquel López-Rosa<sup>1,2</sup>, David Tébar-García<sup>1,2</sup>, María del Mar Noblejas-López<sup>1,2</sup>, Miriam Nuncia-Cantarero<sup>2</sup>, Cristina Nieto-Jiménez<sup>4</sup>, Éva M. Galán-Moya<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Translational Research Unit, Albacete University Hospital, Albacete, Spain.

<sup>2</sup> Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain.

<sup>3</sup> Nursery faculty, Castilla-La Mancha University (UCLM), Albacete, Spain.

<sup>4</sup> Experimental Therapeutics Unit, Medical Oncology Department, Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Instituto de Investigación Sanitaria (IdISSC) and CIBERONC, Madrid, Spain.

**Introducción:** El glioblastoma multiforme (GBM) es un tumor cerebral muy agresivo y para el que no existe un tratamiento eficaz. Actualmente, es el tumor cerebral más frecuente y la mediana de supervivencia es de 15 meses desde su diagnóstico. La resección quirúrgica completa es complicada, ya que son muy invasivos y suelen infiltrarse. El tratamiento habitual es la quimioterapia alquilante con temozolamida (TMZ). El 15% de los pacientes desarrollan resistencia adquirida al tratamiento estándar.

Se ha identificado una nueva población celular, las células iniciadoras del glioma (GICs), que son similares a las *Cancer Stem Cells* (CSCs). Las GICs muestran resistencia a las terapias estándar y son las principales responsables de la recurrencia. Por otro lado, las proteínas BET están implicadas en la transcripción, el ciclo celular o la inflamación y se relacionan con proteínas oncogénicas implicadas en el desarrollo de cáncer. Se ha demostrado que algunos inhibidores de proteínas BET son capaces de potenciar la actividad de la TMZ en GBM. Además, en trabajos previos del laboratorio se ha usado el inhibidor epigenético JQ1 en modelos 3D ricos en CSCs, ya que es capaz de inhibir algunos factores de transcripción implicados en ciclo celular, proliferación y metástasis. A su vez, ha demostrado un mayor efecto en los modelos más resistentes, coincidiendo con un elevado número de CSCs.

El objetivo de este trabajo será la evaluación de terapias alternativas que consigan evitar o combatir la resistencia adquirida a las terapias actuales producidas por las GICs.

**Métodos:** Se usaron las líneas celulares adherentes A172, T98, U87 y U118, así como los modelos 3D derivados de pacientes, GH2 y 12O12, los cuales, son ricos en GICs. Se llevaron a cabo ensayos de MTT, citometría de flujo y cristal violeta para evaluar la viabilidad celular en los modelos 2D tras la combinación de los inhibidores epigenéticos con



la TMZ. También ensayos de formación de esferas y dilución límite en los modelos 3D para evaluar el efecto de la combinación en las GICs.

**Resultados:** El uso de inhibidores epigenéticos mostró un efecto anti proliferativo similar en los diferentes modelos 2D empleados. Por otro lado, la combinación de inhibidores epigenéticos con el tratamiento estándar tuvo un potente efecto sinérgico, observándose un gran aumento de la muerte celular. A pesar de esto, el efecto fue más notable en aquellas líneas que mostraban una mayor resistencia intrínseca al tratamiento tradicional. Posteriormente, se pasó a la validación de los resultados en los modelos 3D, ya que presentan mayor resistencia a los tratamientos actuales y son más similares al paciente. En este caso, se observó un efecto sinérgico capaz de afectar a las GICs.

**Conclusiones:** El uso de una terapia combinada con inhibidores epigenéticos y el tratamiento estándar podría ser una buena alternativa terapéutica en glioblastoma multiforme.

**Background:** Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly aggressive brain tumor for which there is no effective treatment. It is currently the most common brain tumor, and the median survival time is 15 months from diagnosis. Complete surgical resection is complicated, as they are very invasive and tend to infiltrate. The usual treatment is alkylating chemotherapy with temozolomide (TMZ). 15% of patients develop acquired resistance to standard treatment.

A new cell population, glioma-initiating cells (GICs), which are like Cancer Stem Cells (CSCs), has been identified. GICs show resistance to standard therapies and are mainly responsible for recurrence. On the other hand, BET proteins are involved in transcription, cell cycle or inflammation, and are related to oncogenic proteins involved in cancer development. It has been shown that some BET protein inhibitors are able to enhance TMZ activity in GBM.

In addition, a previous work in the laboratory has used the epigenetic inhibitor JQ1 in 3D models, that are rich in CSCs, and it is able to inhibit some transcription factors involved in cell cycle, proliferation, and metastasis. It has shown a greater effect in resistant models, coinciding with a high number of CSCs.

The aim of this work will be to evaluate alternative therapies that can avoid or combat acquired resistance to current therapies produced by GICs.

**Methods:** The adherent cell lines A172, T98, U87, and U118, as well as the patient-derived 3D models GH2 and 12O12, which are rich in GICs, were used. MTT, flow cytometry and crystal violet assays were performed to evaluate cell viability in the 2D models after combination of epigenetic inhibitors with TMZ. Sphere formation and limit dilution assays were also performed in 3D models to assess the effect of the combination on GICs.

**Results:** The use of epigenetic inhibitors showed a similar anti-proliferative effect in the different 2D models used. On the other hand, the combination of epigenetic inhibitors with standard treatment had a synergistic effect, with an increase in cell death. Despite of, the effect was most notable in those lines that showed intrinsic resistance to the traditional treatment. Afterward, the results were validated in 3D models, which show greater resistance to current treatments, and they are like the patient. In this case, a synergistic effect was observed.

**Conclusions:** The use of a combined therapy with epigenetic inhibitors and standard treatment could be a good therapeutic alternative in glioblastoma multiforme.

## RETOS EN CIRUGÍA DEL NERVIIO PERIFÉRICO. VISION DEL CIRUJANO

### CHALLENGES IN PERIPHERAL NERVE SURGERY. THE SURGEON'S VIEW

Lara Cristóbal<sup>1,2</sup>, Elena Armas<sup>1</sup>, Elisa Sanz<sup>2,3</sup>, Juan José Jover<sup>4</sup>, Jose Luis Fernandez-Cañamaque<sup>1</sup>, Andrés A. Maldonado<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Nervio Periférico y Plexo Braquial, Servicio de Cirugía Plástica, Hospital Universitario de Getafe.

<sup>2</sup> Universidad Europea de Madrid.

<sup>3</sup> Unidad de Nervio Periférico y Plexo Braquial, Servicio de Neurofisiología, Hospital Universitario de Getafe.

<sup>4</sup> Unidad de Nervio Periférico y Plexo Braquial, Servicio de Radiología, Hospital Universitario de Getafe.

<sup>5</sup> Servicio de Cirugía Plástica, Reconstructiva y Mano, BG Trauma Center Frankfurt am Main.

Las lesiones de nervios periféricos son frecuentes y conllevan pérdida de funciones tales como sensibilidad o movilidad de las extremidades, además de dolor. Todo ello puede generar incapacidades permanentes, impactando de manera negativa en la calidad de vida de las personas. La cirugía de nervio periférico ha evolucionado significativamente en las últimas décadas y en la actualidad disponemos de un amplio espectro de técnicas reconstructivas para tratar este tipo de lesiones: injertos nerviosos, transferencias nerviosas, transferencias tendinosas, colgajos libres motorizados, además de la combinación con ortesis y prótesis mioeléctricas. Sin embargo, todavía existen una serie de factores que limitan las opciones reconstructivas: la degeneración muscular tras la lesión nerviosa, la velocidad de regeneración axonal o las secuelas y limitación de usar nervios donantes son tres retos a investigar en el futuro de este campo. Para poder afrontar estos retos a nivel biológico y combinarlos con las estrategias quirúrgicas actuales, creemos fundamental la colaboración entre la investigación básica y clínica.

Peripheral nerve injuries are common and lead to loss of functions such as sensation or mobility of the extremities, as well as pain. These injuries may cause permanent disabilities, negatively impacting quality of life. Peripheral nerve surgery has evolved significantly in recent decades. Nowadays a wide spectrum of reconstructive techniques is available: nerve grafts, nerve transfers, tendon transfers, functional free muscle transfer, in addition to the combination with myoelectric orthosis and prostheses. However, there are still several factors that limit reconstructive options: muscle degeneration after a nerve injury, axonal regeneration speed or sequelae and limitation of using donor's nerves are three challenges to be investigated in the future of this field. To face these challenges at the biological level and combine them with current surgical strategies, we believe that collaboration between basic and clinical research is essential.

### MODULACIÓN TERAPÉUTICA DE LA PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE KLOTHO PARA RETRASAR EL ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD RENAL

#### THERAPEUTIC MODULATION OF ENDOGENOUS KIDNEY KLOTHO EXPRESSION TO DELAY BIOLOGICAL AGING IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

*Maria Dolores Sánchez Niño<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

<sup>2</sup> IIS-Fundación Jiménez Díaz, Laboratorio de Nefrología e Hipertensión

**Resumen:** La enfermedad renal crónica es la causa de muerte que más rápidamente está aumentando a nivel mundial y se convertirá en la quinta causa de muerte en 2040. Además, la enfermedad renal crónica es el factor de riesgo más prevalente y que más aumenta el riesgo de Covid-19 letal. El fenotipo de la enfermedad renal crónica se ha asimilado al de un envejecimiento biológico acelerado. La mejor comprensión de los mecanismos que median el envejecimiento acelerado puede ayudar a diseñar nuevos tratamientos que aumenten la supervivencia de los enfermos renales.

Klotho es una proteína originada en los túbulos renales que tiene propiedades antienvjecimiento, antiinflamatorias y antifibróticas. En la evolución de la enfermedad renal crónica, la producción de Klotho es la primera función renal que se pierde, antes de que disminuya el filtrado glomerular. Puesto que cuando se pierde la producción de Klotho, la estructura tubular es esencialmente normal, hay que postular que hay mediadores que disminuyen la producción de Klotho en células tubulares que todavía tendrían la capacidad de

expresar Klotho. En los últimos años nuestro laboratorio ha investigado los mediadores que regulan la producción de Klotho durante el daño renal. Tanto la albuminuria, que suele ser el marcador más temprano de enfermedad renal crónica, como la inflamación local disminuyen la producción de Klotho por células tubulares renales. En concreto, citoquinas como TNF o TWEAK disminuyen la producción tubular de Klotho de una forma dependiente de NFκB y de mecanismos epigenéticos como la acetilación de histonas. Además, diversas proteínas reguladoras de NFκB modulan el impacto de este factor de transcripción sobre la producción renal de Klotho. Así por ejemplo Bcl3 aumenta la producción tubular de Klotho. Con vistas a una traslación clínica, hemos comprobado que el inhibidor inespecífico de la fosfodiesterasa, Pentoxifilina, conserva la producción de Klotho en células tubulares expuestas a albuminuria. Estos datos pueden ayudar a diseñar tratamientos para la enfermedad renal y para el envejecimiento biológico basados en el aumento de producción de Klotho endógeno.

### PAPEL NEFROPROTECTOR DE CD74 EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

#### PROTECTIVE ROLE OF CD74 IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC KIDNEY DISEASE

*Maria Ignacia Ceballos Darnaude<sup>1</sup>, Leticia Cuarental<sup>1</sup>, Lara Valiño-Rivas<sup>1</sup>, Aránzazu Pintor-Chocano<sup>1</sup>, Alberto Ortiz<sup>1</sup>, Maria Dolores Sánchez-Niño<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Department of Nephrology and Hypertension. IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

**Introduction:** Chronic kidney disease is one of the fastest growing causes of death worldwide, pointing to the need to develop novel therapeutic approaches. CD74 (invariant MHC class II) is a non-polymorphic type II transmembrane glycoprotein that regulates protein trafficking and is a receptor of macrophage migration factor and D-dopachrome tautomerase. CD74 has been implicated in inflammatory conditions. However, the role of CD74 in kidney has not yet been characterized. We explored the expression and function for CD74 in chronic kidney disease.

**Methods:** The function of CD74 was explored in unilateral ureteral obstruction and adenine-induced chronic kidney disease in wild-type and CD74-deficient mice. Western blotting, immunohistochemistry and qRT-PCR were used to study the distribution and expression of fibrosis markers in kidney tissue.

**Results:** CD74 expression was low in healthy murine and human kidney tubular epithelium and

its expression increased in human and murine kidney fibrosis. Genetic CD74 deficiency resulted in upregulation in RNA and protein levels of fibrosis markers  $\alpha$ -SMA, collagen, fibronectin, and downregulation of the nephroprotective gene Klotho, and in more a severe chronic kidney disease than in wild type mice.

**Conclusion:** Our study provides evidence that CD74 has a nephroprotective role in kidney fibrosis in chronic kidney disease.

### GDF15 PRESERVES KLOTHO EXPRESSION IN ACUTE KIDNEY INJURY AND KIDNEY FIBROSIS

#### GDF15 MANTIENE LA EXPRESIÓN DE KLOTHO EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA Y LA FIBROSIS RENAL

Lara Valiño-Rivas<sup>1</sup>, Leticia Cuarental<sup>1</sup>, Maria Vanessa Perez-Gomez<sup>1</sup>, Alberto Ortiz<sup>1</sup>, Maria Dolores Sanchez-Niño<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Department of Nephrology and Hypertension. IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

Growth differentiation factor-15 (GDF15) is a member of the GDF subfamily with potential nephroprotective functions. We have now explored the role of GDF15 in the regulation of the expression of the nephroprotective factor Klotho in acute kidney injury (AKI) and kidney fibrosis in mice. GDF15 was the most upregulated GDF family gene in experimental nephrotoxic AKI and in kidney fibrosis transcriptomics. The function of GDF15 was explored in nephrotoxic AKI in genetically modified mice and following the exogenous administration of recombinant GDF15. *Gdf15*-deficient mice developed more severe AKI induced by either folic acid or cisplatin while GDF15 overexpressing mice were protected and recombinant human GDF15 administration protected from folate-induced AKI. Kidney expression of Klotho was more severely depressed in *Gdf15* deficient mice and was preserved by GDF15 overexpression or rhGDF15 treatment. Kidney fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction was also more severe in *Gdf15*-deficient mice while constitutive *GDF15* overexpression decreased kidney injury and preserved Klotho expression. In tubular cells cultured in an inflammatory milieu, GDF15 preserved Klotho expression.

In conclusion, a spontaneous increased kidney expression of endogenous GDF15 is not enough to prevent kidney injury, but further increments in GDF15 are nephroprotective and preserve the kidney expression of the nephroprotective factor Klotho in acute and chronic settings.

# NORMAS DE PUBLICACIÓN

## ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA DE ESPAÑA

### INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES DE ANALES RANM

ANALES RANM (nombre abreviado según norma ISO-4 para revistas científicas: *An. R. Acad. Nac. Med., Madrid* e igualmente *An. RANM*) es una revista científico-médica de ámbito nacional e internacional que publica contenidos en relación con la salud, enfermedades y patologías que afectan al ser humano y artículos de interés en ciencias biomédicas básicas.

Es la revista científica oficial de la **Real Academia Nacional de Medicina de España**, edita 3 números al año, y acepta manuscritos en español e inglés. La Publicación tiene dos versiones: una impresa registrada con ISSN 0034-0634 y otra digital on-line registrada con ISSN 2605-2512 ([www.analesranm.es](http://www.analesranm.es)).

La revista ANALES de la Real Academia Nacional de Medicina de España se adhiere a las recomendaciones de uniformidad para manuscritos enviados a revistas biomédicas elaboradas por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, cuyo texto oficial se encuentra disponible en: <http://www.icmje.org/recommendations/>

### RESPONSABILIDADES Y ASPECTOS ÉTICOS EN LA PUBLICACIÓN

ANALES RANM considera que la negligencia en investigación o en publicación es una infracción ética seria y tratará este tipo de situaciones de la manera necesaria para que sean consideradas como negligencia. Es recomendable que los autores revisen el Committee on Publication Ethics (COPE) y el International Committee of Medical Journal Editors para mayor información a este respecto. La revista ANALES RANM **no acepta material previamente publicado**. El plagio y el envío de documentos a dos revistas por duplicado se consideran actos serios de negligencia. El plagio puede tomar muchas formas, desde tratar de publicar trabajos ajenos como si fueran propios, copiar o parafrasear partes sustanciales de otro trabajo (sin atribución), hasta reclamar resultados de una investigación realizada por otros autores. El plagio, en todas sus formas posibles, constituye un comportamiento editorial no ético y, por tanto, se considera inaceptable. El envío/publicación duplicada ocurre cuando dos o más trabajos comparten la misma hipótesis, datos, puntos de discusión y conclusiones, sin que estos trabajos hayan sido citados mutuamente uno a otro. Las citas seguirán estrictamente las normas de Vancouver\*\* (al final del presente documento se muestran ejemplos e indicaciones al respecto).

### INVESTIGACIÓN HUMANA Y ANIMAL

Toda información identificativa no deberá ser publicada en declaraciones escritas, fotografías o genealogías.

Asimismo, no se podrán revelar nombres de pacientes, iniciales o números de historia clínica en materiales ilustrativos. Las fotografías de seres humanos deberán ir acompañadas de un consentimiento informado de la persona y que dicha persona revise el manuscrito previo a su publicación, en el caso de que dicho paciente pueda ser identificado por las imágenes o los datos clínicos añadidos en dicho manuscrito. Los rasgos faciales no deben ser reconocibles.

El Comité Editorial puede requerir a los autores añadir una copia (PDF o papel) de la aprobación de un Comité de Ética en el caso de trabajos con experimentación animal o ensayos clínicos (pacientes, material de pacientes o datos médicos), incluyendo una traducción oficial

y verificada de dicho documento. Se debe especificar en la sección ética que todos los procedimientos del estudio recibieron aprobación ética de los comités de ética relevantes correspondientes a nivel nacional, regional o institucional con responsabilidad en la investigación animal/humana. Se debe añadir igualmente la fecha de aprobación y número de registro. En caso de que no se hubiera recibido la aprobación ética, los autores deberán explicar el motivo, incluyendo una explicación sobre la adherencia del estudio a los criterios propuestos en la Declaración de Helsinki (<https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos>).

### AUTORÍA

Todos los datos incluidos en la presentación de un manuscrito deben ser reales y auténticos. Todos los autores incluidos deben haber contribuido de forma significativa a la elaboración del documento, así como tiene la obligación de facilitar retracciones o correcciones, si fuera necesario, cuando se encuentren errores en el texto. En los artículos se recomienda un máximo de 6 autores, aunque se aceptan sugerencias concretas para más de 6 autores. Cada autor deberá especificar cómo desea que se cite su nombre (i.e., solo el primer apellido, los dos apellidos o unir ambos apellidos con guion). En caso de ser necesario, se requerirá que cada autor especifique el tipo y grado de implicación en el documento.

### REVISIÓN POR PARES

ANALES RANM publica documentos que han sido aceptados después de un proceso de supervisión por pares. Los documentos enviados serán revisados por "revisores ciegos" que no tendrán ningún tipo de conflicto de interés con respecto a la investigación, a los autores y/o a las entidades financiadoras. Los documentos serán tratados por estos revisores de forma confidencial y objetiva. Los revisores podrán indicar algunos trabajos relevantes previamente publicados que no hayan sido citados en el texto. Tras las sugerencias de los revisores y su decisión, los editores de la revista tienen la autoridad para rechazar, aceptar o solicitar la participación de los autores en el proceso de revisión. Tanto los revisores como los editores no tendrán conflicto de interés con respecto a los manuscritos que acepten o rechacen.

### LICENCIAS

En el caso de que un autor desee presentar una imagen, tabla o datos previamente publicados, deberá obtener el permiso de la tercera parte para hacerlo y citarla expresamente. Este permiso deberá estar reflejado por escrito y dirigido a la atención del editor de la revista ANALES RANM. Si la imagen, tabla o datos a publicar están basados en otros previamente publicados habrá de mencionarse dicha circunstancia.

En caso de que una institución o patrocinador participe en un estudio, se requiere de forma explícita su permiso para publicar los resultados de dicha investigación. En caso de presentar información sobre un paciente que pueda revelar su identidad, se requiere el consentimiento informado de dicho paciente por escrito.

### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores de un manuscrito son responsables de reconocer y revelar cualquier conflicto de intereses, o potencial conflicto de intereses, que pueda sesgar su trabajo, o pudiera ser percibido como un sesgo en su



trabajo, así como agradecer todo el apoyo financiero y colaboraciones personales. ANALES RANM se adhiere a las directrices del International Committee of Medical Journal Editors, que está disponible en <http://www.icmje.org>, incluyendo aquellas de conflicto de intereses y de autoría. Cuando exista conflicto de intereses, deberá ser especificado en la Página de Título. De igual forma, el impreso de "Declaración de Transparencia" (ver impreso en Documentación Complementaria) deberá ser rellenado, firmado por todos los autores y remitido al editor de ANALES RANM. Los autores deberán mencionar el tipo de relación e implicación de las Fuentes financiadoras. Si no existe conflicto de intereses, deberá especificarse igualmente. Cualquier posible conflicto de intereses, financiero o de cualquier otro tipo, relacionado con el trabajo enviado, deberá ser indicado de forma clara en el documento o en una carta de presentación que acompañe al envío.

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

En el último párrafo de la sección Material y Métodos, los autores deberán comentar que los pacientes incluidos en el estudio dieron su consentimiento a participar después de haber sido informados de forma concienzuda acerca del estudio. El editor de ANALES RANM, si lo considera necesario, puede requerir la presentación de este consentimiento informado a los autores.

#### ENVÍO DE MANUSCRITOS

Los manuscritos deberán ser remitidos por internet a través de la dirección [www.analesranm.es](http://www.analesranm.es) en el enlace de Envío de Manuscritos (o en su defecto entregando el material en la secretaría de la RANM), cumplimentando debidamente todos los campos requeridos siguiendo las normas e instrucciones que aparecen en la misma. El texto del manuscrito (incluyendo primera página o página de título, resumen, cuerpo del artículo, agradecimientos y referencias) deberán incluirse en un único archivo. Las figuras y tablas deberán adjuntarse en archivos separados, usando un archivo para cada tabla o figura.

#### NORMAS ESPECÍFICAS PARA CADA TIPO DE ARTÍCULO

**Todos los títulos de los manuscritos, sean del tipo que sean, deberán ser enviados tanto en castellano como en inglés.**

#### ARTÍCULO ORIGINAL DE INVESTIGACIÓN

Se considerarán trabajos de investigación clínica o básica todos aquellos relacionados con la medicina interna y con aquellas especialidades médico-quirúrgicas que representen interés para la comunidad científica.

Los tipos de estudios que se estiman oportunos son los estudios de casos controles, estudios de cohortes, series de casos, estudios transversales y ensayos controlados.

En el caso de ensayos controlados deberán seguirse las instrucciones y normativas expresadas en CONSORT disponible en [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org), o en otros similares disponibles en la web. La extensión máxima del texto será de 3000 palabras que deberán dividirse en las siguientes secciones: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones. Además, deberá incluir un resumen de una extensión máxima de 300 palabras, el cual deberá enviarse tanto en castellano como en inglés, estructurado en Objetivos, Métodos, Resultados, Conclusiones.

Se acompañará de 3 a 6 palabras clave en castellano y en inglés, recomendándose para las mismas el uso de términos MeSH (Medical Subject Headings de Index Medicus/Medline disponible en: <https://meshb.nlm.nih.gov/search>) y de términos del Índice Médico Español. Para la redacción de los manuscritos y una correcta definición de palabras médicas le recomendamos consulten el Diccionario de Términos Médicos editado por la Real Academia Nacional de Medicina de España. En total se admitirán hasta 40 referencias bibliográficas siguiendo los criterios Vancouver (ver más adelante). El número máximo de tablas y figuras permitidas será de 6. Una figura podrá estar a su vez formada por una composición de varias. El manuscrito deberá enviarse en formato Word (.doc o .docx), las tablas en formato (.doc o .docx) y las figuras en formato .jpg o .tiff y con una calidad de al menos 240 dpi.

#### ARTÍCULO ORIGINAL DE DOCENCIA

Se considerarán artículos docentes originales aquellos encaminados a mejorar y aportar nuevos datos sobre un enfoque práctico y didáctico de los aspectos docentes más importantes en las Ciencias de la Salud que ayuden a mejorar la práctica docente diaria. La extensión máxima del texto será de 2500 palabras. Se acompañará de un resumen no estructurado de hasta 250 palabras, el cual deberá enviarse tanto en castellano como en inglés. Así mismo se incluirán de 3 a 6 palabras clave en castellano y en inglés. El número máximo de referencias será de 20. Se podrá acompañar de hasta 3 tablas o figuras en los casos precisos. El manuscrito deberá enviarse en formato Word (.doc o .docx), las tablas en formato (.doc o .docx) y las figuras en formato .jpg o .tiff y con una calidad de al menos 240 dpi.

#### ARTÍCULO DE REVISIÓN

Son artículos que de forma sistemática intentan mostrar las evidencias más actuales sobre un tema de interés médico o médico-quirúrgico, tratando de establecer una serie de pautas a seguir en determinadas patologías. Los artículos de revisión podrán ser solicitados al autor de forma directa por parte del Comité Editorial (Editor y Editores Asociados) o bien remitidos de forma voluntaria por los autores. Los artículos de este tipo serán revisados por el Comité Editorial, por algún miembro del Comité Asesor/Científico y/o por Revisores externos.

La extensión máxima del artículo será de 4000 palabras divididas en una Introducción, Cuerpo o Síntesis de la revisión (podrán usarse los apartados y sub-apartados que se estimen oportunos) y Conclusiones. El resumen no tendrá que ser estructurado, con un máximo de 300 palabras, el cual deberá enviarse tanto en castellano como en inglés; De igual manera se añadirán de 3 a 6 palabras clave en castellano y en inglés. Se permitirán hasta 50 referencias bibliográficas y hasta 10 tablas o figuras. El manuscrito deberá enviarse en formato Word (.doc o .docx), las tablas en formato (.doc o .docx) y las figuras en formato .jpg o .tiff y con una calidad de al menos 240 dpi.

#### ARTÍCULO DE REVISIÓN EXTENDIDA

Idem que el "Artículo de Revisión" pero con una extensión de entre 4001 a 9500 palabras. Se considerará y evaluará tanto el Comité Científico como por el Editorial la aceptación y publicación de este tipo de artículos con carácter excepcional (como por ejemplo en situaciones de pandemia, alerta sanitaria, etc...). Estos artículos se dividirán igualmente en una Introducción, Cuerpo o Síntesis de la revisión (podrán usarse los apartados y sub-apartados que se estimen oportunos) y Conclusiones. El resumen no tendrá que ser estructurado, con un máximo de 300 palabras, el cual deberá enviarse tanto en castellano como en inglés; Se añadirán de 3 a 6 palabras clave en castellano y en inglés. Se permitirán hasta 50 referencias bibliográficas y hasta 14 tablas o figuras.

El manuscrito deberá enviarse en formato Word (.doc o .docx), las tablas en formato (.doc o .docx) y las figuras en formato .jpg o .tiff y con una calidad de al menos 240 dpi.

#### CASOS CLÍNICOS

Se permitirá la elaboración y envío de casos clínicos interesantes y que tengan un mensaje que transmitir al lector. No se contemplarán casos clínicos habituales sin interés para la comunidad científica. Debe contener el título del trabajo en castellano e inglés. La longitud máxima de los casos será de 1500 palabras distribuidas en una Introducción, Caso Clínico y Discusión. El resumen tendrá una extensión máxima de 150 palabras y no necesitará ser estructurado. Dicho resumen deberá enviarse tanto en castellano como en inglés. De igual manera se añadirán de 3 a 6 palabras clave en castellano y en inglés. Se permitirá un máximo de 3 figuras o tablas.

El número máximo de referencias bibliográficas será de 10. El manuscrito deberá enviarse en formato Word (.doc o .docx), las tablas en formato (.doc o .docx) y las figuras en formato .jpg o .tiff y con una calidad de al menos 240 dpi.

#### EDITORIALES

Estos artículos podrán ser comentarios libres o apuntes basados en la experiencia clínica y/o investigadora del autor sobre temas de interés médico, bien a propósito de algún otro artículo publicado en el mismo número de la revista o bien respecto a temas de actualidad médica. No es necesario "resumen" ni que contengan "introducción" y/o "conclusiones". Sí serán necesarias las palabras clave. La extensión máxima del texto enviado será de 800-1000 palabras sin estructurar. Podría contener, si el autor lo considera, 1 figura o una tabla. Como máximo se permiten 10 citas bibliográficas.

El manuscrito deberá enviarse en formato Word (.doc o .docx), las tablas en formato (.doc o .docx) y las figuras en formato .jpg o .tiff y con una calidad de al menos 240 dpi.

#### CARTAS AL EDITOR

Los artículos incluidos en esta sección podrán ser comentarios libres sobre algún tema de interés médico o bien críticas a artículos recientemente publicados (últimos 6 meses) en la revista ANALES RANM. Se aceptarán de manera excepcional críticas o comentarios publicados en otras Revistas si tienen un interés médico evidente. La extensión máxima del texto enviado serán 500 palabras sin estructurar. No es necesario incluir resumen ni palabras clave. Se podrá incluir 1 figura o tabla acompañando a la carta. Como máximo se permiten 5 citas bibliográficas. El manuscrito deberá enviarse en formato Word (.doc o .docx), las tablas en formato (.doc o .docx) y las figuras en formato .jpg o .tiff y con una calidad de al menos 240 dpi.

#### CRÍTICA DE LIBROS

En esta sección se permitirá la crítica y comentarios sobre un libro de ámbito médico o médico-quirúrgico en el que se destacarán los aspectos formales y científicos más importantes, así como las aportaciones fundamentales del mismo a la práctica clínica. Su extensión máxima será de 500 palabras. No es necesario resumen, palabras clave y no se permitirán tablas ni figuras, salvo la portada del libro. El manuscrito deberá enviarse en formato Word (.doc o .docx), las tablas en formato (.doc o .docx)

#### OTROS ARTÍCULOS

(Laudatios, Necrológicas, Artículos sobre figuras de la medicina, Artículos filosóficos, ...) Estos artículos, por su especial naturaleza, podrán tener una extensión de hasta 5.000 palabras. No es necesario resumen ni palabras clave al igual que no es obligatorio que contengan "introducción" y/o "conclusiones".

Así mismo las referencias bibliográficas, si las hubiere, no deberán de ir identificadas a lo largo del texto y solo bastará con la correspondiente mención al final del artículo. Como máximo se pueden indicar 10 referencias bibliográficas y contener 5 tablas /figuras. El manuscrito deberá enviarse en formato Word (.doc o .docx), las tablas en formato (.doc o .docx) y las figuras en formato .jpg o .tiff y con una calidad de al menos 240 dpi.

Estos tipos de artículos no serán publicados en la edición ordinaria de la revista ANALES RANM. Su difusión se realizará mediante un Suplemento Extraordinario editado anualmente.

#### CARACTERÍSTICAS FORMALES EN LA REDACCIÓN DEL MANUSCRITO

Cada trabajo, en función del tipo de artículo anteriormente expresado, deberá estar estructurado según se ha comentado. De forma general los trabajos deberán ir escritos en folios tamaño DIN A4 con una letra 10, tipo Times New Roman, con unos márgenes de 2.5cm y un interlineado de 1.5 con una justificación completa. Los artículos podrán enviarse en Español o Inglés, que son los dos idiomas oficiales de la revista.

Durante la elaboración del manuscrito podrán realizarse abreviaturas, previamente especificadas y aclaradas durante la primera aparición de la misma. Se recomienda uso de abreviaturas comunes en el lenguaje científico. No se permitirá el uso de abreviaturas en el título ni el resumen, únicamente en el cuerpo principal del manuscrito. Se deberá hacer especial hincapié en la expresión correcta y adecuada de las unidades de medida. Se considera fundamental y norma editorial la elaboración de un manuscrito que siga las instrucciones anteriormente mencionadas en cuanto a la estructura de cada uno de los tipos de artículos. La estructura general de envío de los artículos será la siguiente:

##### *Página inicial o Página de Título*

Deberá incluirse un Título sin más de 90 caracteres que sea lo suficientemente claro y descriptivo (en castellano e inglés).

Nombre y Apellidos de los autores - Indicar las Instituciones en las que Trabajan o proceden los autores - Incluir el nombre completo, dirección, e-mail y teléfono del Autor para la correspondencia.

Título breve: Sin superar los 50 caracteres - Añadir el número de palabras sin incluir el resumen y el número de tablas y figuras si procede.

##### *Segunda página o Página de Resumen y palabras clave*

Se deberá incluir un Resumen si procede según el tipo de manuscrito elegido, en el que deberá incluirse unos Objetivos (indicar el propósito del estudio de forma clara y breve), Métodos (indicando el diseño del estudio, pruebas realizadas, tipo de estudio, selección de pacientes y estudio estadístico), Resultados (los más significativos con su estudio estadístico correspondiente) y Conclusiones (énfasis en lo más importante de lo obtenido en el estudio). A continuación, se incluirán de 3 a 6 palabras clave.

##### *Tercera página o Página de Resumen y palabras clave en inglés*

Siguiendo las mismas recomendaciones anteriormente descritas en el punto anterior, pero en inglés.

#### Cuarta página y siguientes

Texto y Cuerpo del manuscrito con sus diferentes apartados -Introducción: Se incluirán los antecedentes más importantes, así como los objetivos del estudio a realizar.

Material y Métodos: Es la parte fundamental y más crítica del manuscrito. Es conveniente especificar el periodo de estudio, el tipo de población, el diseño del estudio, los procedimientos e instrumentos utilizados en el estudio, así como especificar los criterios de inclusión y de exclusión en el estudio. Deberá incluirse el tipo de estudio estadístico realizado según las características de las variables analizadas y estudiadas. Además, se añadirá si cumple con los requisitos éticos del comité del centro donde se ha llevado a cabo el estudio.

Resultados: Deben ser claros, concisos y bien explicados. Se intentará resumir parte de ellos en tablas para evitar confusión durante su lectura. Se recomienda no repetir información de las tablas o gráficos en el texto.

Discusión: Deberán discutirse los resultados obtenidos con respecto a los datos existentes en la literatura de una forma clara y científicamente adecuada. Se evitará repetir comentarios o datos contemplados en los apartados anteriores en la medida de lo posible.

Conclusiones: Se deberán destacar los aspectos más importantes de los datos obtenidos de forma breve y con mensajes directos.

#### Agradecimientos

Referencias o Bibliografía: Se incluirán las citas que el autor o autores hayan utilizado en la elaboración del manuscrito y quede constancia de ellas en el texto. Deberán ser ordenadas según su aparición en el texto y ser incluidas dentro del mismo entre paréntesis y con números arábigos. Las referencias seguirán estrictamente las normas de Vancouver\* (al final del presente documento se muestran ejemplos).

Tablas Deberán realizarse siguiendo los mismos criterios en cuanto a tamaño y tipo de letra, así como interlineado. Cada tabla será incluida en una página en solitario y deberá ser numerada de forma correlativa a su aparición en el texto con números arábigos. Deberá llevar un título explicativo del contenido de la misma de manera clara y concisa. El formato de realización de las tablas será .doc o .docx.

Figuras Tanto gráficos como fotografías, dibujos o esquemas se consideran figuras. Deberán numerarse según el orden de aparición en el texto. Cada una de las figuras llevará un título explicativo de las mismas, que deberá incluirse en el cuerpo principal del manuscrito tras las Referencias o Bibliografía. Cada figura deberá enviarse en un archivo individual principalmente en formato .tiff o .jpg con una calidad de al menos 300 dpi. Se añadirá además un pie de figura explicativo.

#### DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL Y PROCESO EDITORIAL COPYRIGHT

La Real Academia Nacional de Medicina de España, como propietaria de la revista ANALES RANM será responsable de custodiar los derechos de autoría de cada manuscrito. Los autores serán requeridos a completar un documento en lo que concierne a derechos de autoría y la transferencia de estos derechos a la revista ANALES RANM (mirar documento). El autor corresponsal está obligado a declarar si alguno de los autores es empleado del Gobierno de Reino Unido, Canadá, Australia o Estados Unidos de América o si tiene algún tipo de relación contractual con estas instituciones. En el caso de que un autor sea empleado de Estados Unidos de América, deberá especificar el número de contrato, así como si la investigación ha recibido fondos de Estados Unidos. Igualmente, si alguno de los autores pertenece al Instituto Médico Howard Hughes, deberá especificarlo.

La firma y acuerdo de copyright incluye:

Responsabilidad y garantía del autor: El autor garantiza que todo el material enviado a ANALES RANM es original y no ha sido publicado por otra revista o en otro formato. Si alguna parte del trabajo presentado ha sido previamente publicada, deberá especificarse en el manuscrito. El autor garantiza que ninguno de los datos presentados infringe los derechos de terceras partes y autoriza a ANALES RANM a usar el trabajo si fuera necesario.

Transferencia de derechos de uso: El autor transfiere a la Real Academia Nacional de Medicina de España todos los derechos concernientes al uso de cualquier material derivado del trabajo aceptado para publicación en ANALES RANM, así como cualquier producto derivado respecto a la distribución, transformación, adaptación y traducción, tal y como figura en el texto revisado de la Ley de Propiedad Intelectual.

Por tanto, los autores no estarán autorizados a publicar o difundir trabajos aceptados para publicación en ANALES RANM sin la expresa autorización escrita de la Real Academia Nacional de Medicina de España.

#### PROCESO EDITORIAL Y REVISIÓN

Los manuscritos enviados son recibidos a través de un sistema de envío mediante página web (o email en su caso) y, una vez recibidos ANALES RANM informará a los autores si el manuscrito es aceptado, rechazado o requiere de un proceso de revisión. El proceso de revisión comienza tras la recepción y una evaluación formal del Editor o Editores Asociados.

Posteriormente, el manuscrito será enviado a un mínimo de dos revisores externos o miembros del Consejo Rector o del Comité Científico sin que aparezca el nombre de los autores, datos personales ni filiación de los mismos para asegurar un proceso de revisión apropiado y objetivo. Una vez que el informe del revisor externo se ha recibido, el Comité Editorial emitirá una decisión que será comunicada a los autores.

El primer proceso de revisión no durará más de dos meses. Si un manuscrito requiere cambios, modificaciones o revisiones, será notificado a los autores y se les dará un tiempo para que realicen dichos cambios. La cantidad de tiempo dependerá del número de cambios que se requieran. Una vez que la versión revisada sea enviada, los autores deberán resaltar los cambios realizados en un color diferente y adjuntar una carta de respuesta a los revisores donde se argumentan de forma clara dichos cambios realizados en el manuscrito.

El Comité Editorial de ANALES RANM se reserve el derecho de hacer cambios o modificaciones al manuscrito con el consentimiento y aprobación de los autores sin hacer cambios en el contenido. El objetivo de estos cambios será mejorar la calidad de los manuscritos publicados en la revista. Tras la aceptación de un artículo, este será enviado a prensa y las pruebas serán enviadas al autor.

El autor deberá revisar las pruebas y dar su aprobación, así como indicar cualquier error o modificación en un plazo de 48 horas. Pasado este tiempo, no se admitirán cambios en el contenido científico, el número o el orden de los autores.

En caso de que aparezca errores tipográficos u otros errores en la publicación final, el Comité Editorial junto con los autores publicarán una aclaración apropiada en el siguiente número de la revista. En el caso extremo en que los autores insistieran en hacer cambios no autorizados antes de la publicación final del artículo o violar los principios previamente mencionados, el Comité Editorial de ANALES RANM se reserva el derecho de no publicar el artículo.

## AGRADECIMIENTOS

En agradecimiento, los revisores recibirán un diploma o documento acreditativo reconociendo su contribución a ANALES RANM (requiere solicitud al Editor). El Comité Editorial y Científico añadirán nuevos revisores cada año y están siempre abiertos a las sugerencias de los revisores para mejorar la calidad científica de la revista.

## POLÍTICA EDITORIAL Y PUBLICIDAD

La revista ANALES RANM se reserva el derecho de admitir publicidad comercial relacionada con el mundo de las Ciencias de la Salud si lo cree oportuno. ANALES RANM, su Consejo Editorial y Científico y la Real Academia Nacional de Medicina no se hacen responsables de los comentarios expresados en el contenido de los manuscritos por parte de los autores.

## LISTADO DE COMPROBACIÓN

Este listado es muy útil a la hora de realizar la última revisión del artículo previa a su envío a la Publicación. Revisar y comprobar las siguientes tareas: Nombrar un autor de correspondencia y su correo electrónico. Preparar todos los archivos que deberá incluir el envío.

Sobre el Manuscrito verificar: • Que contiene la lista de palabras clave • Que se incluyen todas las figuras y sus títulos correspondientes • Que están todas las tablas (con el título, descripción y notas pertinentes) • Que todas las referencias a tablas y figuras en el texto coinciden con los archivos de tablas y figuras que envía • Indicar si alguna de las figuras requiere impresión a color • Que las imágenes tienen calidad y la adecuada resolución.

También tener presente: • Realizar una corrección ortográfica y gramatical • Todas las citas del texto se hallan en el listado de referencias, y viceversa • Obtener los permisos necesarios para el uso de material sujeto a derechos de autor, incluyendo el material que provenga de Internet • Realizar las declaraciones de conflicto de intereses • Revisar la normativa de la revista detallada en la presente Guía • Citar explícitamente las fuentes y origen de contenidos externos.

### \* Ejemplos de referencias bibliográficas Normas Vancouver:

**Libro:** Autor/es. Título. Volumen. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año.

Lain Entralgo P. Historia de la medicina. Barcelona: Ediciones científicas y técnicas; 1998.

Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, editores. Harrison's principles of internal medicine. Vol 1. 17th ed. New York: McGraw Hill; 2008.

Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editores. Harrison principios de medicina interna. Vol 2. 18a ed. México: McGraw-Hill; 2012.

Si el Libro o Revista posee código DOI, por favor indicar.

### Capítulo de libro Autor/es del capítulo:

Autor/es. Título del capítulo. En: Director/Coordinador/Editor literario del libro. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. Página inicial del capítulo-página final del capítulo.

Rader DJ, Hobbs HH. Trastornos del metabolismo de las lipoproteínas. En: Barnes PJ, Longo DL, Fauci AS, et al, editores. Harrison principios de medicina interna. Vol 2. 18a ed. México: McGraw-Hill; 2012. p. 3145-3161.

Si el capítulo del Libro posee código DOI, por favor indicar.

### Artículo de revista Autores del artículo:

Artículo de revista Autores del artículo (6 autores máximo, si más de 6 autores, poner los 3 primeros *et al.*):

Título del artículo. Abreviatura de la revista. Año; Volumen (número): páginas.

Lyons RM, Marek BJ, Paley C et al (8 autores). Comparison of 24 months outcomes in chelated and no-chelated lower-risks patients with myelodysplastic syndromes in a prospective registry. *Leuk Res* 2014; 38(2):149-154.

Kautz L, Yang G, Vafre EV, Rivella S, Nemeth, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014; 46(7):678-684.

Griesshammer M, Gisslinger H, Mesa R. Current and future treatment options for polycythemia vera. *Ann Hematol* 2015 [Internet]. <https://doi.org/10.1077/s00277-015-2357-4>

Si el artículo de la Revista posee código DOI, por favor indicar.

### \*\* Ejemplos de citas de texto Normas Vancouver:

Las citas en el texto han de realizarse mediante "llamadas" con números arábigos entre paréntesis.

Cada trabajo citado deberá tener un **número único** asignado por estricto orden de citación. Aunque una obra sea citada en más de una ocasión mantendrá el mismo número en todas las citaciones.

Ejemplo: este tipo de neoplasia se observa en la imagen histológica de un modo evidente (1)...

Si se realiza una cita directa, ésta deberá de ser breve no más extensa de 5 renglones ó 50 palabras. Se insertará dentro del texto del manuscrito entre comillas, y el número de la citación entre paréntesis junto a la paginación que corresponda se colocará al final, después de las comillas y antes del signo de puntuación.

Ejemplo: "...el proceso neurodegenerativo se habrá ya manifestado clínicamente" (2, p.14).

Cada autor citado tendrá igualmente un **número único** aunque también puede integrarse el nombre del autor seguido por el número que le corresponda. Si el autor no es nombrado el número entre paréntesis aparecerá al final de la frase. Si la obra tiene más de un autor, citar en el texto el *primer autor et al.*

Ejemplo: Como indicó Tamames (3) este tipo de cirugía ha de plantearse ...

Para citar una obra que no tiene un autor concreto se debe usar lo que se denomina "autor corporativo".

Ejemplo: La Organización Mundial de la Salud (4) estima que el incremento de esta patología...

### Anales RANM 2020.



# Vacunas

## PARA TODOS

Un compromiso y tres grandes desafíos. Así está trabajando la industria farmacéutica para lograr la inmunización global contra la Covid-19

### Compromiso con la Alianza Mundial de la OMS

Desde el inicio de la pandemia, la industria farmacéutica se comprometió con la Organización Mundial de la Salud con dos objetivos:

1

Colaborar y compartir conocimiento para ganar tiempo en el desarrollo de terapias

2

Ofrecer las vacunas a precio asequible y colaborar para un acceso equitativo



### Desafío de la I+D

#### COOPERACIÓN

Las compañías farmacéuticas se han volcado, en colaboración con gobiernos y comunidad científica, para conseguir tratamientos en el menor tiempo posible

#### PROTAGONISMO DE ESPAÑA

España ha sido el primer país de Europa y el cuarto del mundo en número de ensayos clínicos contra la Covid-19, con **172 ensayos**

#### NO SÓLO VACUNAS

Hay al menos **332 medicamentos en investigación**, de los que 8 están ya siendo evaluados para su aprobación por la Agencia Europea del Medicamento

#### ¿QUÉ SE HA CONSEGUIDO?

< 1 año

Primeras vacunas aprobadas en menos de un año (un proceso que necesita de media diez años se ha reducido a uno)

4+4

4 vacunas ya aprobadas (y otras 4 en revisión) por las agencias estadounidense (FDA) y europea (EMA)

322

vacunas en fase de investigación  
 ↘ 128 en fase clínica de investigación en humanos  
 ↘ 29 de ellas en la última fase

### Desafío de la producción

En paralelo al desarrollo de las vacunas, la industria farmacéutica comenzó a trabajar para producir miles de millones de dosis en el menor tiempo posible

#### LAS COMPAÑÍAS DESARROLLADORAS TRABAJARON EN TRES LÍNEAS



#### Capacidad de producción

Ampliación de sus propias plantas de producción para **aumentar la capacidad**



#### Producción a riesgo

Algunas compañías comenzaron a producir vacunas antes de que éstas **estuvieran aprobadas** por las agencias reguladoras



#### Acuerdos con otras compañías

Hasta septiembre se han firmado más de **310 acuerdos** entre compañías desarrolladoras y otras con capacidad de participar en la producción de vacunas

Los acuerdos se extienden por **todo el mundo**, incluyendo empresas de países como China, India y Sudáfrica y compañías competidoras en Occidente

También aquí hay un **protagonismo español**: 4 compañías participan en la producción de las vacunas aprobadas por la EMA

### Desafío de la distribución

La industria farmacéutica colabora, dentro de la Alianza Mundial de la OMS, con la iniciativa Covax, que está respaldada por gobiernos y otras grandes organizaciones sociales y que busca asegurar una distribución equitativa de las vacunas disponibles

Innovamos para las personas



# ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA DE ESPAÑA



Organizado por



REAL ACADEMIA NACIONAL  
DE MEDICINA DE ESPAÑA

INSTITUTO FUNDACIÓN  
TEÓFILO HERNANDO  
I+D del Medicamento/Drug Discovery



Con la colaboración de

farmaindustria

fundación  
asisa+