

MÁSTER EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORADO BIOLOGÍA CELULAR Y
MOLECULAR

XVIII JORNADAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y
MOLECULAR

Málaga, 9 y 10 de Junio de 2016

Salón de Actos del Instituto de Estudios Portuarios. Puerto de Málaga.

HORARIOS

JUEVES, 9 JUNIO

09:00-09:15 Bienvenida por el organizador: Salvador Guirado

09:15-10:30 Sesión Ia. Moderadores: Francisco Cazorla y José Lozano.

Juan Gémez Mata

Determinación del efecto antagonista del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) sobre el sistema del interferón tipo I (IFN-I).

David Carrera Santaella

Coexistencia del virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV), papilomavirus y poliomavirus en dorada (*Sparus aurata*).

Zahira M^a Heredia Ponce

Estudio del componente exopolisacárido en el comportamiento multicelular de *Bacillus cereus*.

Ana Isabel Corona Bravo

Análisis de la microbiota intestinal de pacientes con colitis ulcerosa.

Amanda Cabrera Mulero

Microbiota asociada a resistencia a insulina en muestras de apéndices de pacientes obesos mórbidos.

10:30-11:00 Pausa café

11:00-13:20 Sesión Ib. Moderadores: Concepción Ávila y Miguel Ángel Moriño.

Francesca R. Aprile Mancha

Evolución del filotipo I de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: 25 años de necrosis apical del mango.

Sandra Tienda Serrano

Señalización de *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 en la rizosfera durante las interacciones multitróficas.

María Luisa Antequera Gómez

La bacteria patógena humana *Bacillus cereus*: formación de biopelículas e interacción con la planta.

Elena Pedrero Vega

Implicación de la matriz extracelular de biofilms de *Bacillus subtilis* en la interacción beneficiosa con la planta.

Jesús Cámara Almirón

Estudio mecanístico y funcional de las fibras amiloides presentes en la matriz extracelular de *Bacillus subtilis*.

Alicia Talavera Júdez

Asociación de marcadores moleculares a caracteres de interés en aguacate y chirimoyo.

Rocío de las Mercedes Leiva Rebollo

Desarrollo y evaluación de una vacuna ADN frente al virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV).

13:20-13:30 Pausa

13:30-14:00 Sesión II. Moderadores: M^aDolores Castro e Ignacio Fajardo.

Luisa María Henao Mejía

La familia de factores de transcripción DOF en *Populus trichocarpa*. Identificación del ortólogo de PpDof5 en chopo.

José Alberto Urbano Gámez

Nitrogen flux in plants: uptake from the megagametophyte to the nascent embryo.

14:00-16:30 Comida. Restaurante El Pimpi.

16:30-17:40 Sesión III. Moderadores: Rita Carmona y M. Gonzalo Claros.

Soukania Boutriq

Isoenzimas de glutaminasa y cáncer.

Alfonso Alba Bernal

Determinación del perfil mutacional en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) utilizando secuenciación dirigida.

Elena Rojano Rivera

Desarrollo de herramientas bioinformáticas para el análisis de enfermedades de origen genético en humanos.

M^a Carmen Ocaña Farfán

Estudios de metabolismo en el "microambiente angiogénico" como potencial diana para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades dependientes de angiogénesis.

VIERNES, 10 JUNIO

09:30-10:30 Sesión IVa. Moderadores: José Carlos Dávila y Francisco Ruiz Cantón.

Patricia Chaves Peña

Neurogénesis hipotalámica adulta en un modelo animal de adicción a cocaína.

Laura Trigueros López

Efecto de la eliminación del epitelio endimario de los ventrículos laterales en la neurogénesis de ratón adulto.

M^a Luisa Montiel Pedraza

Efecto de la activación del receptor dopaminérgico D₄ sobre la neurogénesis adulta en la zona subventricular inhibida por morfina.

Alejandro Trujillano Fernández

Estudio de la interacción de los receptores D₄R-MOR en la sustancia negra reticular.

10:30-11:00 Pausa café

11:00-11:50 Sesión IVb. Moderadores: Alicia Rivera y José Luis Urdiales.

Cristina Goebel Vázquez

Estudio ultraestructural del proceso neuropatológico en el hipocampo de un modelo transgénico para Tau de la enfermedad de Alzheimer.

Rubén Gómez Gutiérrez

Modulación de la respuesta inflamatoria en un modelo transgénico APP/PS1 de la enfermedad de Alzheimer: efecto sobre la patología cerebral.

Juan José Fernández Valenzuela

Contribución diferencial de Abeta y Tau al proceso degenerativo en la enfermedad de Alzheimer: búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

12:00-13:10 Sesión V. Moderadores: M^aÁngeles Real y Miguel Ángel Medina.

Laura Angélica Hernández de Haro

Transiciones epitelio-mesénquima en el desarrollo cardíaco.

Sergio Daniel Rosales Vanella

Contribución de las células del linaje Wt1 al desarrollo del páncreas en ratón.

Cristina Pogontke Díaz

Respuestas celulares del nicho pericoronario a daño cardíaco: reclutamiento de progenitores sanguíneos e interacción neurovascular.

Paul Palmquist Gomes

Mecanismos reparativos y regenerativos en el corazón embrionario de los vertebrados.

13:10-13:50 Coloquio-reflexión sobre las Jornadas. Clausura.

RESÚMENES

Sesión Ia

Determinación del efecto antagonista del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) sobre el sistema del interferón tipo I (IFN-I).

Juan Gémez Mata

Trabajo dirigido por M^a Carmen Alonso Sánchez. Depto. Microbiología. Facultad de Ciencias.

Alumno de Máster

El sistema del interferón tipo I (IFN-I) es el principal mecanismo de defensa frente a infecciones víricas del sistema inmune innato. El IFN-I es secretado por células infectadas, estimulando en células vecinas la síntesis de proteínas con actividad antiviral, como ISG15, PKR o Mx, codificadas por los llamados genes estimulados por IFN (ISG). Muchos virus han desarrollado mecanismos antagonistas que impiden esta respuesta, actuando a distintos niveles, incluyendo la inhibición de la activación de promotores de diversos ISG. En este sentido, estudios *in vivo* de nuestro grupo de investigación sugieren que el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) posee propiedades antagonistas frente al sistema IFN-I de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Alvarez-Torres *et al.*, 2016), lo que constituye la **hipótesis** planteada en este trabajo. La confirmación de esta hipótesis se realizará mediante una aproximación *in vitro*, abordando los siguientes **objetivos**: en primer lugar el desarrollo de una línea celular, derivada de trucha arcoíris, que exprese de forma estable el gen de la luciferasa bajo el control del promotor del gen *mx* de lenguado (*ssMx*), lo que constituye una herramienta contrastada para el estudio *in vitro* de la interacción sistema IFN-virus. Una vez caracterizada dicha línea, se abordará el segundo objetivo, en el que se evaluará la inhibición de la activación del promotor del gen *ssMx* tras la infección vírica.

El promotor *ssMx* se subclonó a partir del plásmido pGEM-PromSsMx (Alvarez-Torres *et al.*, 2015) en el sitio de inserción del vector pGL4.22 que, de este modo, expresaría la luciferasa *firefly* bajo su control. Células de gónadas de trucha arcoíris (línea celular RTG-2) se transfectaron con dicha construcción mediante electroporación, siendo seleccionadas con puromicina. La presencia del promotor se comprobó mediante medidas de actividad luciferasa en células cuyo sistema IFN-I fue estimulado con poli I:C, un ARN bicatenario sintético utilizado en controles positivos de inducción. Con el fin de abordar el segundo objetivo, la línea celular obtenida se inoculará con tres virus patógenos de peces: un aislado del virus de la necrosis pancreática viral (IPNV), cuyos mecanismos antagonistas están ampliamente documentados (control positivo de antagonismo), y dos aislados de VHSV, uno de origen marino, patógeno para lenguado, y otro de agua dulce, que no produce mortalidad en esta especie. Una disminución de la actividad luciferasa en células tratadas conjuntamente con poli I:C y virus, en comparación con dicha actividad en células tratadas únicamente con poli I:C, pondría de manifiesto mecanismos antagonistas en el virus ensayado. Además, la reversión de dicha disminución tras el tratamiento con IFN recombinante de salmónidos indicaría que ese antagonismo se produciría a nivel de síntesis de IFN.

Alvarez-Torres *et al.*, (2013). *Fish & Shellfish Immunology*, 35(5), 1642–8.

Alvarez-Torres *et al.*, (2016). *Veterinary Research*, 47(1), 3.



Coexistencia del virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV), papilomavirus y poliomavirus en dorada (*Sparus aurata*).

David Carrera Santaella

Trabajo dirigido por Alejandro Labella Vera. Tutora: Dra. Dolores Castro López. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias.

Alumno de Máster.

La dorada (*Sparus aurata*) es una de las principales especies de peces marinos cultivadas en Europa, siendo España el tercer productor piscícola de esta especie, por detrás de Grecia y Turquía, con una producción de 16.230 toneladas en 2014 (APROMAR, 2015).

Uno de los principales problemas de la acuicultura son las enfermedades infecciosas, en especial las de origen vírico, ya que éstas presentan una mayor dificultad para ser tratadas. La enfermedad de linfocistis (LCD) es la principal enfermedad de origen vírico que afecta a dorada. En los animales enfermos se puede apreciar el desarrollo de lesiones con apariencia de nódulos blanquecinos en la superficie externa del pez como producto de la hipertrofia de las células infectadas. Su agente etiológico es el virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV), un virus dsDNA de la familia *Iridoviridae* que infecta a un amplio rango de especies de peces, tanto marinos como de agua dulce. Por otro lado, la familia *Polyomaviridae* consta, hasta el momento, de tres géneros, de los cuales dos afectan a mamíferos (*Wukipolyomavirus* y *Orthopolyomavirus*) y uno a aves (*Avipolyomavirus*). La familia *Papillomaviridae* se compone de 16 géneros que infectan a una gran variedad de especies de amniotas. En ambos casos se trata de virus dsDNA, desnudos y con una cápside de simetría icosaédrica.

Recientemente, en un análisis de secuenciación masiva de tejido epidérmico de dorada afectada por LCD, se ensamblaron tres genomas virales correspondientes a LCDV y a unas posibles nuevas especies de papilomavirus (SauPV1) y poliomavirus (SauPyV1). En posteriores análisis realizados sobre doradas afectadas por LCD se comprobó la presencia conjunta de LCDV, papilomavirus y/o poliomavirus en el 96% de los casos.

En este trabajo, se han diseñado protocolos de PCR y nested-PCR múltiple para la detección simultánea de un gen estructural y otro no estructural, tanto de SauPV1 como de SauPyV1. Estos protocolos se utilizarán para analizar ejemplares de dorada procedentes de piscifactorías durante brotes de LCD, con el fin de establecer la prevalencia de estos nuevos virus.

Adicionalmente, se pretende analizar si la presencia de papilomavirus y poliomavirus en los animales afectados por la LCD se corresponde con una coinfección junto al LCDV. Para ello se analizará mediante RT-qPCR la expresión de genes virales estructurales de LCDV, SauPV1 y SauPyV1 en doradas enfermas, como indicativo de infección productiva por estos virus.



Estudio del componente exopolisacárido en el comportamiento multicelular de *Bacillus cereus*.

Zahira M^a Heredia Ponce

Trabajo dirigido por Diego Romero. Departamento de Microbiología. Área Fitopatología. Centro de Bioinnovación y Supercomputación de la Universidad de Málaga.

Alumna de Máster

Las bacterias son potencialmente capaces de formar comunidades multicelulares llamadas "biofilms" en cualquier superficie. Para formar el biofilm, las bacterias sintetizan una matriz extracelular multivalente, que a modo de tejido recubre a las células proporcionando estabilidad estructural y protección a las células. Aunque son muchos los efectos beneficiosos asociados a los biofilms bacterianos (ej. biofilms en raíces vegetales, microbiota intestinal, etc.), también pueden ser problemáticos en el ámbito biosanitario o la industria agro-alimentaria. Este es el caso de *Bacillus cereus*, una bacteria del suelo que incluye a miembros saprófitos o patógenos de humanos, y capaz de formar esporas las cuales pueden conducir a problemas de contaminación en la industria alimentaria e incluso intervenir en casos de intoxicaciones gastrointestinales. Aparte de la esporulación, diferentes especies de *Bacillus* forman biofilms, y estos pueden contribuir a la persistencia y diseminación de las esporas en distintos nichos.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación se han centrado en el estudio del componente proteico del biofilm formado por *B. cereus*, y en este Trabajo Fin de Máster se planteó el estudio del papel de distintos polisacáridos en la formación del biofilm. Mediante un análisis bioinformático se identificaron dos regiones genómicas que contenían genes ortólogos al operón *eps*, implicado en la síntesis de exopolisacárido en *B. subtilis*: i) *BC_5279 – BC_5263* y ii) *BC_1583 – BC_1590*. Los ensayos de biofilm demostraron que mutantes simples en cada región o el mutante doble se comportaban de forma similar que la cepa parental, descartando su implicación, al menos esencial en la formación de biofilm y en las condiciones ensayadas. En paralelo se evaluaron otras posibles funciones descritas para los exopolisacáridos, como movilidad y auto-agregación celular. En ensayos de movilidad tipo swarming (movimiento grupal de células) el $\Delta BC_1583 – BC_1590$ aumentó la movilidad respecto al silvestre, mientras que el doble mutante $\Delta BC_1583 – BC_1590$, *BC_5279 – BC_5274* revirtió el fenotipo silvestre. En ensayos de agregación celular, el mutante $\Delta BC_1583 – BC_1590$ agregó más rápido y de forma más intensa que el silvestre, mientras que el doble mutante lo hizo igual que el silvestre.

Estos resultados sugieren la compleja interconexión que pueden existir entre diferentes componentes de la matriz extracelular y por tanto su implicación en el comportamiento multicelular bacteriano como la formación de biofilms.



Análisis de la microbiota intestinal de pacientes con colitis ulcerosa.

Ana Isabel Corona Bravo

Trabajo dirigido por Miguel Angel Moriño. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias.

Alumna de Máster

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria del colon y recto, caracterizada por la inflamación y ulceración de la pared interior del colon. No se conoce la causa de la colitis ulcerosa, y actualmente no hay cura, excepto a través de la extirpación quirúrgica del colon. Las personas que padecen esta afección tienen problemas con el sistema inmunitario pero se desconoce si estas anomalías son una causa o un efecto de la enfermedad. Actualmente 1,4 millones de personas en EEUU y 2,2 millones de personas en Europa padecen la enfermedad y el número sigue aumentando.

El intestino humano alberga una comunidad diversa de bacterias comensales en una relación de simbiosis con el anfitrión de modo que influye permanentemente en su fisiología. El 99% de la flora intestinal de un adulto sano lo forman bacterias anaerobias estrictas (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*) y bacterias lácticas (*Streptococcus*, *Lactobacillus*). Las bacterias anaerobias facultativas (Enterobacterias) sólo representan el 1% (*Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*). Hay evidencias claras de que las interacciones bacterianas en la mucosa del intestino desempeñan un papel muy importante en el desarrollo y regulación del sistema inmune. Si esta interacción no es adecuada, la homeostasis entre la carga antigénica ambiental y la respuesta del individuo puede fallar. Ello puede repercutir en el desarrollo de patologías de desregulación inmunitaria frente a estructuras antigénicas propias (autoinmunidad), incluyendo la propia microbiota (enfermedad inflamatoria intestinal), o estructuras antigénicas del ambiente (atopia).

En este trabajo se pretende ver si existen diferencias significativas entre la microbiota de pacientes que padecen colitis ulcerosa y personas sanas. Para lo cual se realizará un análisis mediante DGGE (electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante) de la población bacteriana presente en ambos grupos de estudio. Se dispone de 42 muestras de pacientes con colitis ulcerosa y 8 muestras control. Posteriormente mediante clonación y secuenciación se hará un estudio de los grupos específicos de comunidades bacterianas presentes para ver si realmente existen diferencias entre los grupos de estudio.

Castro-Mejía, J. Treatment with a Monoclonal Anti-IL-12p40 Antibody Induces Substantial Gut Microbiota Changes in an Experimental Colitis Model. Hindawi Publishing Corporation. Gastroenterology Research and Practice Volume 2016, Article ID 4953120, 12 pages

Guarner, F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. Unidad de Investigación de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España. Nutr. Hosp. vol.22 supl.2 mayo 2007

Marchesi, J. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier Gut 2016 65: 330-339 originally published online September 2, 2015. <http://gut.bmj.com>



Microbiota asociada a resistencia a insulina en muestras de apéndices de pacientes obesos mórbidos.

Amanda Cabrera Mulero

Trabajo dirigido por Fernando Cardona Díaz. (IBIMA, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria).
Tutorizado por Enrique Viguera Minguez (UMA).

Alumna de Máster

La obesidad se ha convertido en uno de los problemas de salud más importantes que asolan nuestra sociedad actual. Es un factor de riesgo que se vincula al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y al desarrollo de resistencia a insulina. Actualmente, se conoce que el link entre la obesidad y la resistencia a insulina es debido al estado inflamatorio que se genera en el individuo obeso, siendo estas moléculas inflamatorias las que interfieren en la vía de señalización de la insulina provocando resistencia a esta hormona en sus órganos diana (hígado, músculo esquelético y tejido adiposo). Varios estudios han manifestado la relación existente entre obesidad, microbiota y resistencia a insulina. Se ha demostrado que la microbiota intestinal influye en el estado metabólico del hospedador, modifica la permeabilidad intestinal favoreciendo el paso de componentes bacterianos al torrente circulatorio e incrementando de esta manera el estado inflamatorio y, además, es capaz de repercutir en la epigenética. Asimismo, recientes hallazgos indican que la microbiota del apéndice refleja la microbiota del intestino delgado con una función primordial en el metabolismo e inmunidad del hospedador y, por ende, en la salud.

El objetivo de este estudio trata de identificar usando los nuevos sistemas de secuenciación la precisa microbiota intestinal asociada con resistencia a insulina en muestras de apéndices de pacientes obesos mórbidos clasificados en dos grupos, con alta resistencia a insulina (IR-MO) y con baja resistencia a insulina (NIR-MO). Con ello, se pretende determinar la posible asociación entre esta microbiota intestinal, determinada por pirosecuenciación del ARNr 16S y análisis bioinformático por QIIME, y variables asociadas con resistencia a insulina así como con el nivel de expresión de genes relacionados con la inflamación (IL-6, IL-1 β , TNF- α) y con la infiltración de macrófagos (CD11b) en tejido adiposo visceral medidos por qRT-PCR.

Los resultados mostraron que el grupo IR-MO tenía un incremento significativo de *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Pseudomonaceae*, *Prevotellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Catenibacterium*, *Prevotella*, *Veillonella* y *Fusobacterium* respecto al grupo NIR-MO. De igual modo, se encontraron correlaciones significativas entre la abundancia de ciertos taxones bacterianos y determinadas variables bioquímicas. Por consiguiente, los pacientes IR-MO muestran una disbiosis en el apéndice, con pérdida de las bacterias productoras de butirato junto con un incremento de patógenos oportunistas y bacterias que degradan la mucina. Además, la microbiota del grupo IR-MO se relacionó con un bajo grado de inflamación en el tejido adiposo que justificaría la pérdida de sensibilidad a insulina.

Consecuentemente, estos conocimientos generados podrían ser útiles para desarrollar estrategias de control del desarrollo de resistencia a insulina.



Sesión Ib

Evolución del filotipo I de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: 25 años de necrosis apical del mango.

Francesca R. Aprile Mancha

Trabajo dirigido por Antonio de Vicente Moreno y Francisco M. Cazorla López. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

Alumna de doctorado

La necrosis apical del mango (NAM) es una enfermedad que se ha observado en el litoral andaluz desde la implantación de este cultivo. El agente causal de la NAM es la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss), la cual ha sido ampliamente descrita y documentada por nuestro grupo de investigación (Cazorla *et al.*, 1992, 1997, 1998). Esta enfermedad aparece principalmente asociada a climas con inviernos húmedos y frescos, tal y como ocurre en la cuenca mediterránea (Cazorla *et al.*, 1992, 1998; Pinkas *et al.*, 1996), donde, además de en España, se ha descrito en otros países (Israel, Portugal, Italia, Egipto) y otras áreas de cultivo con un clima similar, como el Noroeste de Australia (Golzar y Cother, 2008; Young, 2008).

Las cepas de Pss aisladas de mango muestran características importantes para su biología, como la tolerancia a radiaciones ultravioletas (Cazorla *et al.*, 2003) o la resistencia al cobre (Cazorla *et al.*, 2002), así como la producción de proteínas nucleadoras de hielo (Cazorla *et al.*, 1995) y la producción de toxinas, destacando la mangotoxina (Arrebola *et al.*, 2003), siendo esta un factor de virulencia muy relevante que incrementa sensiblemente la incidencia y la severidad de los síntomas inducidos por las cepas de Pss productoras (Arrebola *et al.*, 2007, 2009).

Empleando diferentes técnicas de análisis de la diversidad fenotípica y genotípica, se han podido determinar la existencia de varios filotipos dentro del pv. *syringae*, agrupando a todas las cepas de Pss aisladas de mango y productoras de mangotoxina dentro del filotipo I (Gutiérrez-Barranquero *et al.*, 2008, 2013).

El objetivo general de este trabajo es aislar cepas de Pss de árboles de mango de las distintas zonas en estudio (España, Portugal, Italia y Australia), para así poder abordar un análisis genómico comparativo de las cepas de Pss aisladas antes del año 2000, y ya disponibles en nuestro laboratorio, con aislamientos actuales (2016-2017); se intentará determinar así, el posible grado de evolución o adaptación de las cepas de Pss asociadas a árboles de mango desde principio de los 90' hasta la actualidad.

Este trabajo es financiado por la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (P12-AGR-1473), cofinanciado con fondos FEDER (EU). F. Aprile está siendo financiada con una ayuda del programa FPI de Excelencia de la Junta de Andalucía.



Señalización de *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 en la rizosfera durante las interacciones multitróficas.

Sandra Tienda Serrano

Trabajo dirigido por Francisco M. Cazorla López. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

Alumna de Doctorado

Pseudomonas chlororaphis PCL1606 es una rizobacteria, que muestra capacidad antagonista y actividad de biocontrol frente a diferentes hongos fitopatógenos de suelo, entre ellos *Rosellinia necatrix*, que produce la enfermedad denominada podredumbre blanca radicular en el aguacate. Se ha demostrado que PCL1606 produce, entre otros compuestos antifúngicos, 2 hexil, 5 propil resorcinol (HPR), el cual es clave para el antagonismo y la actividad biocontrol contra *R. necatrix* (Calderón et al., 2013). Los genes responsables de la producción de HPR son los genes *dar*, y su estudio ha demostrado que la producción de HPR puede ser considerada como uno de los elementos principales que impide que la hifa fúngica se pueda desarrollar normalmente y completar el proceso de infección de la raíz de aguacate (Calderón et al., 2013).

En este trabajo se pretende, mediante el empleo de estrategias genómicas funcionales, profundizar en los aspectos esenciales que tienen lugar durante las interacciones multitróficas que se establecen en el control biológico de la podredumbre blanca del aguacate. Para ello se estudiarán genes implicados en las distintas situaciones de interacción. Y se realizará un análisis a nivel de los ARN que se inducen por PCL1606 en diferentes situaciones (presencia de la planta, del hongo, o de ambos durante el biocontrol), identificando que genes se reprimen o aumentan su expresión, para después estudiarlas individualmente. También se profundizará en los procesos de señalización en la rizosfera. Se abordará el estudio del papel de acil homoserina lactonas (AHL) en el fenotipo de PCL1606. Se construirán mutantes en los sistemas de quorum sensing que se localicen en su genoma, y se realizará un análisis de los ARN que se inducen en cada mutante, determinándose los fenotipos dependientes de quorum sensing. Y por último, también se analizará el papel del HPR como posible molécula señal, llevando a cabo una comparación de los genes inducidos en la cepa silvestre y la cepa $\Delta darB$ (deficiente en producción del antifúngico HPR) determinando si el HPR actúa induce algunos fenotipos.

Este trabajo está siendo financiado por el Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Economía (AGL2014-52518-C2-1-R; MINECO, España) y cofinanciado con fondos FEDER (EU). S. Tienda está financiada con una ayuda del programa FPI del MINECO.



La bacteria patógena humana *Bacillus cereus*: formación de biopelículas e interacción con la planta.

María Luisa Antequera Gómez

Trabajo dirigido por Diego Romero Hinojosa. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias.

Alumna de Doctorado

Bacillus cereus es un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas que incluyen cepas patógenas responsables de contaminaciones en la industria alimentaria y médica, así como intoxicaciones alimentarias. Dependiendo de los síntomas asociados a la intoxicación, las cepas patógenas de *B. cereus* pueden clasificarse en enterotoxigénicas y eméticas, existiendo también cepas ambientales con actividad de biocontrol. Además, esta bacteria forma biopelículas, lo que puede contribuir a una eficiente colonización de superficies incluidas las de plantas, un aspecto poco estudiado del ciclo de vida de *B. cereus*.

En este trabajo se seleccionaron 10 aislados clínicos y ambientales de *B. cereus*, debido a las diferencias en su capacidad para formar biopelículas *in vitro*. Para estudiar la ecología de estas cepas, se inocularon hojas de plantas de melón y pepino con suspensiones de 10^8 ufc/ml de cada cepa. La dinámica de población demostró que prácticamente todos los aislados persistían en las hojas a niveles de 10^3 ufc/g de hoja, aunque no parecía existir un patrón asociado al origen del aislamiento. Sin embargo, pudimos observar tres cinéticas de esporulación diferentes: esporulación temprana de la población, esporulación tardía y prácticamente ausencia de esporulación. El seguimiento de la distribución espacial de las bacterias mediante microscopía electrónica de barrido mostró la existencia de colonias formadas por varias capas de células unidas entre sí por una especie de matriz, sugerente de biopelículas bacterianas.

Nuestros resultados prevén la capacidad de cepas patógenas de humanos de *B. cereus* de vivir en la filosfera de plantas como lo haría una cepa de origen ambiental, usando para ello la formación de biopelículas, la esporulación o una combinación de ambas estrategias. Si bien, las hojas de las plantas ensayadas no entrarían en la cadena alimenticia del hombre, si representarían un reservorio importante desde donde podrían pasar a los frutos que se consumen.

Posteriormente, se estudiarán los genes de estas cepas implicados en la formación de biopelículas y en la colonización de la planta, para ello se identificarán bacterias marcadas con una proteína fluorescente en la planta y se hará RNA-seq tanto de las bacterias encontradas como de la planta para poder saber que genes está expresando la bacteria al interactuar con la planta y cuales está expresando esta al ser colonizada por la bacteria.

Proyecto financiado por European Research Council-Starting Grant-2014 (8.06 UE/60.8003).



Implicación de la matriz extracelular de biofilms de *Bacillus subtilis* en la interacción beneficiosa con la planta.

Elena Pedrero Vega

Trabajo dirigido por Diego Romero Hinojosa. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias.

Alumna de Doctorado.

Los biofilms bacterianos están constituidos por comunidades de células unidas entre sí por una matriz extracelular polimérica. Los componentes de la matriz extracelular pueden variar dependiendo de la cepa bacteriana, pero en general se puede decir que está constituida por proteínas, exopolisacáridos y/o ácidos nucleicos. La matriz extracelular es un tejido multifuncional que contribuye a: la arquitectura final del biofilm, la regulación del flujo de nutrientes y gases dentro del biofilm, la interacción con las superficies, y la protección de las células frente a agentes tóxicos externos. Aunque son numerosos los estudios que se han centrado en el papel de la matriz en la virulencia de bacterias patógenas de humanos, este tejido polimérico puede ser igualmente importante en la interacción beneficiosa de un agente de biocontrol con la planta.

Tanto para el desarrollo de la actividad de biocontrol como para la promoción del crecimiento radicular es necesaria la colonización y persistencia del microorganismo sobre la superficie de la planta, y la pregunta es hasta qué punto es importante la formación de biofilms. En este estudio trabajamos con cepas de *Bacillus* como agentes de control biológico (BCA) frente a enfermedades de cucurbitáceas y a su vez promotoras del crecimiento radicular (PGPR por sus siglas en inglés *plant growth promoting rhizobacteria*). Valiéndonos de una batería de mutantes en distintos elementos estructurales y funcionales de la matriz extracelular, estudiamos los patrones de colonización y persistencia de estas cepas en filosfera y rizosfera y evaluamos su efecto sobre la actividad PGPR. Las diferencias observadas entre algunos mutantes de matriz en cuanto a la dinámica de población y la distribución espacial en los dos nichos de estudio, así como en su actividad PGPR, apuntan a su relevancia en la ecología y funcionalidad de estos agentes de biocontrol.

Además de definir la implicación real de elementos bacterianos ya conocidos como los del biofilm, también se pretenderá identificar nuevos genes potencialmente implicados en el proceso de comunicación bacteria-planta. Para llevar a cabo este estudio se pretende hacer uso de la técnica de secuenciación masiva RNAseq. Una vez identificados genes, se pueden llevar a cabo estudios de expresión *in vitro* e incluso *in situ* usando diferentes herramientas de biología molecular así como estudios de mutagénesis para confirmar la funcionalidad de estos genes.

Proyecto financiado por un programa European Research Council-Starting Grant-2014 (8.06 UE/60.8003) así como de un contrato con la empresa holandesa Koppert B. V. , Research and development agreement (8.06/60.4086).



Estudio mecanístico y funcional de las fibras amiloides presentes en la matriz extracelular de *Bacillus subtilis*.

Jesús Cámara Almirón

Trabajo dirigido por Diego Romero Hinojosa. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias.

Alumno de Doctorado

Las proteínas amiloides son un grupo heterogéneo de proteínas diferentes en secuencia aminoacídica, pero similares en su estructura cuaternaria: fibras enriquecidas en láminas beta, con gran estabilidad, resistencia y capacidad de unión de colorantes específicos, como el rojo congo o la thioflavina T. Estas proteínas han estado tradicionalmente asociadas a patologías neurodegenerativas en humanos como el Alzheimer o el Parkinson. Sin embargo, los miembros dentro de esta familia están ampliamente distribuidas en la naturaleza, desde bacterias hasta humanos, e intervienen en un amplio rango de funciones biológicas, motivo por el que se han denominado “amiloides funcionales”, para diferenciarlas de las variantes patogénicas. En bacterias, los amiloides funcionales son responsables de participar en funciones muy diversas como la interacción célula-célula (bacteriana o del hospedador), con superficies abióticas, y formación de comunidades bacterianas llamadas biofilms. En *Bacillus subtilis*, la proteína tipo amiloide TasA y la proteína auxiliar TapA están implicadas directamente en la formación de fibras amiloides que actúan como un andamiaje proteico donde se disponen el resto de componentes de la matriz extracelular del biofilm de esta especie bacteriana.

En este trabajo se pretende abordar desde un punto de vista multidisciplinar, el estudio de la formación, estructura y función de las fibras amiloides de *Bacillus subtilis* con la idea de definir el mecanismo molecular de fibrilación y entender mejor su implicación en la ecología y fisiología de *Bacillus*.

Los resultados obtenidos hasta la fecha han demostrado la existencia de pequeñas secuencias dentro de las proteínas TasA o TapA con capacidad para polimerizar en la forma de fibras, lo que sugiere su importancia en el proceso de fibrilación y en la funcionalidad de ambas proteínas. En próximos experimentos, nos centraremos en estudiar la posible naturaleza amiloide de estas regiones y su función, así como la caracterización adicional tanto de TasA como de TapA mediante técnicas de mutagénesis al azar y mutagénesis dirigida, y en la interacción TasA-TapA basándonos en estudios de microscopía, interacción proteína-proteína y diversas técnicas biofísicas.

Proyecto financiado por la Unión Europea (European Research Council – Starting Grant 8.06 UE/60.8003)



Asociación de marcadores moleculares a caracteres de interés en aguacate y chirimoyo.

Alicia Talavera Júdez

Trabajo dirigido por Iñaki Hormaza y Antonio Matas. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM-UMA-CSIC).

Alumna de Doctorado

Los frutales subtropicales son fundamentales para la alimentación humana en muchos países y su importancia comercial está aumentando exponencialmente a nivel mundial. La situación de España como único país europeo con una producción comercial significativa de frutas subtropicales nos coloca en una posición de liderazgo a nivel internacional en el estudio de estas especies, en las que los avances científicos van muy por detrás de los conseguidos en otros cultivos al ser especies cultivadas fundamentalmente en países con pocos recursos dedicados a la investigación y que solo recientemente han comenzado a tener importancia en países desarrollados. El objetivo principal de esta tesis es asociar marcadores moleculares a caracteres de interés en aguacate (*Persea americana* Mill.) y chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) para acelerar los procesos de selección de nuevas variedades y portainjertos. Como un primer paso para poder llevar a cabo este objetivo, se han establecido 196 caracteres para el fenotipado del aguacate y 201 caracteres para el fenotipado del chirimoyo. Dichos caracteres constituirán la ontología de cada especie que se pondrá a disposición de la comunidad investigadora a través de una base de datos pública para frutales subtropicales con esquema GMOD/Chado. Para llevar a cabo el desarrollo de los marcadores moleculares que se asociarán a los caracteres de la ontología se ha extraído DNA de alto peso molecular de 99 variedades de aguacate de dos colecciones de germoplasma conservadas en ambientes distintos, una en Sudáfrica y otra en España, y que comparten algunas variedades comunes. Actualmente se está llevando a cabo su secuenciación en el centro de genómica y biología computacional de la Universidad de Duke (EE.UU.). Una vez se disponga de los resultados de dicha secuenciación se llevará a cabo su análisis y asociación a caracteres de interés. En el caso del chirimoyo, especie de la que la información de secuencias genéticas en bases de datos es muy escasa, se ha extraído DNA de alto peso molecular de la variedad Fino de Jete y de dos poblaciones F2 junto a sus parentales, y RNA de distintos tejidos de Fino de Jete (hoja (yema, hoja joven, hoja madura), tépalos, estigma (prehembra, hembra, macho), ovario (prehembra y hembra), óvulo (5, 10, 20 días después de la polinización) y fruto maduro (mesocarpo) de Fino de jete (*Annona cherimola* Mill.)). A partir de ese DNA se secuenciará el genoma de chirimoyo utilizando técnicas de secuenciación de alto rendimiento; igualmente se secuenciará el RNA extraído. Además de la importancia que tienen ambas especies por su interés agronómico, tanto el aguacate como el chirimoyo se encuentran situados en el clado Magnoliid de las angiospermas basales por lo que los resultados obtenidos tienen también implicaciones más básicas para entender la evolución de las plantas de flor.



Desarrollo y evaluación de una vacuna ADN frente al virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV).

Rocío de las Mercedes Leiva Rebollo

Trabajo dirigido por M^a Dolores Castro López y Alejandro Manuel Labella Vera. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias.

Alumna de Doctorado

El virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV), perteneciente al género *Lymphocystivirus* (familia *Iridoviridae*), es el agente etiológico de la enfermedad de linfocistis (LCD), principal patología viral descrita en dorada (*Sparus aurata*), y que afecta también al lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). La enfermedad suele presentar una elevada morbilidad en las piscifactorías, ocasionando graves pérdidas económicas en el sector de la acuicultura.

En la actualidad, la única medida adecuada para la prevención de la LCD en las instalaciones de acuicultura es el uso de prácticas higiénico-sanitarias generales, que eviten la introducción del virus en el sistema de producción. Sin embargo, la utilidad de tales medidas es limitada dada la alta prevalencia de infecciones subclínicas, lo que hace recomendable la utilización de métodos profilácticos específicos como la vacunación.

El objetivo fundamental que se plantea en el presente proyecto es establecer medidas de prevención de las infecciones producidas por el LCDV en los cultivos de dorada y lenguado mediante la utilización de una vacuna ADN.

El desarrollo de medidas profilácticas anti-víricas debe basarse en el conocimiento de la respuesta inmune del hospedador frente a la infección. Por ello, se estudiará la interacción virus-hospedador en el curso de la infección por LCDV, mediante cuantificación de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune del hospedador, así como de genes víricos con capacidad de modular dicha respuesta inmune. La expresión temporal de los genes víricos y del hospedador seleccionados se realizará mediante PCR a tiempo real.

Posteriormente, se desarrollará una vacuna ADN frente al LCDV, utilizándose el gen que codifica la proteína principal de la cápside (MCP) para la construcción del plásmido vacunal. La vacunación se realizará mediante inyección intramuscular y/o administración oral tras microencapsulación del plásmido vacunal, analizándose la distribución y expresión de la vacuna en los peces. La eficacia de la vacunación se evaluará tanto en términos de inducción del sistema inmune, como mediante la determinación de la protección conferida frente a infecciones experimentales.



Sesión II

**La familia de factores de transcripción DOF en *Populus trichocarpa*.
Identificación del ortólogo de PpDof5 en chopo.**

Luisa María Henao Mejía

Trabajo dirigido por Concepción Ávila. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias

Alumna de Máster

A lo largo de su ciclo de vida, los organismos eucarióticos como las plantas, han desarrollado diferentes mecanismos de control de la expresión génica que varían a lo largo de su ciclo de vida y para dar respuesta a los cambios al entorno del que forman parte. El control transcripcional es uno de los mecanismos más importantes para regular la expresión génica. Este control es llevado a cabo por la interacción de factores de transcripción (TFs), que actúan en *trans* con los elementos *cis* (CREs: Cis-Regulatory Elements), que son secuencias de DNA localizadas en la periferia de los genes diana. Una de las familias de TFs específica de plantas, es la familia DOF (*DNA-binding One Zinc Finger*). Estos factores están implicados en la regulación de la expresión génica de procesos como la asimilación del carbono fotosintético, señalización mediada por fitocromos, respuesta a hormonas, maduración y germinación de la semilla, floración o la eficiencia de fotosíntesis y asimilación de amonio (Rueda-López *et al.*, 2008). En este trabajo se propone utilizar como modelo experimental la especie *Populus trichocarpa* (Pt) cuyo genoma ha sido secuenciado y de la que se dispone de múltiples herramientas. Así utilizando toda la información disponible nos proponemos analizar la estructura y composición de la familia de factores de transcripción DOF de Pt, caracterizar el posible ortólogo de PpDof5 de pino y evaluar sus niveles de expresión en plantas control y transgénicas que sobreexpresan éste factor de transcripción.



Nitrogen flux in plants: uptake from the megagametophyte to the nascent embryo.

José Alberto Urbano Gámez

Trabajo dirigido por Francisco M. Cánovas Ramos. Dept. of Molecular Biology and Biochemistry. Sciences Faculty. University of Málaga.

Alumno de Máster

Nitrogen is one of the main elements in all organisms, so its metabolism and homeostasis study are the objective of many projects. During maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) seed germination, the main source of carbon and nitrogen of the seedling growth is the megagametophyte. Storage proteins present in this tissue are extremely rich in the amino acid arginine and during protein hydrolysis a huge amount of this amino acid is released, which is transported without modifications inside the germinating embryo (Todd CD *et al*, 2001).

Once inside the cells, arginine is catabolized by the catalytic action of the enzyme arginase, releasing nitrogen and making it available for the embryo. The aim of this project is to study the molecular basis of how arginine is transported to the germinating embryo. A previous search in the maritime pine transcriptome database (SustainPineDB Canales *et al*, 2014) allowed us to identify two genes coding for potential arginine transporters. This project will study the expression of these genes during pine germination.

This is a summary of the progress made and the expected work:

- Cloning of the full length cDNA from maritime pine.
- Functional expression in yeast.
- Expression studies during maritime pine germination.
- Identification of promoter region involved in gene regulation.

Financed by BIO2015-69285-R and BIO-474



Sesión III

Isoenzimas de glutaminasa y cáncer.

Soukania Boutriq

Trabajo dirigido por José Manuel Matés Sánchez. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Tutor: Miguel Ángel Medina Torres. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias.

Alumna de Máster

Aunque las rutas metabólicas activadas y/o reprimidas en los tumores dependen tanto del genotipo como del tejido de origen, e incluso de la heterogeneidad dentro del tumor, las células cancerígenas tienen un perfil metabólico muy diferente comparado con las células normales. Por todo ello, la reprogramación metabólica de las células tumorales se ha establecido como una de las estrategias más específicas y prometedoras en la lucha contra la proliferación del tumor. La glutaminasa (GA) juega un papel esencial en el metabolismo del cáncer y sus dos familias isoenzimáticas, GLS y GLS2, desempeñan papeles opuestos asociando su función a vías oncogénicas y supresoras tumorales, respectivamente. Este trabajo pretende profundizar en la importancia del silenciamiento génico de GLS y/o la sobre-expresión de GLS2 en células tumorales. Mientras que la isoenzima GLS se considera como diana del oncogen C-Myc, el supresor tumoral p53 aumenta la expresión de GLS2. De hecho, se ha comprobado que tanto GLS como GLS2 son dianas terapéuticas antitumorales. Mediante el empleo de cultivos celulares y el uso de líneas tumorales con edición génica de la glutaminasa se caracterizará la incidencia de la alteración de la expresión de esta enzima en la malignidad de las líneas, cuantificada en base a los niveles de expresión de proteínas específicas validadas como biomarcadores del cáncer. Para realizar el trabajo se ha elegido la línea celular LN229, ya que estas células cuando tienen acceso a una mezcla fisiológica de nutrientes utilizan la glutamina como precursor anaplerótico, además, no expresan cantidades apreciables de las isoformas LGA o GAB de glutaminasa por lo cual aumenta la probabilidad de reducir el crecimiento celular basándose en la isoenzima GLS. Con el fin de probar cómo la expresión de isoenzimas GLS es esencial para la regulación miRNAs en células de glioma, se ha expresado un shRNA en células LN229 para silenciar la expresión de GLS. Luego se ha realizado la extracción de RNA total con trizol y posteriormente utilizando un kit se separarán los miRNAs. Finalmente se realizarán PCR de tiempo real para cuantificar los miRNA de las células LN229 silvestres y de las que tienen silenciada la GLS para ver cuáles son los miRNAs expresados diferencialmente y, por tanto, implicados en la regulación oncogénica GLS-dependiente. Por otro lado, se ha llevado a cabo la transfección estable de células de glioma T98G con un vector que lleva la secuencia de GAB humana para determinar el papel de la sobreexpresión de GLS2, que se relaciona con la ruta de p53 y la función antioxidante, en la expresión de miRNAs en las células de glioma. Además, se realizará un análisis por Western blot para ver cómo varía la expresión de algunas proteínas pro- o antiapoptóticas (Bid y Bcl2) entre las células T98G silvestres y las que tienen GLS2 sobreexpresada.

Anso et al. Cancer Metab. 2013; 1:7.

DeBerardinis. Cancer Metab. 2014; 2:5.

Hensley et al. Cell. 2016; 164:681-94.

Herranz et al. Nature Med. 2015; 21:1182-9.

Li et al., World J Surg Oncol. 2016;14:15.

Financiación: SAF2015-64501-R



Determinación del perfil mutacional en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) utilizando secuenciación dirigida.

Alfonso Alba Bernal

Trabajo dirigido por Emilio Alba Conejo¹; codirectora: Martina Álvarez Pérez²; tutora: Francisca M^a Sánchez Jiménez³. ¹Depto de Oncología Traslacional. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA). Hospital Regional Universitario y Virgen de la Victoria. ²Depto de Histología y Anatomía Patológica. Área de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga. ³Depto de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.

Alumno de Máster

El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) es el subtipo de cáncer de pulmón con mayor incidencia, abarcando un 85% de los casos diagnosticados. Dentro de este subtipo se pueden diferenciar a su vez: adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma de células grandes. Numerosos estudios han demostrado la relevancia de numerosos genes en la aparición y progreso de esta enfermedad. Genes tales como *NRAS*, *KRAS*, *MET* y *BRAF* son algunos de los involucrados. La determinación de las mutaciones en estos genes permite relacionar fenotipos existentes en los pacientes con el genotipo obtenido. Gracias a la NGS (Next Generation Sequencing) es posible identificar dichas mutaciones en estos genes de manera más rentable y eficiente. La hipótesis de partida del estudio se basa en que los secuenciadores de última generación permiten la detección de todas las posibles mutaciones genéticas en cáncer de pulmón en una sola plataforma, lo cual supone un ahorro de tiempo, de material tumoral y de recursos económicos. El análisis más rentable y fácil de interpretar es la secuenciación dirigida a paneles de un conjunto determinado de mutaciones genéticas seleccionados en base a su relevancia.

Por otra parte, los objetivos principales de este Trabajo Fin de Máster es, en primer lugar, correlacionar un panel de mutaciones de 15 genes en CPNM (*AKT1*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXL2*, *GNA11*, *GNAQ*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RET*, *TP53*), analizadas en biopsia sólida del tumor. Y, en segundo lugar, relacionar el estado mutacional de los 15 genes estudiados con otras características clínicas de los pacientes.

En este estudio se incluirán pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, en estadios III y IV y que no hayan sido tratados con ningún tratamiento antineoplásico. El tejido estará incluido en parafina por lo que será necesario un paso previo de desparafinización. Para la extracción de DNA se utilizará un Kit específico de NGS para muestras incluidas en parafina y seguirán el proceso de secuenciación aquellas muestras que pasen los controles de calidad. Se procederá a la construcción de librerías mediante la química de Illumina® específica para este tipo de tejido y se secuenciarán con la plataforma MiSeq®. Una vez obtenido los datos se realizará un test de Fisher para el análisis estadístico.

Por tanto, esto nos permitirá identificar perfiles mutacionales relacionadas con esta enfermedad, que en un futuro nos podrán ayudar a predecir el tipo de respuesta al tratamiento, potencial uso clínico para el diagnóstico, selección de tratamiento y desarrollo de fármacos.



Desarrollo de herramientas bioinformáticas para el análisis de enfermedades de origen genético en humanos.

Elena Rojano Rivera

Trabajo dirigido por James R. Perkins y Juan A. García Ranea. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica.

Alumna de Doctorado

Numerosas enfermedades que afectan al ser humano son consecuencia de las modificaciones del código genético del propio individuo. Gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación, numerosos proyectos han podido analizar el genoma humano [1], siendo de especial interés para el desarrollo de este trabajo el estudio de las enfermedades cuyas bases están en mutaciones localizadas en elementos no codificantes, así como aquellas causadas por variaciones en el número de copias (del inglés *Copy Number Variation*, CNV) en zonas codificantes. En primer lugar, en el marco de desarrollo de esta tesis doctoral, hemos creado una herramienta de anotación de regiones no codificantes del genoma denominada AnNCR-SNP (del inglés *Annotation of Non-Coding Regions SNP*) que es capaz de caracterizar tanto variantes como elementos funcionales en regiones no codificantes del genoma. Esta herramienta ha sido empleada para el análisis de variantes en regiones flanqueantes de genes que codifican para los receptores de histamina (*HRH1-HRH4*) [2]. En segundo lugar, estamos desarrollando algoritmos de predicción de enfermedades y fenotipos patológicos basados en CNV, integrando y comparando de forma sistémica datos clínicos y genéticos heterogéneos utilizando para ello la información depositada en DECIPHER, base de datos con información sobre el fenotipos de pacientes asociados a regiones específicas [3]. Con ello, pretendemos poder establecer qué genes (u otros elementos) son los posibles causantes de la enfermedad a través de la construcción de herramientas para determinar el efecto de las mutaciones en el individuo o, en caso de conocer el fenotipo, que región génica puede tener alterada con mayor probabilidad. Finalmente, se pretende favorecer el uso de las herramientas propuestas mediante la habilitación de un portal web que ponga a disposición del público estas herramientas a través de la red.

[1] Alexander RP. et al. (2010). *Annotating non-coding regions of the genome. Nat Rev Genet*; 11:559–71.

[2] Rojano E. et al. (2016, accepted). *Characterisation of non-coding genetic variation in histamine receptors using AnNCR-SNP. Amino Acids.*

[3] Bragin E. et al (2014). *DECIPHER: Database for the interpretation of phenotype-linked plausibly pathogenic sequence and copy-number variation. Nuc Ac Res*, 42.

Este trabajo está siendo financiado por la Comisión Europea, EU-FP7-Systems Microscopy Network of Excellence [258068] y por los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER), Ministerio de Economía y Competitividad y Junta de Andalucía (SAF2012-33110 y CTS-486).



Estudios de metabolismo en el "microambiente angiogénico" como potencial diana para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades dependientes de angiogénesis.

M^a Carmen Ocaña Farfán

Trabajo dirigido por Miguel Ángel Medina Torres. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.

Alumna de Doctorado

Introducción: El "redescubrimiento" del efecto Warburg a principios de este siglo XXI y de la elevada glutaminólisis tumoral han contribuido a que el metabolismo vuelva a estar "de moda" en Oncología. Además, estudios recientes han dado importancia al metabolismo de células endoteliales, siendo interesante pues indagar más en el metabolismo de este tipo celular así como de otras células de su microentorno (células tumorales e inflamatorias, entre otras). El mismo puede convertirse en diana con un gran potencial terapéutico para el tratamiento de la angiogénesis patológica. En esta Tesis se pretende estudiar las relaciones que pudieran existir entre metabolismo y angiogénesis en el "microambiente angiogénico". Es posible que algunos compuestos anti-angiogénicos fuesen a su vez moduladores del metabolismo y a la inversa. También podría suceder que compuestos anti-angiogénicos tuviesen un efecto sobre la inflamación, como hemos descrito previamente con alguno de ellos. Además, combinaciones sinérgicas de fármacos capaces de inhibir la angiogénesis y de modular el metabolismo podrían dar lugar a un mayor potencial terapéutico.

Hipótesis: 1) Aminoácidos como la glutamina y lípidos como los ácidos grasos son importantes sustratos metabólicos alternativos a la glucosa en el microentorno angiogénico. 2) Los inhibidores de la angiogénesis y de dianas metabólicas tienen interés farmacológico en la terapia del cáncer y otras enfermedades dependientes de angiogénesis.

Objetivos: 1) Contribuir al conocimiento del metabolismo lipídico y nitrogenado en células endoteliales y otros tipos celulares presentes en los "microambientes angiogénicos". 2) Valorar en células presentes en los "microambientes angiogénicos" los efectos de compuestos moduladores de la angiogénesis, la inflamación y el metabolismo y buscar combinaciones sinérgicas de fármacos anti-angiogénicos y moduladores del metabolismo.

Metodología y plan de trabajo: Para el estudio del metabolismo en el "microambiente angiogénico" se realizarán estudios sobre los niveles de expresión y de proteínas, así como actividades enzimáticas y puntos de control metabólico conocidos, además de ensayos de metabolismo energético para medir consumo y producción de distintos metabolitos mediante diferentes aproximaciones metodológicas. Esto se aplica también al estudio de la posible modulación del metabolismo por parte de compuestos anti-angiogénicos. Por otra parte, los estudios sobre angiogénesis incluirán la batería de ensayos de angiogénesis *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* disponibles en el grupo, y el estudio sobre la inflamación consistirá en estudios de expresión y niveles de proteínas, ELISA y *arrays* de citoquinas.

Financiación: Proyectos BIO2014-56092-R (MINECO y FEDER) y P12-CTS-1507 (Junta de Andalucía y FEDER).



Sesión IVa

Neurogénesis hipotalámica adulta en un modelo animal de adicción a cocaína.

Patricia Chaves Peña

Trabajo dirigido por Margarita Pérez Martín. Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología (Área de Fisiología). Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Tutora: Dra. M^a Ángeles Real Avilés.

Alumna de Máster

Inicialmente, las investigaciones sobre neurogénesis adulta centraron su atención en estudiar este proceso en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales en el cerebro adulto de roedores. Sin embargo, en los últimos años ha habido crecientes evidencias de que la neurogénesis, aunque en menor medida, también ocurre en otras áreas como el hipotálamo (Kokoeva *et al.*, 2007), región clave en el control homeostático de los procesos fisiológicos del organismo. La neurogénesis es un proceso dinámico modulado por múltiples factores, pudiendo estos ser diferentes dependiendo de la zona neurogénica. Se conoce el efecto negativo que la administración crónica de drogas, como la cocaína, tiene sobre la neurogénesis hipocampal adulta, sin embargo, se desconoce si ejerce alguna influencia sobre el hipotálamo.

La **hipótesis** del presente trabajo es que la administración crónica de cocaína altera la capacidad neurogénica del hipotálamo. El **objetivo** principal plantea estudiar la proliferación y supervivencia de las nuevas neuronas y su localización en los diferentes núcleos hipotalámicos.

Para identificar las nuevas células se empleó el uso combinado de los marcadores de proliferación celular CldU (5-cloro-2'-deoxiuridina) y IdU (5-yodo-2'-deoxiuridina) y para el tratamiento con cocaína se administraron dos dosis diarias durante cinco días, dividiendo los animales en dos grupos experimentales. Las nuevas células se identificaron mediante técnicas inmunohistoquímicas, empleando anticuerpos contra los dos marcadores de proliferación, CldU y IdU, y combinándolos con distintos marcadores para determinar su naturaleza celular (β III-tubulina para neuronas y GFAP para astrocitos). Para el estudio de la proliferación celular se empleó el anticuerpo contra la proteína fosfohistona H3.

Resultados preliminares de este trabajo indican que la cocaína sí que parece modular la neurogénesis en el hipotálamo de ratones adultos, ya que se observa un mayor número de nuevas células tras el tratamiento. Estos resultados indican un efecto de la cocaína sobre la supervivencia de las nuevas células, siendo interesante determinar la caracterización y distribución de las nuevas neuronas en los distintos núcleos hipotalámicos.

Kokoeva M.V., Yin H., Flier J.S. Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. The Journal of Comparative Neurology, 2007; 505(2): 209-20.

Financiación: PSI2013-44901-P.; Proyecto de Excelencia SEJ-1863.



Efecto de la eliminación del epitelio endimario de los ventrículos laterales en la neurogénesis de ratón adulto.

Laura Trigueros López

Trabajo dirigido por Margarita Pérez Martín. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias. Tutora: M^a Ángeles Real Avilés

Alumna de Máster

En el cerebro adulto de mamíferos se distinguen dos nichos neurogénicos fundamentales: el giro dentado del hipocampo y la zona subventricular de los ventrículos laterales, donde se producen nuevas neuronas de forma continua a lo largo de la vida del animal. El epitelio endimario juega un papel clave en la neurogénesis ventricular adulta de roedores. Las células endimarias son responsables de la producción y liberación de factores que condicionan que las nuevas células producidas en la zona subventricular se diferencien en neuronas y migren de forma adecuada a su destino final, el bulbo olfatorio, donde se integran en circuitos neuronales responsables del procesamiento de la memoria olfativa. Estudios anteriores llevados a cabo en rata han demostrado que tras la eliminación de los residuos de ácido siálico terminal de la membrana celular de las células endimarias, por acción de la sialidasa neuraminidasa, se altera la superficie ventricular y se producen alteraciones en la migración de las neuronas recién producidas. Sin embargo, se desconoce si esta alteración tiene alguna repercusión en la memoria olfativa.

La hipótesis de trabajo que se plantea en este TFM propone que una alteración de la superficie ventricular provoca modificaciones en la incorporación de nuevas neuronas al bulbo olfatorio, y por tanto un déficit en el procesamiento de la memoria olfativa. Para llevar a cabo esta hipótesis se plantea como objetivo principal caracterizar, mediante técnicas histológicas e inmunocitoquímicas, la superficie ventricular antes y después del tratamiento con neuraminidasa así como la incorporación de nuevas neuronas al bulbo olfatorio. Para estudiar la superficie ventricular se emplearán las lectinas LFA y PNA y los anticuerpos anti-vimentina, anti-GFAP, anti-PS100 y mediante doble marcaje por inmunofluorescencia, usando el marcador de proliferación celular BrdU y el marcador neuronal NeuN, se identificarán las nuevas neuronas. Con el fin de mejorar la caracterización del modelo animal se realizarán distintos test de comportamiento: test de campo abierto (open field) y test de anhedonia, para medir el nivel de ansiedad, y test de discriminación de olores, para valorar la memoria olfativa. El estudio se llevará a cabo en ratones macho de 2 meses de edad de la cepa C57BL/6J.

El estudio de la neurogénesis adulta ha arrojado una perspectiva totalmente nueva de la plasticidad cerebral, por lo que entender los mecanismos responsables de la producción de nuevas neuronas en adulto es esencial para la creación de terapias dirigidas a la reestructuración y recuperación cerebral consecuencia de trastornos o lesiones mentales.

Financiación: Proyecto de Excelencia P-11-CVI-07637.



Efecto de la activación del receptor dopaminérgico D₄ sobre la neurogénesis adulta en la zona subventricular inhibida por morfina.

M^a Luisa Montiel Pedraza

Trabajo dirigido por M^a Ángeles Real Avilés y Alicia Rivera Ramírez. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología Animal (Área de Biología Celular). Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

Alumna de Máster

La neurogénesis es un proceso dinámico de formación de nuevas neuronas durante el desarrollo del cerebro. Este proceso se mantiene a lo largo de toda la vida adulta en dos regiones cerebrales, la zona subventricular (ZSV), que está delimitando los ventrículos, y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado en el hipocampo. Se ha comprobado que la formación de nuevas neuronas queda inhibida tras la administración de ciertas drogas de abuso, como la cocaína y la morfina (Eisch, A.J. et al., 2000; Castilla-Ortega, E. et al., 2016).

La morfina es un potente analgésico cuyo uso está restringido ya que produce adicción severa. Ejerce su acción analgésica y adictiva mediante su unión a receptores acoplados a proteínas G_{o/i} y principalmente a los receptores μ opioides (MOR). El consumo prolongado de morfina induce cambios celulares y moleculares en las neuronas y sus conexiones en el sistema nervioso central. Estos cambios son muy estables y persisten incluso después de largos periodos de abstinencia. La morfina, como otras drogas de abuso, produce un aumento de liberación de dopamina en el núcleo accumbens y el caudado putamen (CPu), produciendo un efecto placentero que incentiva la repetición del consumo y el establecimiento de hábitos de consumo. En nuestro grupo se ha demostrado que la activación del receptor dopaminérgico D₄ (D₄R) evita los cambios celulares y moleculares inducidos por morfina, bloqueando los efectos adictivos pero no los analgésicos (Gago et al., 2007; 2011; 2013; Suárez Boomgaard et al., 2014; Rivera et al., 2016). Se ha propuesto que la forma en la que D₄R contrarresta los efectos de la morfina es por la formación de heterodímeros D₄R/MOR (Rivera et al., 2016).

La hipótesis de este trabajo es estudiar si la activación de los receptores dopaminérgicos D₄ previene la inhibición de la neurogénesis adulta inducida por un tratamiento continuado con morfina.

Los objetivos de este trabajo son: 1) analizar la localización de los receptores D₄R y MOR en la región subventricular (ZSV) de rata y si ambos receptores colocalizan; 2) estudiar los posibles cambios en la expresión de los receptores D₄R y MOR inducidos por morfina y el resultado de la coestimulación con agonista de D₄R; 3) analizar el efecto de la estimulación de D₄R sobre la inhibición de la proliferación en ZSV por el tratamiento continuo con morfina.

Los estudios se llevaran a cabo con marcajes inmunohistoquímicos y técnicas de análisis de imagen. Además, para el estudio de la proliferación celular se realizarán inyecciones de BrdU.



Estudio de la interacción de los receptores D₄R-MOR en la sustancia negra reticular.

Alejandro Trujillano Fernández

Trabajo dirigido por Alicia Rivera Ramírez y M^a Ángeles Real Avilés. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología Animal. (Área de Biología Celular). Universidad de Málaga

Alumno de Máster

La morfina es una de las sustancias más utilizadas para el tratamiento del dolor agudo y crónico debido a su potente efecto analgésico. Sin embargo, el uso abusivo de la morfina como paliativo del dolor supone un problema clínico, ya que una administración prolongada de esta sustancia provoca cambios neuronales y el desarrollo de tolerancia a la analgesia y adicción.

Al igual que otras drogas de abuso, la morfina activa las vías dopaminérgicas mesolímbica y nigroestriatal. La vía mesolímbica o circuito de recompensa es la responsable de la sensación placentera que incentiva el consumo. La vía nigroestriatal es responsable del aprendizaje y la adquisición de hábitos relacionados con la adicción. En el caudado putamen (CPu), la morfina produce estos efectos mediante la unión a receptores μ -opioides (MOR) en las interneuronas GABA de la sustancia negra reticular (SNr). Esta interacción provoca el cese de la inhibición tónica ejercida sobre las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (SNc) y un aumento de la tasa de disparo de dopamina que da lugar a un incremento de la concentración de dopamina en el CPu. También se ha descrito una interacción ligando-receptor en los estriomas, dando lugar a una alteración de las neuronas GABAérgicas que proyectan desde los estriomas hasta las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Cui *et al.*, 2014).

Los estudios previos del grupo de investigación han demostrado una interacción antagónica de los receptores de dopamina D₄ (D₄R) y MOR en el estriado dorsal, ya que la administración de un agonista de D₄R durante el tratamiento agudo y crónico de morfina bloquea la neuroadaptación inducida por morfina a nivel molecular, celular y de comportamiento, pero sin afectar a las propiedades analgésicas de la misma (Gago *et al.*, 2011). Se ha propuesto un modelo de interacción entre D₄R y MOR por formación de heterodímeros en los estriomas, donde ambos receptores colocalizan (Rivera *et al.*, 2002). Se ha postulado como otro posible sitio de interacción D₄R-MOR, en base a estudios en los que se ha detectado inmunomarcaje de ambos receptores, la SNr (Rivera *et al.*, 2003) (Ostrowki y Pert, 1995). Sin embargo, todavía no se conoce en profundidad la distribución de estos receptores en dicha región.

El primer objetivo de este trabajo es determinar la distribución de los receptores D₄R y MOR en SNr mediante estudios de dobles marcajes inmunohistoquímicos. En segundo lugar se estudiarán mediante técnicas inmunohistoquímicas y análisis de imagen los cambios de expresión de D₄R y MOR en tratamientos agudos y crónicos de morfina y cómo afecta a esta expresión la estimulación de D₄R. Por último se estudiará la activación de la vía nigroestriada al estimular de manera específica D₄R y MOR en la SNr.



Sesión IVb

Estudio ultraestructural del proceso neuropatológico en el hipocampo de un modelo transgénico para Tau de la enfermedad de Alzheimer.

Cristina Goebel Vázquez

Trabajo dirigido por José Carlos Dávila Cansino. Depto. Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias.

Alumna de Máster

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia en personas de edad avanzada, y se manifiesta clínicamente por deterioro cognitivo y trastornos conductuales, que cursan de forma progresiva e irreversible. Desde el punto de vista histopatológico, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por acumulación masiva de dos tipos de agregados proteicos, los denominados ovillos neurofibrilares (NFT) intracelulares, formados por la proteína tau, y las placas seniles extracelulares, formadas por el péptido β -amiloide. Tau es una proteína asociada a microtúbulos que desempeña un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura y función de la neurona. En la enfermedad de Alzheimer, y en otras taupatías, tau se fosforila de forma anormal, disociándose de los microtúbulos y agregándose de forma progresiva formando los denominados filamentos apareados helicoidales (PHF) y los ovillos neurofibrilares (NFT). La desorganización de los microtúbulos altera el transporte axonal, ocasionando fallos en éste y provocando pérdida sináptica, generación de neuritas distróficas y finalmente la muerte neuronal.

La hipótesis de trabajo es que la acumulación progresiva de agregados intracelulares de fosfo-tau (PHF/NFT) provoca cambios degenerativos en las neuronas, provocando su muerte, a medida que avanza la enfermedad. El objetivo principal de esta Tesina de Máster será analizar los cambios neurodegenerativos asociados con la agregación de la proteína tau en el hipocampo, una de las primeras regiones afectadas en la enfermedad de Alzheimer.

Para llevar a cabo este estudio se empleará un modelo transgénico murino (Thy-Tau22) que expresa la forma humana mutada de tau (4R) en los sitios G272V y P301S. Se analizará principalmente la región CA1 del hipocampo, ya que datos previos del grupo señalan a esta región como la más afectada por la patología de tau desde edades tempranas. Se analizarán los cambios a nivel celular usando técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión (MET) y técnicas de inmunomarcado con oro para microscopía electrónica (i-MET). El estudio se llevará a cabo a diferentes edades (entre 2 y 18 meses) tanto en animales transgénicos como en animales control sin el transgen.

Los datos obtenidos hasta el momento, mediante la MET, indican que, al menos desde los 6 meses hay formación de PHFs/NFTs en las neuronas de la capa piramidal del CA1, y parecen aumentar moderadamente a medida que avanza la edad hasta los 18 meses. Por otro lado, y gracias a las técnicas de i-MET, hemos podido observar la presencia de tau fosforilado soluble, tanto citosólico como extracelular, así como formando parte de los agregados intracelulares (PHFs/NFTs) desde los 6 meses de edad.

Actualmente estamos analizando la posible pérdida neuronal, asociada con la edad, en el hipocampo de este modelo transgénico, que podría ser una consecuencia directa de la formación de los PHFs/NFTs intracelulares.

Financiado por FIS-PI15/00796 y CIBERNED



Modulación de la respuesta inflamatoria en un modelo transgénico APP/PS1 de la enfermedad de Alzheimer: efecto sobre la patología cerebral.

Rubén Gómez Gutiérrez

Trabajo dirigido por José Carlos Dávila Cansino y Raquel María Sánchez Varo. Depto. Biología Celular, Genética y Fisiología. Área de Biología Celular. Facultad de Ciencias.

Alumno de Máster

Los déficits iniciales de memoria en los pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) están posiblemente causados por la disfunción/pérdida sináptica que ocurre con antelación a la pérdida neuronal. Trabajos anteriores han demostrado que la respuesta neuroinflamatoria podría estar implicada en la progresión de la EA. Las células microgliales son el principal tipo celular del sistema inmune innato en el cerebro. De hecho, tanto los pacientes como los modelos animales de esta enfermedad muestran una activación microglial abundante. Sin embargo, todavía se desconoce la relación existente entre esta activación microglial y la patología. Como **hipótesis de trabajo** se plantea que una respuesta inmunológica deficiente podría estar implicada en el aumento de los niveles de β -amiloide ($A\beta$) y de fosfo-tau, así como en el proceso neurodegenerativo que ocurre durante la progresión de la enfermedad. El **objetivo** principal de este TFM ha sido investigar el efecto de una disminución de la activación microglial, mediante un tratamiento inmunosupresor, sobre la progresión patológica en el hipocampo de un modelo transgénico murino *APP/PS1*.

Para el tratamiento de inmunosupresión se administró intraperitonealmente, durante 3 meses, ciclosporina (15 mg/kg) y prednisona (20 mg/kg) a ratones *APP^{swe}/PS1^{dE9}* de 9 meses de edad. Como controles se utilizó una población de ratones transgénicos de la misma edad no tratados. La carga amiloide y de células gliales (microglía y astrogliá), así como la patología neurítica se analizó por inmunohistoquímica. Además, se evaluaron los niveles de $A\beta$ y fosfo-tau, la activación glial, la producción de citoquinas y la neurodegeneración GABAérgica haciendo uso de técnicas moleculares. Utilizando la técnica de qRT-PCR, se detectó una disminución significativa en la expresión del marcador microglial Iba-1 y de algunas citoquinas (IL-6 e IL-12a) en los ratones inmunosuprimidos, en comparación con sus controles. Además, detectamos un aumento significativo en la expresión del marcador astrogliar GFAP y en los niveles de $A\beta$. También, se observó que las subpoblaciones de interneuronas que expresan somatostatina y neuropéptido Y estaban afectadas negativamente tras el tratamiento. Los estudios inmunohistoquímicos revelaron un aumento significativo en la carga de $A\beta$ y en el área hipocampal ocupada por células astrogliales. Sin embargo, y en contraste con los resultados por qRT-PCR, no se observó disminución en el área hipocampal ocupada por células microgliales. Finalmente, se detectó un empeoramiento de la patología neurítica en el grupo tratado.

Por lo tanto, podemos concluir que un estado de inmunosupresión produce una disminución en la actividad de la población microglial y acelera la patología amiloidea y la degeneración neuronal y axonal en este modelo *APP/PS1*. Estos datos apoyan la idea de que las deficiencias que ocurren con la edad en el sistema inmune innato podrían promover la patología de la EA y el déficit cognitivo en los pacientes.

Este trabajo ha sido financiado por FIS PI12/01431, FISPI15/0796 y CIBERNED.



Contribución diferencial de Abeta y Tau al proceso degenerativo en la enfermedad de Alzheimer: búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

Juan José Fernández Valenzuela

Trabajo dirigido por Antonia Gutiérrez Pérez y Raquel María Sánchez Varo. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología (Área de Biología Celular), Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. IBIMA. CIBERNED.

Alumno de Doctorado

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un proceso neurodegenerativo que conlleva un deterioro cognitivo severo. Es una enfermedad incurable que afecta a más de 35 millones de personas en el mundo y en la que los escasos fármacos existentes apenas mejoran la sintomatología. A nivel neuropatológico, la AD está definida como una proteinopatía, caracterizada por depósitos extracelulares (placas) de beta-amiloide (Abeta) y ovillos intraneuronales neurofibrilares formados por la proteína tau hiperfosforilada, junto con pérdida de sinapsis y muerte neuronal selectiva. La agregación y acumulación de Abeta desempeña un papel central en la patogénesis. Puede encontrarse en forma de monómeros u oligómeros, existiendo una correlación entre los niveles de estos últimos y la gravedad del defecto cognitivo. Se postula, además, que uno de los mecanismos implicados en la producción/eliminación del Abeta estaría asociado a fallos en el transporte axonal y consecuente disfunción del proceso de autofagia-lisosomal, siendo un posible punto de conexión entre las patologías de Abeta y tau. También se ha propuesto la existencia de un proceso neuroinflamatorio que sería clave en el desarrollo de la enfermedad, aunque la implicación de la respuesta glial (microglía y astrogía) en la patología no es bien conocida. Nuestra **hipótesis de trabajo** consiste en que 1) la disfunción del citoesqueleto por fosforilación de tau induciría un aumento de Abeta y de la patología axonal/sináptica; y 2) la degeneración/disfunción glial produciría un aumento de las formas tóxicas de Abeta y/o tau extracelulares comprometiendo la viabilidad celular. Los objetivos y la metodología que se empleará son: 1) Determinar la posible relación entre la disfunción del transporte axonal mediada por fosfo-Tau con la patología amiloide y el proceso neurodegenerativo, empleando animales APP/PS1 tratados con un estabilizador de microtúbulos (epotilona-D): de estar implicada la desestabilización del citoesqueleto axonal en el aumento de la producción de Abeta, la progresión de la patología y los déficits cognitivos deberían ser sensibles al tratamiento; 2) determinar la relación entre la disfunción glial y las formas tóxicas de Abeta y tau mediante estudios *in vivo*: analizando primero, el efecto de la manipulación genética o farmacológica de la microglía en modelos murinos APP, Tau o 3xTgAD; y segundo, mediante inyecciones hipocampales de fracciones solubles (S1) de muestras postmortem de pacientes. Los animales serán evaluados mediante tests conductuales y los cerebros procesados para estudios moleculares (western-blots, RT-PCR) y celulares (histología, inmunohistoquímica, análisis de imagen). Este trabajo pretende poner de manifiesto la relación entre Abeta y fosfo-tau, identificar los mecanismos relacionados con la respuesta inflamatoria implicados en la acumulación de sus formas tóxicas, así como la contribución de todos estos factores al proceso degenerativo. Desde una perspectiva traslacional, permitirá identificar posibles dianas terapéuticas a utilizar en el desarrollo de nuevas estrategias protectoras.

FIS PI12/01431, FIS PI15/00796 y CIBERNED



Sesión V

Transiciones epitelio-mesénquima en el desarrollo cardiaco.

Laura Angélica Hernández de Haro

Trabajo dirigido por Rita Carmona Mejías. Tutor: Ramón Muñoz-Chápuli. Departamento de Biología Animal. Facultad de Ciencias.

Alumna de Máster (Trabajo Fin de Máster Académico)

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso celular finamente regulado por el que células epiteliales cambian su fenotipo y se transforman en células mesenquimáticas. Esta transición implica cambios en los sistemas de adhesión celular y en el citoesqueleto, cambios en la polaridad celular, producción de enzimas de degradación de la matriz extracelular y adquisición de motilidad. La TEM interviene en múltiples procesos esenciales para el desarrollo de los vertebrados, incluyendo la formación del mesodermo y la cresta neural, formación de esclerotomo y musculatura estriada no miotómica, formación de mesénquima en diversos órganos como las gónadas, hígado o pulmones, y también en el desarrollo cardiaco. El interés por la TEM no sólo se circunscribe al desarrollo embrionario, puesto que fenómenos de TEM en la edad adulta están implicados en procesos patológicos tan importantes como la metástasis tumoral o la fibrosis de diferentes órganos. Por ello, el conocimiento de los mecanismos embrionarios que regulan positiva y negativamente la TEM tiene una trascendencia muy importante a nivel traslacional.

En concreto, durante el desarrollo cardiaco se producen dos procesos de TEM paralelos, uno que afecta al endocardio y da lugar al tejido valvuloseptal, y otro que afecta al epicardio y da lugar a células derivadas del epicardio (CDEP) que contribuyen al tejido conectivo y a la vasculatura cardiaca. Nuestro proyecto fin de máster tiene como objetivo una revisión y actualización de los conocimientos disponibles sobre los procesos de TEM en el desarrollo cardiaco. Dicha revisión abarcará desde los primeros trabajos que pusieron de manifiesto la existencia de TEM cardiacas en los años 90 del siglo pasado, hasta las contribuciones más recientes acerca del control molecular de la TEM del endocardio y del epicardio, y del destino final de las células derivadas de dichos procesos de TEM. Nuestro proyecto incluye los criterios de búsqueda y selección de la literatura relevante, la relación de bases de datos sobre las que se hará la búsqueda, así como la previsión de un análisis crítico de las lagunas y problemas aún no resueltos acerca de la TEM en el desarrollo cardiaco.



Contribución de las células del linaje *Wt1* al desarrollo del páncreas en ratón.

Sergio Daniel Rosales Vanella

Trabajo dirigido por Rita Carmona Mejías. Departamento de Biología Animal. Grupo de Desarrollo Cardiovascular y Angiogénesis (DCA). Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.

Alumno de Máster

El gen supresor del Tumor de Wilms (*Wt1*) es un factor de transcripción esencial para el desarrollo embrionario en mamíferos. Este gen se expresa en numerosos tejidos como riñones, gónadas, corazón y en las células mesoteliales que recubren los órganos.

Se ha descrito que *Wt1* interviene en la regulación de los procesos de Transición Epitelio-Mesénquima (TEM). En la bibliografía ya existen multitud de trabajos donde se demuestra la expresión del gen *Wt1* en diferentes mesotelios embrionarios, como es el caso del mesotelio hepático y la contribución de las células derivadas del mismo, tras sufrir un proceso de TEM, a diferentes tipos celulares, como, por ejemplo, a las células estrelladas o al endotelio de los sinusoides hepáticos.

El páncreas en desarrollo y en la etapa adulta también posee un revestimiento epitelial de origen celómico. Trabajos previos han demostrado la relación de las células estrelladas del páncreas con algunos procesos patológicos como la pancreatitis, sin embargo, todavía se desconoce el origen de estas células y la dinámica del mesotelio que lo rodea, en cuanto a su expresión de *Wt1* y al potencial de diferenciación del mesénquima derivado del proceso.

El objetivo de este trabajo es el estudio de los signos característicos de procesos de Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) en las células mesoteliales que recubren el páncreas durante el desarrollo de ratón y analizar la capacidad de diferenciación de dichas células.

Para ello, se han utilizado dos ratones de trazado de linaje. Un cruce de ratones transgénicos denominada *Wt1Cre;ROSA^{YFP}*, donde las células con el promotor activo del gen *Wt1*, quedan marcadas permanentemente con la Proteína Amarilla Fluorescente (Yellow Fluorescen Protein) y además, se han utilizado embriones procedentes de ratones *Knock-in Wt1CreERT2;ROSA^{YFP}* inducibles por Tamoxifeno donde se activa la fluorescencia en las células con el promotor activo de *Wt1* en un momento determinado del desarrollo.

Los primeros resultados sugieren la existencia de expresión del gen *Wt1* en el mesotelio del páncreas. Además, el análisis morfológico del mesotelio indica la presencia de signos típicos de un proceso de TEM en dichas células, donde el mesénquima resultante podría tener potencial de diferenciación en diferentes tipos celulares que contribuyen al desarrollo del páncreas.



Respuestas celulares del nicho pericoronario a daño cardíaco: reclutamiento de progenitores sanguíneos e interacción neurovascular.

Cristina Pogontke Díaz

Trabajo dirigido por José María Pérez Pomares. Depto. De Biología Animal. Facultad de Ciencias.

Alumna de Doctorado

El infarto de miocardio es la principal causa de muerte en el mundo occidental (www.who.org). Durante la remodelación ventricular que sigue a la muerte masiva de miocardio por isquemia, la fibrosis reparativa se transforma en una fibrosis patológica incrementando la deposición de colágeno y conduciendo a la insuficiencia cardíaca. La ausencia de una regeneración real del miocardio en respuesta a un daño extenso es paradójica, ya que en circunstancias normales el miocardio adulto de los mamíferos se renueva a partir de fuentes celulares todavía discutidas entre las que se encuentra las llamadas células madre cardíacas (CSC, del inglés *Cardiac Stem Cell*), caracterizadas por su capacidad de autorenovación, por ser clonogénicas y porque pueden diferenciarse a varios tipos celulares. El origen embrionario de estas células, el que en gran medida determina su respuesta a señales moleculares y estímulos diversos, es desconocido.

Numerosos investigadores consideran a los progenitores epicárdicos embrionarios contenidos en el proepicardio como un posible origen de CSC ya que durante el desarrollo embrionario por una transición epitelio-mesénquima da lugar a una población de células madre mesenquimales derivadas de epicardio, (EPDC, del inglés *Epicardial Derived Cell*) las cuales contribuyen al desarrollo del sistema vascular coronario y de diversas poblaciones de tejido intersticial. La médula ósea también ha sido considerada una posible fuente de CSC ya que durante las últimas fases del desarrollo embrionario de ratón y la vida adulta se produce la incorporación de células derivadas de médula ósea a las paredes cardíacas, especialmente alrededor de las arterias coronarias.

Ciertos tipos de CSC se encuentran asociados a vasos coronarios de gran calibre, pero se desconoce si esta asociación constituye un auténtico nicho de células madre en el que también podrían estar implicadas las fibras nerviosas. De hecho, en numerosos tejidos adultos se ha observado que los vasos sanguíneos y los nervios simpáticos se asocian estrechamente formando una banda neurovascular característica cuyo desarrollo y mantenimiento depende, entre otras moléculas, del eje de señalización molecular establecido entre neurotrofinas y sus receptores, entre los que se encuentra TrkB. Tanto diversas neurotrofinas como sus receptores se expresan en células endoteliales y células musculares lisas de los vasos sanguíneos coronarios. La hipótesis básica propuesta en mi proyecto de tesis es que el espacio intersticial pericoronario determina un auténtico nicho para diversos tipos de CSC, de forma tal que la modulación de las propiedades del nicho podría permitir activar una respuesta regenerativa endógena en el corazón dañado. El desarrollo experimental de mi propuesta incluye el uso de modelos transgénicos de ratón, cultivos celulares y análisis de expresión génica y de proteínas entre otros métodos.



Mecanismos reparativos y regenerativos en el corazón embrionario de los vertebrados.

Paul Palmquist Gomes

Trabajo dirigido por José María Pérez Pomares. Departamento de Biología Animal. Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

Alumno de Doctorado

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo occidental, siendo el infarto de miocardio asociado a enfermedad coronaria su principal causa. El infarto de miocardio (muerte masiva de músculo cardíaco) es resultado de episodios sostenidos de isquemia, que se producen por anomalías en la circulación coronaria, lo que a su vez se traduce en pérdida de irrigación del miocardio y su muerte. Debido a que el corazón adulto es un órgano de naturaleza post-mitótica, no es capaz de sustituir el miocardio muerto por músculo nuevo y funcional. Sin embargo, aunque no es capaz de regenerarse, el corazón dañado puede repararse sustituyendo el miocardio muerto por tejido fibroso. La progresión de la respuesta fibrótica (remodelación ventricular) es lo que conduce a la insuficiencia cardíaca, que provoca la muerte del individuo.

Dada la elevada incidencia del infarto de miocardio en la población, se hace necesaria la búsqueda de distintos tipos de células, sobre todo progenitores cardiovasculares o células madre, capaces de generar miocardio en el área dañada.

Desafortunadamente, es poco lo que se ha conseguido, en parte por la dificultad de diferenciar células progenitoras o madres en cardiomiocitos en número suficiente para generar una regeneración real del tejido, pero también por los riesgos que implica el uso de este tipo de células (p.ej. tumorigénesis).

Este trabajo opta por una estrategia alternativa al proponer el estudio de los mecanismos básicos usados en el tejido embrionario para reparar y/o regenerar un daño cardíaco *in vivo*, lo que puede ser útil para comprender la respuesta del corazón adulto a una enfermedad compleja como el infarto de miocardio. Para ello hemos usado la criocauterización como modelo experimental de daño en embriones de ave (Palmquist-Gomes et al, in press), combinado con quimerización interespecífica (codorniz-pollo) y ensayos de cultivo celular que nos ha permitido estudiar la respuesta del corazón embrionario a la muerte masiva de miocardio. Mediante técnicas de análisis de expresión de proteínas (inmunohistoquímica) y de expresión génica (hibridación *in situ*) se han analizado los resultados de la manipulación experimental. Nuestros datos sugieren que la fibrosis es una respuesta reparativa endógena de los vertebrados que ya está presente en el embrión. En respuesta a daño, los progenitores celulares de la región "infartada" pueden iniciar una diferenciación precoz (p.ej. musculatura lisa o fibroblastos) que interfiere con los mecanismos regenerativos clásicos del embrión basados en la proliferación compensatoria del tejido dañado.

Bibliografía: Palmquist-Gomes P, Guadix JA, Pérez-Pomares JM. A chick embryo cryoinjury model for the study of cell differentiation tissue growth and organ repair. Differentiation. In press.

