

**VI JORNADAS DE DIVULGACIÓN DE LA
INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR, CELULAR, GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA**

Córdoba, 2014

Libro de resúmenes

Víctor M. Luque Almagro
José Alhama Carmona
David González Ballester
Rosario Blanco Portales
Inés Molina Moreno
(Autores)

ISBN: 978-84-940063-2-6

Depósito legal: CO-833-2014

Imprime:

Ámbito Gráfico S.L.L.
C/ El Nogal, nº 16 local
14006 - Córdoba
www.ambitografico.com

El papel utilizado para la impresión de este libro es cien por cien libre de cloro y está calificado como **papel ecológico**



Universidad de Córdoba
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Comité Organizador:

Conrado Moreno Vivián

Emilio Fernández Reyes

José Alhama Carmona

Rosario Blanco Portales

David González Ballester

Víctor Manuel Luque Almagro

Secretaría Técnica:

Inés Molina Moreno

Susana Plazuelo Lozano

Apoyo informático:

Emanuel Sanz Luque

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Programa | 11 |
| Presentación..... | 17 |
| Conferencia Inaugural. AGENCIA ANDALUZA DEL CONOCIMIENTO: EVALUACIÓN DE I+D+I Y BECAS TALENTIA. Soledad Rubio Bravo y Francisco Pérez Cutiño | 21 |
| <i>ANÁLISIS FUNCIONAL DEL METABOLISMO DE PURINAS Y UREIDOS EN PLANTAS DE JUDÍA.</i> Grupo BIO115. Josefa Muñoz Alamillo. | 23 |
| <i>CEREALES PARA COMBATIR LA INTOLERANCIA AL GLUTEN: SILENCIAMIENTO DE GLIADINAS MEDIANTE RNAi Y DESARROLLO DE VARIEDADES DE TRIGO APTAS PARA CELÍACOS.</i> Grupo AGR238. María José Giménez Alvear | 29 |
| <i>PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA DE LEVADURAS VÍNICAS.</i> Grupo AGR146. Jaime Moreno García | 35 |
| <i>DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA TRANSLACIONAL EN EL ÁREA AGROFORESTAL, CARACTERIZACIÓN DE BIODIVERSIDAD, TRAZABILIDAD ALIMENTARIA Y DETECCIÓN DE ALÉRGENOS.</i> Grupo AGR164. Cristina Romero Rodríguez..... | 41 |
| <i>IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y ESTRUCTURAS DERIVADAS DE LA SUPERFICIE DE BACTERIAS PATÓGENAS GRAM-POSITIVAS CON FINES DE VACUNAS Y DIAGNÓSTICO.</i> Grupo AGR164. Manuel J. Rodríguez Ortega..... | 47 |
| <i>PRIORIDADES DE I+D+I EN EL SECTOR TERMOSOLAR.</i> Empresa MAGTEL. Francisco López Banderas | 53 |
| <i>BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS CIANURADOS DE LA INDUSTRIA JOYERA POR LA BACTERIA ALCALÓFILA Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344.</i> Grupo BIO117. María Isabel Ibáñez García.. | 57 |
| <i>PAPEL DEL 2-OXOGLUTARATO EN LA REGULACIÓN DE LOS METABOLISMOS DEL CARBONO Y NITRÓGENO EN PROCHLOROCCUS.</i> Grupo BIO123. María Agustina Domínguez Martín..... | 63 |
| <i>PAPEL DEL GEN <i>atr4393</i> EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DEL HETEROCISTO EN ANABAENA SP. PCC 7120.</i> Antonio López Lozano | 69 |

| | |
|---|-----|
| <i>ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS: FROM THE BENCH TO THE INDUSTRY.</i> Empresa TIGENIX. Olga de la Rosa Morales | 75 |
| <i>REUTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES MEDIANTE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL DE SEGUNDA GENERACIÓN.</i> Grupo TEP169: BIOSAHE. David E. Leiva Candia | 81 |
| <i>PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE UN NUEVO TIPO DE BIODIESEL QUE NO PRODUCE GLICERINA COMO SUBPRODUCTO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES LIPASAS.</i> Grupo FQM162. Carlos Luna Durán | 87 |
| <i>APLICACIÓN DE LAS NUEVAS PLATAFORMAS MULTINÚCLEO EN BIOINFORMÁTICA.</i> Grupo AGR248. Francisco José Esteban..... | 93 |
| <i>ENSAYOS IN VIVO E IN VITRO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BEBIDAS DE ALTO CONSUMO.</i> Grupo AGR158. Ángeles Alonso Moraga | 99 |
| <i>EFFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL EN LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL EN LA RATA.</i> Grupo CTS624. Macarena Aguilar Luque | 103 |
| <i>LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE POTASIO Y SODIO EN LAS LEVADURAS Saccharomyces cerevisiae Y Debaryomyces hansenii.</i> Grupo BIO202. José Ramos Ruíz | 109 |
| <i>NUEVOS MARCADORES CELULARES DE OBESIDAD Y ENFERMEDAD METABÓLICA.</i> Grupo BIO139. Natalia Moreno Castellanos | 113 |
| <i>NUEVAS HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RESPUESTAS BIOLÓGICAS A LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.</i> Grupos BIO151 y BIO187. Noelia Morales-Prieto, Ricardo Fernández-Cisnal y Nieves Abril... | 119 |
| <i>GENÓMICA FUNCIONAL DE LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO Y PRODUCCIÓN DE ENERGÍA EN CHLAMYDOMONAS.</i> Grupo BIO128. Aurora Galván Cejudo | 125 |
| <i>ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN SALMONELLA-HOSPEDADOR MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA (RNA-seq). CARACTERIZACIÓN DEL INTERACTOMA EN UN SISTEMA CELULAR MODELO: EL NEUTRÓFILO.</i> Grupo AGR231. Sara Zaldívar López | 131 |
| <i>CAENORHABDITIS ELEGANS, UN GUSANO PARA ESTUDIAR TRASTORNOS DEL COMPORTAMIENTO EN HUMANOS. APLICACIONES AL ESTUDIO DE LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA.</i> Grupo BIO272. Jaime Osuna Luque . | 137 |

| | |
|---|-----|
| ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN MEDICINA REPARATIVA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO. Grupo CTS985. Fernando Leiva Cepas..... | 149 |
| <i>RESPUESTA DIFERENCIAL IN VITRO A OCTREÓTIDO Y PAIREÓTIDO EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS HIPOFISARIAS NORMALES Y TUMORALES EN HUMANOS.</i> Grupo BIO139. Raúl Miguel Luque Huertas | 155 |
| <i>INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN PUBERTAD, BALANCE ENERGÉTICO Y FERTILIDAD.</i> Grupo BIO310. Manuel Tena-Sempere..... | 161 |
| <i>RESTRICCIÓN CALÓRICA, BALANCE REDOX CELULAR Y ENVEJECIMIENTO.</i> Grupo BIO276. José Manuel Villalba Montoro | 167 |
| <i>EL EQUILIBRIO REDOX CELULAR: DE LA LEVADURA A LOS TUMORES.</i> Grupo BIO216. Raúl González Ojeda | 173 |
| <i>REVERTIENTES ESPONTÁNEOS DE F. OXYSPORUM PORTAN DELECCIONES Y DUPLICACIONES DE GRANDES SEGMENTOS CROMOSÓMICOS.</i> Grupo BIO138. Elena Pérez Nadales | 181 |
| <i>EPIGENÉTICA Y REPARACIÓN DE ADN.</i> Grupo BIO301. Rafael Rodríguez Ariza | 189 |
| <i>TRANSPORTE DE MOLIBDENO EN EUCARIOTAS.</i> Manuel Tejada Jiménez | 195 |
| <i>ISOGENES Y VARIABILIDAD ALÉLICA EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO HUMANO.</i> Empresa CAMBRIX GENOMIX INSTITUTE. José Redondo Nevado..... | 201 |
| <i>GESTIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS EN LOS LABORATORIOS UNIVERSITARIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR, GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA.</i> Servicio de Protección Ambiental (SEPA). Antonio Gomera Martínez | 203 |
| Conferencia de Clausura. María Blasco Marhuenda..... | 209 |

PROGRAMA

VI JORNADAS DE DIVULGACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR, GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

Jueves, 8 de mayo de 2014

Primera Sesión

- 8:30** Entrega de documentación y colocación de pósteres.
- 9:00 Inauguración y Presentación de las Jornadas.**
Excmo. y Mgfc. Sr. Rector D. José Manuel Roldán Nogueras.
- 9:15 Conferencia Inaugural:** AGENCIA ANDALUZA DEL CONOCIMIENTO: EVALUACIÓN DE I+D+I Y BECAS TALENTIA.
Soledad Rubio Bravo. *Responsable del Área de Evaluación de I+D+I. Dirección de Evaluación y Acreditación. Agencia Andaluza del Conocimiento.*
Francisco Pérez Cutiño. *Programa Becas Talentia. Agencia Andaluza del Conocimiento.*

Descanso/sesión de pósteres.

MODERADORAS: Enriqueta Moyano Cañete/Ana Maldonado Alconada

- 11:15 GRUPO BIO115: Biotecnología de plantas superiores y algas verdes.** ANÁLISIS FUNCIONAL DEL METABOLISMO DE PURINAS Y UREIDOS EN PLANTAS DE JUDÍA. Josefa Muñoz Alamillo.
- 11:30 GRUPO AGR238: Biotecnología vegetal.** CEREALES PARA COMBATIR LA INTOLERANCIA AL GLUTEN: SILENCIAMIENTO DE GLIADINAS MEDIANTE RNAi Y DESARROLLO DE VARIEDADES DE TRIGO APTAS PARA CELÍACOS. María José Giménez Alvear.
- 11:45 GRUPO AGR146: Viticultura y enología.** PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA DE LEVADURAS VÍNICAS. Jaime Moreno García.
- 12:00 GRUPO AGR164: 1. Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agroforestal.** DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA

TRANSLACIONAL EN EL ÁREA AGROFORESTAL, CARACTERIZACIÓN DE BIODIVERSIDAD, TRAZABILIDAD ALIMENTARIA Y DETECCIÓN DE ALÉRGENOS. Cristina Romero Rodríguez.

GRUPO AGR164: 2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y ESTRUCTURAS DERIVADAS DE LA SUPERFICIE DE BACTERIAS PATÓGENAS GRAM-POSITIVAS CON FINES DE VACUNAS Y DIAGNÓSTICO. Manuel J. Rodríguez Ortega

MODERADORES: M^a Dolores Roldán Ruíz/José Manuel García Fernández

12:35 Empresa MAGTEL: PRIORIDADES DE I+D+I EN EL SECTOR TERMOSOLAR. Francisco López Banderas.

12:55 GRUPO BIO117: Metabolismo del nitrógeno microbiano. BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS CIANURADOS DE LA INDUSTRIA JOYERA POR LA BACTERIA ALCALÓFILA *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. María Isabel Ibáñez García.

13:10 GRUPO BIO123: Asimilación de nutrientes en Prochlorococcus, cianobacteria clave en ecosistemas marinos. PAPEL DEL 2-OXOGLUTARATO EN LA REGULACIÓN DE LOS METABOLISMOS DEL CARBONO Y NITRÓGENO EN *PROCHLOROCOCCUS*. María Agustina Domínguez Martín.

13:25 Egresado 1: PAPEL DEL GEN *alr4393* EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DEL HETEROCISTO EN *ANABAENA* SP. PCC 7120. Antonio López Lozano.

Descanso

Segunda Sesión

MODERADORES: Rafael Vázquez Martínez/Juan José Garrido Pavón

15:30 Empresa TIGENIX: ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS: FROM THE BENCH TO THE INDUSTRY. Olga de la Rosa Morales.

15:50 GRUPO TEP169: BIOSAHE (Biocombustibles y sistemas de ahorro energético). REUTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES MEDIANTE FERMENTACIÓN PARA LA

PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL DE SEGUNDA GENERACIÓN. David E. Leiva Candía.

16:05 GRUPO FQM162: Química Orgánica-Biorefinería. PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE UN NUEVO TIPO DE BODIESEL QUE NO PRODUCE GLICERINA COMO SUBPRODUCTO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES LIPASAS. Carlos Luna Durán.

16:20 GRUPO AGR248: Biotecnología agroalimentaria. APLICACIÓN DE LAS NUEVAS PLATAFORMAS MULTINÚCLEO EN BIOINFORMÁTICA. Francisco José Esteban.

16:35 GRUPO AGR158: MERAGEM. Mejora de razas y genética molecular. Genotoxicología de alimentos. ENSAYOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BEBIDAS DE ALTO CONSUMO. Ángeles Alonso Moraga.

16:50 GRUPO CTS624: Neuroplasticidad y estrés oxidativo. EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL EN LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL EN LA RATA. Macarena Aguilar Luque.

17:05 GRUPO BIO202: Microbiología agrícola. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE POTASIO Y SODIO EN LAS LEVADURAS *Saccharomyces cerevisiae* Y *Debaryomyces hansenii*. José Ramos Ruíz.

17:20 GRUPO BIO139: 2. Adipología y Enfermedad Metabólica. NUEVOS MARCADORES CELULARES DE OBESIDAD Y ENFERMEDAD METABÓLICA. Natalia Moreno Castellanos.

Descanso/sesión de pósteres.

Tercera Sesión

MODERADORES: Juan Jurado Carpio/Ángel Llamas Azúa

18:00 GRUPOS BIO151 y BIO187: Biomarcadores moleculares de contaminación ambiental y Biología Molecular de los mecanismos de respuesta a estrés. NUEVAS HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RESPUESTAS BIOLÓGICAS A LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. Noelia Morales-Prieto, Ricardo Fernández-Cisnal y Nieves Abril.

- 18:20 GRUPO BIO128: Biología molecular de la asimilación de nitrato en algas.** GENOMICA FUNCIONAL DE LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO Y PRODUCCIÓN DE ENERGÍA EN CHLAMYDOMONAS. Aurora Galván Cejudo.
- 18:35 GRUPO AGR231: Genómica y mejora animal.** ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN SALMONELLA-HOSPEDADOR MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA (RNA-seq). CARACTERIZACIÓN DEL INTERACTOMA EN UN SISTEMA CELULAR MODELO: EL NEUTRÓFILO. Sara Zaldívar López.
- 18:50 GRUPO BIO272: Genética y trastornos del comportamiento.** CAENORHABDITIS ELEGANS, UN GUSANO PARA ESTUDIAR TRASTORNOS DEL COMPORTAMIENTO EN HUMANOS. APLICACIONES AL ESTUDIO DE LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA. Jaime Osuna Luque.

Viernes, 9 de mayo de 2014

Cuarta Sesión

MODERADORAS: Carmen Alicia Padilla Peña/Carmen M^a Michán Doña

- 09:00 GRUPO CTS985: REGMUS (Regeneración muscular).** ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN MEDICINA REPARATIVA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO. Fernando Leiva Cepas.
- 09:15 GRUPO BIO139: 1. Hormonas y Cáncer.** RESPUESTA DIFERENCIAL *IN VITRO* A OCTREÓTIDO Y PASIREÓTIDO EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS HIPOFISARIAS NORMALES Y TUMORALES EN HUMANOS. Raúl Miguel Luque Huertas.
- 09:30 GRUPO BIO310: Balance energético y función reproductora.** INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN PUBERTAD, BALANCE ENERGÉTICO Y FERTILIDAD. Manuel Tena-Sempere.
- 09:45 GRUPO BIO276: Biomembranas, antioxidantes y estrés oxidativo.** RESTRICCIÓN CALÓRICA, BALANCE REDOX CELULAR Y ENVEJECIMIENTO. José Manuel Villalba Montoro.

- 10:00 GRUPO BIO216: Defensa antioxidante celular. EL EQUILIBRIO REDOX CELULAR: DE LA LEVADURA A LOS TUMORES.** Raúl González Ojeda.
- 10:15 GRUPO BIO138: Genética molecular de la patogénesis fúngica.** REVERTIENTES ESPONTÁNEOS DE *F. OXYSPORUM* PORTAN DELECCIONES Y DUPLICACIONES DE GRANDES SEGMENTOS CROMOSÓMICOS. Elena Pérez Nadales.
- 10:30 GRUPO BIO301: Mecanismos moleculares de mutagénesis y reparación de ADN.** EPIGENÉTICA Y REPARACIÓN DE ADN. Rafael Rodríguez Ariza.
- 10:45 Egresado 2.** TRANSPORTE DE MOLIBDENO EN EUCARIOTAS. Manuel Tejada Jiménez.
- 11:05 Empresa CAMBRIX GENOMIX INSTITUTE:** ISOGENES Y VARIABILIDAD ALÉLICA EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO HUMANO. José Redondo Nevado.
- 11:20 SEPA:** GESTIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS EN LOS LABORATORIOS UNIVERSITARIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR, GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA. Antonio Gomera Martínez.
- Descanso.
- 12:15 Conferencia de Clausura:** María Blasco Marhuenda. Directora del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid.
- 13:15 Clausura de las Jornadas.**

Presentación de las Jornadas

El Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba organiza este año las VI Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología con el firme propósito de animar y despertar vocaciones entre los jóvenes, fomentar y cristalizar colaboraciones entre los grupos, e iniciar contactos y plasmar ideas con el sector empresarial.

En estas Jornadas, de día y medio de duración, participan investigadores de los grupos de investigación de los Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular, Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Microbiología, Genética, Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal, Química Orgánica, Química Agrícola y Edafología, y Ciencias Morfológicas, que se encuentran entre los más activos de la UCO, así como grupos del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS). Varios de estos Departamentos participan en la docencia de los másteres “Biotecnología Molecular, Celular y Genética” e “Investigación Biomédica Translacional”, que gozan del reconocimiento de la *Mención de Calidad y Hacia la Excelencia*.

Los grupos participantes presentarán sus líneas de trabajo a estudiantes de Licenciatura y Grado, investigadores, empresas y sociedad. En esta edición participan dos doctores egresados que han desarrollado exitosamente su actividad postdoctoral en Centros de investigación extranjeros de primer nivel. Contamos también con tres empresas biotecnológicas, todo unos ejemplos de transferencia de conocimiento, de cómo los investigadores dan el salto del mundo de la investigación académica a la creación y desarrollo de empresas biotecnológicas, como una de las vías de búsqueda de valor añadido a la investigación.

La prestigiosa científica María Blasco Marhuenda, Directora del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, nos honrará con la conferencia de clausura.

Agradecemos a Soledad Rubio Bravo, Francisco Pérez Cutiño y María Blasco Marhuenda su desinteresado esfuerzo por asistir a estas Jornadas; a Francisco López Banderas (Magtel), Olga de la Rosa Morales (Tigenix), José Redondo Nevado (Cambrix Genomix Institute) y a Antonio Gomera Martínez (Servicio de Protección Ambiental de la

UCO) su generosa disponibilidad. A la Universidad de Córdoba, su Magnífico Sr. Rector y su Vicerrector de política científica, a la OTRI de la UCO, y a la Fundación Torres Gutiérrez su apoyo y financiación. A cada uno de los investigadores de los grupos de investigación participantes por su respuesta tan positiva, y a los postdoctores egresados invitados por hacernos partícipes de sus trayectorias científicas.

El comité organizador

Sesión Primera

Conferencia Inaugural

AGENCIA ANDALUZA DEL CONOCIMIENTO: EVALUACIÓN DE I+D+I Y BECAS TALENTIA

¹Soledad Rubio Bravo y ²Francisco Pérez Cutiño

¹Responsable del Área de Evaluación de I+D+I. Dirección de Evaluación y Acreditación. Agencia Andaluza del Conocimiento.

²Programa Becas Talentia. Agencia Andaluza del Conocimiento.

La Agencia Andaluza del Conocimiento (AAC) se crea el 30 de abril de 2011 y en ella se integran la Agencia Andaluza de Evaluación y Acreditación Universitaria (AGAE), el Centro de Innovación y Transferencia de Tecnología de Andalucía (CITAndalucía) y la Sociedad para el Impulso del Talento (Talentia). La extinta AGAE, ahora llamada Dirección de Evaluación y Acreditación (DEVA), se ubica en Córdoba (C/ Doña Berenguela, s/n 3ª planta Edificio Vial Norte) mientras CITAndalucía y Talentia están ubicados en Sevilla (Calle Max Planck 3, Edificio Iris 1. Isla de la Cartuja). La Agencia goza de personalidad jurídica y patrimonio propios y está dotada de autonomía administrativa y financiera para el cumplimiento de sus fines, así como para la gestión de su patrimonio y de los fondos que se la asignen.

A la Agencia le corresponden “las competencias de evaluación y acreditación de las actividades universitarias; y de fomento, gestión, evaluación y acreditación de las actividades de investigación, desarrollo e innovación entre los agentes del Sistema Andaluz del Conocimiento. Le corresponde también prestar servicios para la tramitación y ejecución de programas y actuaciones vinculadas a la formación avanzada, al fomento de la innovación o a programas de formación de universitarios y universitarias en otras regiones y países. Asimismo, le corresponde el fomento de la innovación tecnológica en Andalucía, transfiriendo conocimiento a través de los Agentes del Conocimiento y de la participación de las empresas y de dichos Agentes en los programas I+D+I de la Unión Europea”. La Agencia goza de personalidad jurídica y patrimonio propios y está dotada de autonomía administrativa y financiera para el cumplimiento de sus fines, así como para la gestión de su patrimonio y de los fondos que se la asignen.

A la DEVA le corresponde la evaluación y acreditación de las instituciones universitarias y su profesorado así como la evaluación de las actividades de formación e investigación, desarrollo e innovación de los agentes del Sistema Andaluz del Conocimiento. La DEVA cumple, como miembro de pleno derecho de diferentes asociaciones europeas (ENQA, INQAAHE y EQAR), los requisitos de calidad establecidos por la comunidad internacional y goza de independencia en el ejercicio de sus funciones de dirección, coordinación y gestión de las siguientes áreas: a) Área de Evaluación y Acreditación Universitaria y b) Área de Evaluación de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+I).

En el ámbito de las competencias de formación avanzada, la Agencia se ocupa de la gestión del programa Becas Talentia, destinado a la realización de programas de postgrado en universidades extranjeras del máximo prestigio, tanto Máster como Doctorado. De este programa, lanzado en 2007, ya han sido beneficiarios unos 500 jóvenes andaluces.

Por otra parte, este año la Agencia ha lanzado por primera vez un programa de ayudas a la contratación de personal investigador, para la realización de proyectos de investigación postdoctoral en un contexto de movilidad internacional. Se trata del programa Talentia Postdoc.

En esta ponencia se presentarán las actividades del Área de Evaluación de I+D+I de la DEVA y el programa de becas Talentia. Se proporcionará una visión general de los distintos programas de incentivos a los Agentes del Sistema Andaluz del Conocimiento financiados por la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo (CEICE) de la Junta de Andalucía, con especial énfasis en las oportunidades ofrecidas a jóvenes investigadores, así como los procedimientos y criterios utilizados para la evaluación de estos incentivos.

Enlaces de interés:

www.aac.es , <http://deva.aac.es> , www.becastalentia.com

GRUPO BIO115

BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS SUPERIORES Y ALGAS VERDES

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Pineda Priego, Manuelbb1piprm@uco.es

Muñoz Alamillo, Josefa.....bv1munaj@uco.es
 Piedras Montilla, Pedro bb2pimop@ uco.es
 Gálvez Valdivieso, Gregorio..... b32gavag@ uco.es
 Aguilar Urbano, Miguelbb2aguim@ uco.es
 Díaz Leal, Juan Luis b02dilej@ uco.es
 Coletto Reyes, Inmaculadab42corei@ uco.es
 Jurado Ruíz, Luis Pedro b12jurul@ uco.es
 Quiles Luque, Francisco Antonio b42quluf@ uco.es
 Cabello Díaz, Juan Miguel..... b02cadij@ uco.es
 Lambert Rodríguez, Rocío b02laror@ uco.es
 Almudena Torres Trenasb72totra@ uco.es
 Caballo Linares, Cristinab72calic@ uco.es
 Jiménez Rojas, Francisco b82jirof@uco.es
 Robles Pérez, Marta q92ropem@ uco.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Universidad de Córdoba

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- Búsqueda de los factores moleculares responsables de la diferenciación metabólica de las leguminosas en ureídicas y amídicas
- Obtención de organismos fotosintéticos con mayores niveles de tocoferoles (vitamina E)
- Caracterización de los tocoferoles y polifenoles del aceite de oliva y aplicación como parámetro de calidad y autenticación en la lucha contra el fraude

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Cabello-Díaz JM, Quiles FA, Lambert R, Pineda M, Piedras P (2012) Identification of a novel phosphatase with high affinity for nucleotides monophosphate from common bean. *Plant Physiol Biochem.* 53:54-61.

Díaz-Leal JL, Gálvez-Valdivieso G, Fernández J, Pineda M, Alamillo JM (2012) Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot.* 63: 4095-4106.

Gálvez-Valdivieso G, Alamillo JM, Fernández J, Pineda M (2013). Molecular characterization of *PVAS3*, an asparagine synthetase gene from common bean prevailing in developing organs. *J Plant Phys.* 170: 1484-1490.

Díaz-Leal JL, Torralbo F, Quiles F, Pineda M, Alamillo JM (2014) Molecular and functional characterization of allantoin amidohydrolase from *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* DOI: 10.1111/ppl.12157.

Coleto I, Pineda M, Rodiño AP, de Ron A, Alamillo JM (2014) Comparison of N₂ fixation inhibition and ureide accumulation under water deficit in four common bean genotypes of contrasting drought tolerance. *Ann Bot.* 113(6) 1071-1082.

PONENCIA

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL METABOLISMO DE PURINAS Y UREIDOS EN PLANTAS DE JUDÍA

RESUMEN

En plantas de judía se produce la acumulación de ureidos no solo a expensas de la fijación simbiótica en los nódulos sino también a partir del reciclaje de otras moléculas nitrogenadas, especialmente de nucleótidos. Este reciclaje ocurre tanto durante situaciones de estrés como en las fases iniciales y finales del desarrollo. Los cambios en la expresión de los genes y de la actividad de las enzimas implicadas en su metabolismo han permitido concluir que la síntesis de ureidos se induce como parte de las respuestas a estrés y que su acumulación no es la causante de la inhibición de la fijación de nitrógeno en los nódulos. Asimismo, el bloqueo de la expresión de la alantoato amidohidrolasa mediante RNAi, demostró que la degradación de alantoato está catalizada por una única vía enzimática, y que su

inhibición en condiciones de sequía no es la que produce la acumulación de ureidos.

INTRODUCCIÓN

Una de las mayores ventajas que ofrecen las leguminosas, en el contexto de una agricultura sostenible, es su capacidad para aprovechar el nitrógeno atmosférico a través del proceso de fijación simbiótica, lo que permite limitar el uso de fertilizantes nitrogenados. Las leguminosas exportan el nitrógeno fijado en los nódulos en forma de amidas, asparragina (Asn) y glutamina (Gln), en las llamadas leguminosas amídicas (como medicago, guisante y Lotus) o en forma de los ureidos alantoína y alantoato en leguminosas ureídicas (como la soja y la judía). En estas últimas, los ureidos se producen en los nódulos a partir de la oxidación de nucleótidos de purina que se sintetizan *de novo* utilizando el nitrógeno recién fijado (Zrenner *et al.*, 2006). Lo sorprendente de este proceso es que, en condiciones de fijación simbiótica, los ureidos pueden llegar a constituir el 90-95% del nitrógeno que se transporta por el xilema, mientras que en condiciones de fertilización con nitratos las plantas ureídicas se comportan igual que las leguminosas amídicas y que el resto de las plantas y usan los aminoácidos Asn y Gln como principales compuestos de transporte. A pesar de la relevancia funcional de los ureidos, se desconocen las razones fisiológicas y los mecanismos que gobiernan la utilización de una ruta compleja, como es la de la síntesis de purinas y su posterior oxidación hasta ureidos, en lugar de una mucho más simple como la de síntesis de amidas. Además, en los últimos años se ha encontrado una relación directa entre la acumulación de ureidos y la inhibición de la fijación simbiótica del nitrógeno por estreses abióticos como la sequía (King y Purcell, 2005), por lo que el análisis de la regulación de la síntesis y degradación de estos compuestos ha cobrado un interés aún mayor.

El estudio de la regulación tanto de la síntesis como de la degradación de las purinas y de los ureidos en leguminosas ha sido la línea prioritaria de trabajo del grupo BIO 115 durante los últimos años.

OBJETIVOS

-Analizar la respuesta de diversos genes y enzimas del metabolismo de purinas y ureidos a los cambios en las condiciones ambientales, al

estrés hídrico y al estado de desarrollo de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno o fertilizadas con nitrato.

- Estudiar las causas y la posible función de la acumulación de ureidos que ocurre en respuesta al estrés hídrico.
- Determinar la contribución relativa de la síntesis *de novo* de purinas o de las vías de reciclaje de ácidos nucleicos a la concentración final de ureidos en plantas de judía.

RESULTADOS

Se ha demostrado que, en contra de lo que se creía, los ureidos que se acumulan en plantas de judía sometidas a condiciones de sequía no son los causantes de la inhibición de la fijación de nitrógeno que ocurre en tales condiciones. En cambio, la inducción de la síntesis de estos compuestos forma parte de los mecanismos de respuesta de la planta al estrés hídrico (Alamillo *et al.*, 2010). No obstante, usando líneas de judía que difieren en la tolerancia a la sequía, hemos comprobado que existe una correlación entre el aumento de la concentración de ureidos en las hojas y la sensibilidad al estrés de los nódulos. Sorprendentemente, también hemos visto que, en esas condiciones, los ureidos ya no proceden de la síntesis *de novo* de purinas en los nódulos, sino que deben formarse a partir del reciclaje del nitrógeno contenido en otras moléculas (Coletto *et al.*, 2014; Gil-Quintana *et al.*, 2013).

Además, se ha comprobado que el metabolismo de purinas y ureidos depende no solo de la fuente de nitrógeno sino también del estado de desarrollo de las plantas y que, en las leguminosas ureídicas, se alcanzan concentraciones significativas de estos compuestos no solo a expensas de la fijación de nitrógeno sino incluso en ausencia de nódulos, especialmente en las fases iniciales y tardías del desarrollo (Díaz-Leal *et al.* 2012).

Como se ha mencionado antes, las plantas ureídicas como la judía utilizan amidas, principalmente Asn, cuando su fuente de nitrógeno es nitrato. En judía hay tres asparragina sintetasas encargadas de la síntesis de este aminoácido. Recientemente se ha caracterizado la tercera de ellas, que muestra un patrón de expresión claramente diferenciado de las otras dos isoenzimas, y que también se regula por el estado de desarrollo de la planta (Gálvez-Valdivieso *et al.*, 2013).

Se han estudiado varios de los pasos enzimáticos que conducen a la degradación completa de los ureidos para liberar el nitrógeno que contienen. Se han clonado y se han estudiado los patrones de expresión de los genes responsables de este proceso y, usando silenciamiento por RNAi en raíces transformadas de judía, hemos demostrado que la degradación del alantoato está catalizada por la alantoato amidohidrolasa (Díaz-Leal *et al.*, 2014).

Puesto que los ureidos se originan de la oxidación de las purinas, y estas pueden proceder tanto de la síntesis *de novo* como del reciclaje de nucleótidos ácidos procedentes de ácidos nucleicos, estamos intentando esclarecer cuál es la contribución relativa de cada uno de estos procesos a la síntesis final de ureidos en plantas dependientes o no de la fijación simbiótica de nitrógeno y en situaciones de estrés. Para ello se está llevando a cabo el análisis funcional de los genes y de las isoenzimas que catalizan los primeros pasos de la vía de síntesis de las purinas, y de genes y enzimas que participan en las vías de degradación y reciclaje de nucleótidos.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por los proyectos AGL2009-11290 (Ministerio de Ciencia e Innovación), AGL2012-34230 (Ministerio de Economía y Competitividad), P07-RNM-03307 (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía) y Grupo BIO-115 (Junta de Andalucía)

REFERENCIAS

Alamillo JM, Díaz-Leal JL, Sánchez-Morán MV, Pineda M (2010) Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Environ.* 33: 1828-1837

Cabello-Díaz JM, Quiles FA, Lambert R, Pineda M, Piedras P (2012) Identification of a novel phosphatase with high affinity for nucleotides monophosphate from common bean. *Plant Physiol Biochem.* 53:54-61

Coletto I, Pineda M, Rodiño AP, de Ron A, Alamillo JM (2014) Comparison of N₂ fixation inhibition and ureide accumulation under water deficit in four common bean genotypes of contrasting drought tolerance. *Ann Bot.* 113(6) 1071-1082

Díaz-Leal JL, Gálvez-Valdivieso G, Fernández J, Pineda M, Alamillo JM (2012) Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot.* 63: 4095-4106

Díaz-Leal JL, Torralbo F, Quiles F, Pineda M, Alamillo JM (2014) Molecular and functional characterization of allantoate amidohydrolase from *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* DOI: 10.1111/ppl.12157 (In press).

Gálvez-Valdivieso G, Alamillo JM, Fernández J, Pineda M (2013) Molecular characterization of *PVAS3*, an asparagine synthetase gene from common bean prevailing in developing organs. *J Plant Phys.* 170: 1484-1490

Gil-Quintana E, Larrainzar E, Seminario A, Díaz-Leal JL, Alamillo JM, Pineda M, Arrese-Igor C, Wienkoop S, González EM (2013) Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. *J Exp Bot.* 64: 2171-2182

King CA, Purcell LC (2005) Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiol.* 137: 1389-1396

Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 57: 805-836

GRUPO AGR238

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

COMPONENTES

RESPONSABLE: Barro Losada, Francisco fbarro@ias.csic.es

Gil Humanes, Javier javigil@ias.csic.es

Giménez Alvear, María José mjga06@ias.csic.es

Ozuna Serafini, Carmen cvozuna@ias.csic.es

García Molina, María Dolores..... mdgarcía@ias.csic.es

García Rull, Ana Adela agarcia@ias.csic.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
Grupo de Transformación genética y genómica funcional

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

La línea de investigación utiliza modernas tecnologías de Mejora Vegetal, como la transformación genética y ARN de interferencia (ARNi) en estudios de genómica funcional y en el desarrollo de nuevas variedades con alto valor añadido.

Objetivos prioritarios son:

i) ampliar la base genética de los cultivos mediante la identificación y clonación de caracteres de interés agrícola de especies silvestres y su introgresión en especies cultivadas.

ii) avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de la toxicidad de las proteínas del gluten de cereales en relación a la enfermedad celíaca y otras intolerancias al gluten.

iii) identificación de epítomos con muy baja toxicidad en cereales en relación a la celiaquía y su introgresión en especies cultivadas

iv) desarrollo de nuevas variedades de cereales aptas para celíacos y otros colectivos con intolerancia al gluten mediante técnicas clásicas y moleculares.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Javier Gil-Humanes, Fernando Pistón, Rossana Altamirano-Fortoul, Ana Real, Isabel Comino, Carolina Sousa, Cristina M. Rosell, Francisco Barro (2014). Reduced-gliadin wheat bread: an alternative to the gluten-free diet for consumers suffering gluten-related pathologies. *PLoS One* 9(3): e90898. doi:10.1371/journal.pone.0090898.

Fernando Pistón, Javier Gil-Humanes and Francisco Barro (2013). Integration of promoters, inverted repeat sequences and proteomic data into a model for high silencing efficiency of coeliac disease related gliadins in bread wheat. *BMC Plant Biology*, 13:136, doi:10.1186/1471-2229-13-136

Javier Gil-Humanes, Fernando Pistón, Stig Tollefsen, Ludvig M. Sollid, and Francisco Barro. (2010). Effective shut down in the expression of celiac disease related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(39) 17023-17028. DOI: 10.1073/pnas.1007773107.

Elena León, Racha Aouni, Fernando Piston, Marta Rodríguez-Quijano, Peter R. Shewry, Antonio Martín and Francisco Barro. (2010). Stacking HMW-GS transgenes in bread wheat: combining subunit 1Dy10 gives improved mixing properties and dough functionality. *Journal of cereal Science* 51: 13–20. doi:10.1016/j.jcs.2009.09.001.

Barro, F., Rooke, L., Bekes, F., Gras, P., Tatham, A.S., Fido, R., Lazzeri P.A. Shewry, P.R., and Barcelo, P. (1997). Transformation of wheat with HMW glutenin subunit genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnology* 15:1295-1299.

SERVICIOS OFERTADOS

1. Transformación genética de cereales. En colaboración o mediante contratación de servicios se oferta la producción de plantas transgénicas de trigo. El sistema de transformación es fundamentalmente biobalística, aunque también se dispone de la transformación mediada por *Agrobacterium*.
2. Producción de plantas haploides de brasicas mediante cultivo de microsporas.

PONENCIA

CEREALES PARA COMBATIR LA INTOLERANCIA AL GLUTEN: SILENCIAMIENTO DE GLIADINAS MEDIANTE RNAi Y DESARROLLO DE VARIETADES DE TRIGO APTAS PARA CELÍACOS

INTRODUCCIÓN

Las proteínas del gluten (gliadinas y gluteninas) son esenciales para la calidad harino-panadera de trigo. El impacto negativo de estas proteínas sobre la salud humana, en relación a las alergias e intolerancias, es poco conocido. Tres patologías están asociadas con las proteínas del grano de trigo: i) alergia al trigo, ii) enfermedad celiaca (EC), y iii) la sensibilidad al gluten no celiaca. Para las tres, el único tratamiento efectivo es una dieta libre de gluten durante toda la vida

La mayoría de los epítomos reconocidos por las células T intestinales de los enfermos celíacos residen en las gliadinas (49,5% en α -, 38,9% en γ - y 6,3 % en ω -gliadinas). La situación ideal sería obtener variedades de trigo libres de estas proteínas pero, dada su complejidad genética, las aproximaciones clásicas de mejora son muy difíciles de aplicar. Sin embargo, existe variabilidad en colecciones de trigo de diverso origen para la inducción de reactividad de clones de células T de pacientes EC, que podría ser aprovechada para obtener líneas menos tóxicas. También existen diferencias en cuanto a la toxicidad entre el trigo harinero y otras especies de trigo por lo que sería posible la introgresión de nuevas variantes de gliadinas mediante la incorporación de especies afines a programas de mejora para la obtención de líneas comerciales con baja toxicidad.

OBJETIVOS

Desarrollo de variedades de trigo aptas para celíacos y otros colectivos con intolerancia al gluten, que puedan ser usadas para la elaboración de pan con la calidad adecuada.

RESULTADOS

El grupo de Transformación genética y genómica funcional es pionero en la utilización de técnicas del ARNi para la mejora de la calidad del grano mediante el silenciamiento de genes relacionados con la EC, habiendo obtenido líneas de trigo harinero con las γ -gliadinas y con todas las gliadinas silenciadas, estas últimas de muy baja reactividad (Gil-Humanes y col, 2010). Estos trabajos se han continuado con la introgresión del silenciamiento de gliadinas en variedades comerciales, perfeccionamiento de nuevas

construcciones Gil-Humanes y col, 2012), y desarrollo de modelos integrando promotores, secuencias de silenciamiento y proteómica para un silenciamiento eficiente de las gliadinas de trigo (Pistón y col, 2013).

Puesto que diversos estudios muestran que la ingesta diaria de entre 10 y 50 mg de gluten pueden ser seguros para los celíacos (Catassi y col, hemos elaborado panes con líneas de trigo con los tres grupos de gliadinas fuertemente silenciados, y los hemos comparado con panes elaborados con harina normal y pan de harina de arroz. Los panes han sido estudiados en cuanto a sus propiedades organolépticas, nutricionales y inmunotóxicas. Los panes de trigos silenciados mostraron propiedades sensoriales, aptitud para el horneado, así como de aceptación general, similares a los de la harina normal, pero con hasta un 97 % menor contenido de gliadina (figura 1). Por otra parte, la harina de los trigos con bajo contenido en gliadina ha mejorado las propiedades nutricionales respecto al trigo control, ya su contenido de lisina es significativamente mayor que el de la harina normal. Las estimaciones más conservadoras indican que los pacientes celíacos podrían consumir con seguridad 67 gramos de pan de harina de estas líneas por día (Gil-Humanes y col, 2014). Aunque todavía se necesitan estudios adicionales, tales como los ensayos de alimentación con pacientes con intolerancia al gluten, con el fin de determinar si el producto puede o no ser consumido por la población celíaca general, así como la cantidad tolerada real que puede ser ingerida con seguridad, los resultados presentados aquí ofrecen una gran oportunidad para mejorar la calidad de vida de millones de personas que sufren de intolerancia al gluten en todo el mundo.

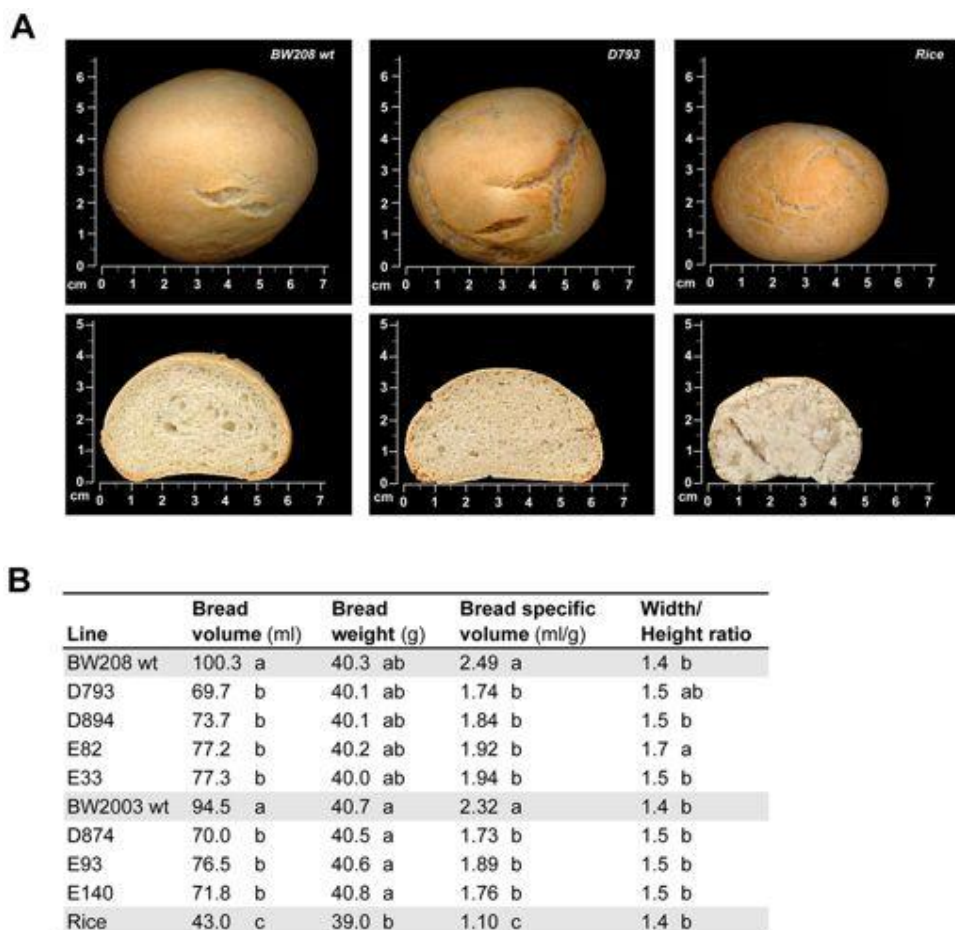


Figura 1. Pan con contenido en gliadina reducido: propiedades físicas. (A) Panes y rebanadas del trigo control BW208, de la línea con bajo contenido en gluten D793, y arroz. (B) Propiedades físicas de los pnes elaborados con líneas control, líneas con contenido en gliadinas disminuido, y arroz. De acuerdo al test *post-hoc* HSD Tukey, no existen diferencias significativas entre líneas con la misma letra ($P,0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0090898.g001

REFERENCIAS

Carlo Catassi, Elisabetta Fabiani, Giuseppe Iacono, Cinzia D'Agate, Ruggiero Francavilla, Federico Biagi, Umberto Volta, Salvatore Accomando, Antonio Picarelli, Italo De Vitis, Giovanna Pianelli, Rosaria Gesuita, Flavia Carle, Alessandra Mandolesi, Italo Bearzi, and Alessio Fasano (2007) A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease *Am J Clin Nutr* January 85: 1 160-166.

Javier Gil-Humanes, Fernando Pistón, Stig Tollefsen, Ludvig M. Sollid, and Francisco Barro. (2010). Effective shut down in the expression of celiac disease related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(39) 17023-17028. DOI: 10.1073/pnas.1007773107.

Javier Gil-Humanes, Fernando Pistón, María José Giménez, Antonio Martín, Francisco Barro (2012) The Introgression of RNAi Silencing of γ -Gliadins into Commercial Lines of Bread Wheat Changes the Mixing and Technological Properties of the Dough. *PLoS ONE* 7(9): e45937, doi:10.1371/journal.pone.0045937

Fernando Pistón, Javier Gil-Humanes and Francisco Barro (2013). Integration of promoters, inverted repeat sequences and proteomic data into a model for high silencing efficiency of coeliac disease related gliadins in bread wheat. *BMC Plant Biology*, 13:136, doi:10.1186/1471-2229-13-136

Javier Gil-Humanes, Fernando Pistón, Rossana Altamirano-Fortoul, Ana Real, Isabel Comino, Carolina Sousa, Cristina M. Rosell, Francisco Barro (2014). Reduced-gliadin wheat bread: an alternative to the gluten-free diet for consumers suffering gluten-related pathologies. *PLoS One* 9(3): e90898. doi:10.1371/journal.pone.0090898.

GRUPO AGR146

VITICULTURA Y ENOLOGÍA (*Vitenol*)

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Moreno Vigar, Juan Joséqe1movij@uco.es

García Martínez, María Teresami2gamam@uco.es

García Mauricio, Juan Carlosmi1gamaj@uco.es

Moreno García, Jaimejaime41@hotmail.com

Millán Pérez, María Del Carmen.....mi1mipec@uco.es

Mayén Riego, Manuelqe1marim@uco.es

Peinado Amores, Rafaelqe1peamr@uco.es

López De Lerma Extremera, Nieves..... b92loem@uco.es

Santiago Hurtado, José Ignaciojisantiag@gmail.com

Salor Torregrosa, José María.....lycaon13@gmail.com

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Química Agrícola y Edafología y Departamento de Microbiología. Campus de Excelencia Agro-Alimentario de Andalucía. Universidad de Córdoba.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. **Proteómica y metabolómica de levaduras.** Estudio de las interacciones entre proteínas y metabolitos de levaduras en condiciones de estrés característicos de la fermentación alcohólica y de la crianza biológica de los vinos.
2. **Inmovilización de células de levaduras y aplicaciones.** Bio-inmovilización de levaduras seleccionadas para la elaboración de diferentes tipos de vinos y para la obtención de bioetanol.
3. **Elaboración de vinos dulces.** Tratamientos post-cosecha y pre-fermentativos para elaborar diferentes tipos de vinos dulces. Fermentaciones parciales con levaduras osmo-etanol-tolerantes y enriquecimiento de los vinos en moléculas de acción antioxidante.
4. **Caracterización y control de la crianza de vinos.** Caracterización del estado de crianza biológica de los vinos finos andaluces y estudio de

los factores que influyen en ella: cepa de levadura, contenido en oxígeno y aporte de la madera a la crianza.

5. **Caracterización y aprovechamiento de subproductos de la industria vitivinícola.** Capacidad antioxidante de distintas fracciones de las uvas y derivados, influencia de los tratamientos post-cosecha. Aplicaciones al enriquecimiento de alimentos y bebidas en moléculas con efecto beneficioso para el organismo humano.
6. **Producción de hidromiel con levaduras vínicas.** Selección de levaduras vínicas para la elaboración de hidromiel en base a su cinética de fermentación, rendimiento en etanol y características organolépticas.
7. **Desarrollo de sensores electroquímicos para la detección y cuantificación de compuestos en mostos y vinos.** En colaboración con el Grupo de Investigación FQM-198. Construcción de sensores y biosensores electroquímicos para determinación de compuestos de interés enológico, mediante nuevos materiales.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Moreno-García, J, García-Martínez, T, Moreno, J, Millán, MC, Mauricio, JC (2014) A proteomic and metabolomic approach for understanding the role of the flor yeast mitochondria in the velum formation *Int J Food Microbiol.* 172: 21–29

García-Martínez, T, Puig-Pujol, A, Peinado, RA, Moreno, J, Mauricio, JC (2012) Potential use of wine yeast immobilized on *Penicillium chrysogenum* for ethanol production *J Chem Technol Biot.* 87: 351-359

Moreno-García, J, Raposo, RM, Moreno, J (2013) Biological aging status characterization of sherry type wines using statistical and oenological criteria *Food Res Int.* 54:285–292

García-Martínez, T, Bellincontro, A, López De Lerma-Extremera, MN, Peinado, RA, García-Mauricio, JC, Mencarelli, F, Moreno, J (2011) Discrimination of sweet wines partially fermented by two osmo-ethanol-tolerant yeasts by gas chromatographic analysis and electronic nose *Food Chem.* 127:1391-1396.

García-Martínez, T, Peinado, RA, Moreno, JJ, García-García, I, García-Mauricio, JC (2011) Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading to the immobilization of yeast *J Chem Technol Biot.* 86:912-817

PONENCIA

PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA DE LEVADURAS VÍNICAS.

RESUMEN

Proteómica y metabolómica son ciencias complejas que han experimentado un notable desarrollo en las últimas décadas. Su interés científico radica en el enorme número de proteínas que son compatibles con un mismo genoma y a que algunos cambios que experimenta el proteoma no son codificados por el genoma y se deben fundamentalmente a la edición del ARNm y a modificaciones post-traduccionales. Los estudios del metaboloma despiertan actualmente interés por su posición final en el diagrama de información biológica: genotipo/genoma/transcriptoma/proteoma/metaboloma/fenotipo y porque sus cambios están relacionados con niveles superiores del sistema biológico y pueden usarse como indicadores para evaluar y comprender los mecanismos moleculares de respuesta de los microorganismos a factores de estrés ambiental. El uso de estas ciencias en el estudio del comportamiento de levaduras fermentativas de uso industrial en situaciones de estrés genera un conocimiento, cuya aplicación práctica es la mejora de los procesos fermentativos y la diversificación de las bebidas obtenidas, y también la mejora del rendimiento en los procesos de obtención de bioetanol.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras fermentativas de interés enológico son seleccionadas fundamentalmente por su rendimiento en etanol y su capacidad de aportar al vino determinadas características organolépticas valoradas positivamente por los consumidores. El comportamiento de estas levaduras está influido por factores físicos y químicos impuestos por el medio de composición cambiante en que se desarrollan y que afecta a su viabilidad y productividad (Stanley et al., 2010). Para mantener su supervivencia, los microorganismos desarrollan un conjunto de respuestas al estrés provocado por los cambios en el medio (Ding et al., 2009; Dinh et al., 2009) que afectan a su proteoma y metaboloma y que se refleja en cambios en la composición y concentraciones del conjunto de metabolitos excretados al medio.

La proteómica se diferencia de otras disciplinas ómicas por su complejidad, ya que el número de proteomas obtenidos a partir de un genoma específico es extenso, variable y dependiente de la cepa de levadura ensayada, además de las condiciones del medio de cultivo. El estudio proteómico de los

microorganismos está justificado por la existencia de cambios en el proteoma que no están codificados en el genoma debido fundamentalmente a la edición del ARNm y a modificaciones postraduccionales (PTM). De acuerdo con Rodríguez et al., (2012), la información que proporciona la proteómica de levaduras vínicas no sólo es útil para controlar la fermentación y para garantizar la calidad del vino obtenido, sino que además ofrece excelentes perspectivas para la mejora de los procesos fermentativos y la diversificación en el futuro próximo.

Por otra parte, el notable desarrollo que los estudios metabolómicos han experimentado en las últimas décadas se justifica por la posición final que el metaboloma ocupa en el diagrama de información biológica: genotipo/genoma/transcriptoma/proteoma/metaboloma/fenotipo. Los cambios en el metaboloma están relacionados con cambios producidos en los niveles superiores del sistema biológico y pueden usarse como indicadores, constituyendo una poderosa herramienta para evaluar y comprender los mecanismos moleculares de respuesta de un microorganismo a factores de estrés ambiental (Li et al., 2012) y a estímulos externos (van Ravenzwaay et al., 2007).

Aunque hasta la actualidad se han realizado importantes progresos, aún es necesario comprender plenamente el mecanismo de tolerancia al etanol y a grandes concentraciones de azúcares en levaduras de interés enológico.

La información aportada por los estudios del proteoma y metaboloma ayudará a mejorar los procesos de elaboración de bebidas fermentadas, incidiendo particularmente en su calidad y diversificación (Li et al., 2012). También mejorará los procesos fermentativos de diferentes sustratos procedentes de subproductos o residuos de las industrias agro-alimentarias utilizados en la obtención de bioetanol, aumentando su rendimiento y reduciendo la demanda de energía en la separación posterior del etanol de la mezcla hidro-alcohólica que es el medio fermentado (Krause et al., 2007).

OBJETIVOS

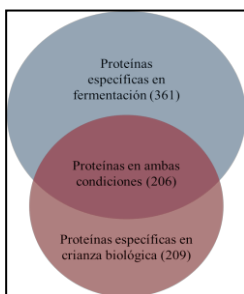
Estudiar los cambios en el proteoma de levaduras provocados por elevadas concentraciones de azúcares fermentables y de etanol en el medio y establecer relaciones con los metabolitos producidos, con el fin de mejorar los procesos industriales.

RESULTADOS

Se ha estudiado el comportamiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* G1, en dos condiciones de estrés, simulando los procesos fermentativos y de formación de velo de flor y utilizando las técnicas de identificación de proteínas LTQ-Orbitrap XL MS y de análisis metabolómico GC-FID y SBSE-GC-

MS. Esta levadura diauxica fué aislada en las fermentaciones y en el proceso de crianza biológica de los vinos finos andaluces y seleccionada por su elevada producción de etanol y su capacidad de formar velo de flor.

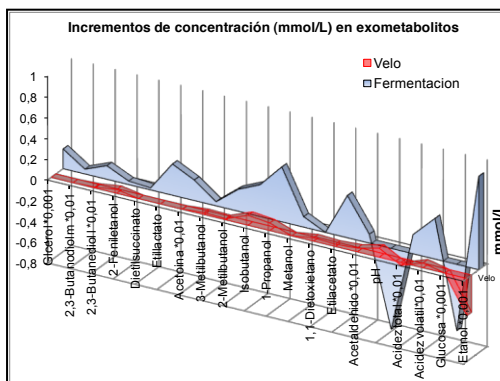
Como se puede ver en el diagrama de Venn adjunto, se han identificado 361 proteínas en fermentación y la mayoría están relacionadas con la glucolisis y el estrés osmótico. Otras 209 proteínas en condiciones de formación de velo, relacionadas con la respiración y estrés oxidativo y 206 proteínas comunes a las dos condiciones estudiadas, la mayoría implicadas en la gluconeogénesis.



En la siguiente figura se muestra el diferente comportamiento de la levadura de velo *S. cerevisiae* G1 en los dos medios ensayados que implica cambios relevantes en algunos exometabolitos relacionados

con la calidad del vino. El uso de bases de datos con información sobre el genoma y proteoma de levaduras y de análisis estadísticos avanzados permite relacionar los cambios observados en el metaboloma con las proteínas implicadas.

Más información sobre estos aspectos puede encontrarse en la publicación de Moreno-García et al., (2014).



REFERENCIAS

Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K (2009) Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85:253–263

Dinh TN, Nagahisa K, Yoshikawa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu, H (2009) Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Bioprocess Biosyst Eng.* 32:681–688

Krause EL, Villa-García MJ, Henry SA, Walker LP (2007) Determining the effects of inositol supplementation and the *opi1* mutation on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ind Biotechnol.* 3: 260-268

Li H, Ma M, Luo S, Zhang R, Han P, Hu W (2012) Metabolic responses to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* using a gas chromatography tandem mass spectrometry-based metabolomics approach. *Int J Biochemistry & Cell Biology* 44, 1087–1096

Moreno-García J, García-Martínez T, Moreno J, Millán, MC, Mauricio JC (2014) A proteomic and metabolomic approach for understanding the role of the flor yeast mitochondria in the velum formation. *Int J Food Microbiology*, 172: 21–29

Rodríguez ME, Rebordinos L, Muñoz-Bernal E, Fernández-Acero FJ, Cantoral, JM (2012) Application of gel electrophoresis techniques to the study of wine yeast and to improve winemaking. *Chapter 1 Gel Electrophoresis - Advanced Techniques*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed)

Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA (2010) The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 109:13–24

van Ravenzwaay B, Cunha GC, Leibold E, Looser R, Mellert W, Prokoudine A, Walk T, Wiemer J (2007) The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect. *Toxicol Lett.* 172:21–28

AGRADECIMIENTOS: RTA2011-00020-C02-02, MINECO-INIA-CCAA-FEDER.

GRUPO AGR164

BIOQUÍMICA Y PROTEÓMICA VEGETAL Y AGROFORESTAL

COMPONENTES:

Tena Aldave, Manuel (bb1tealm@uco.es)
Jorrín Novo, Jesus V (bf1jonoj@uco.es) (Responsable)
Molina Gómez, Mari Carmen (bb3mogom@uco.es)
Romero Rodríguez, Cristina (mcr_21@hotmail.com)
González Fernández, Raquel (q42gofer@uco.es)
Simova, Lyudmila (lpimova@yahoo.co.uk)
Valero Galván, José (bb2vagaj@uco.es)
Sghaier-Hammami, Bisma (sghaierbesma@yahoo.fr)
Maldonado Alconada, Ana M. (bb2maala@uco.es)
Redondo López, Inmaculada (bb2reloi@uco.es)
Sekvan Demir (sekvandemir@gmail.com)
Sánchez Lucas, Rosa (g82salur@uco.es)
Archidona Yuste, Antonio (g82aryua@uco.es)
Alberto Cañibano Hernández (z32cahea@uco.es)
Muhittin Kulak (muhyttynx@gmail.com)

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba-campus de Excelencia Internacional Agroalimentaria, CeIA3.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Bioquímica y Biología Molecular Vegetal y Agroforestal.
2. Proteómica (plantas, hongos fitopatógenos, levaduras).
Modificaciones postraduccionales, proteoma redox.
3. Transcriptómica, marcadores moleculares de DNA.
4. Aspectos moleculares relacionados con la variabilidad, embriogénesis y respuesta a estreses bióticos y abióticos en plantas.
5. Investigación traslacional: trazabilidad alimentaria y caracterización de alérgeno

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Se incluyen aquellas publicaciones más representativas publicadas en el periodo 2012-2014.

JORRÍN-NOVO J. V., VALLEDOR L. (eds.) 2013. Translational Plant Proteomics. *Journal of Proteomics*, 93,. 1-398.

JORRÍN-NOVO J.V., KOMATSU S., WECKWERTH W., WIENKOOP S. (Eds.). 2013. *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 2nd edition. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1072, Humana Press, 786 p. ISBN 978-1-62703-630-6.

VALERO-GALVÁN J., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ R., NAVARRO-CERRILLO R.M, GIL-PELEGRÍN E., AND JORRÍN-NOVO J.V. 2013. Physiological and Proteomic Analyses of Drought Stress Response in Holm Oak Provenances. *Journal of Proteome Research* 12, 5110-5123.

SGHAIER-HAMMAMI B, VALERO-GALVÁN J, ROMERO-RODRÍGUEZ MC, NAVARRO-CERRILLO RM, ABDELLY C, JORRIN-NOVO JV. 2013 Physiological and proteomics analyses of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) responses to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Physiology and Biochemistry* 71,191-202.

GONZALEZ-FERNANDEZ R, ALORIA K., ARIZMENDI J., AND JORRIN-NOVO J.V. **2013** Application of Label-Free Shotgun nUPLC–MSE and 2-DE Approaches in the Study of *Botrytis cinerea* Mycelium. *Journal of Proteome Research* 12, 3042-3056

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ R., ALORIA K., VALERO-GALVÁN J., REDONDO I., ARIZMENDI J., JORRÍN-NOVO J.V. 2014. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. *Journal of Proteomics* 97, 195-221.

ROMERO-RODRÍGUEZ MC, VÁZQUEZ JP, VALLEDOR L, AND JORRÍN-NOVO J. 2014 Improving the quality of protein identification in non-model species. Characterization of *Quercus ilex* seed and *Pinus radiata* needle proteomes by using SEQUEST and custom databases. *Journal of Proteomics* (*In press*)

PONENCIA

DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA TRANSLACIONAL EN EL ÁREA AGROFORESTAL, CARACTERIZACIÓN DE BIODIVERSIDAD, TRAZABILIDAD ALIMENTARIA Y DETECCIÓN DE ALÉRGENOS

RESUMEN

En esta comunicación se resume lo que ha sido la actividad investigadora y producción científica del Grupo de Investigación “Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agroforestal” (AGR-164) durante el periodo 2012-2014. Se presentan, además, nuevos proyectos que pretenden ajustarse a los objetivos priorizados en este momento, como son la investigación translacional y biomédica, sin olvidar de que la función primordial de la Universidad, más allá de las líneas y metodologías, es la formación de estudiantes de grado, máster y doctorado.

INTRODUCCIÓN

En nuestro grupo de trabajo una de las líneas es la proteómica vegetal y agroforestal, siendo la encina la especie más estudiada. La relevancia de la investigación forestal, en general, y de la encina, en particular, se pone de manifiesto y queda reflejado en: i) la importancia de las especies forestales en el secuestro del carbono, ciclo del agua, protección del suelo y reserva de biodiversidad); ii) el incremento en los programas de reforestación; ii) la elaboración de una normativa específica sobre la dehesa¹. La conservación de la dehesa es, en este momento, un objetivo prioritario, entendido como forma de preservar, desarrollar y revalorizar su riqueza económica, biológica, ambiental, social y cultural, por lo que se hace necesario promover su gestión de una manera integral y sostenible; todo ello a través de su estudio y el desarrollo de nuevas estrategias y técnicas aplicadas al manejo y mantenimiento sostenible del sistema agroforestal.

El manejo y mantenimiento sostenible del sistema agroforestal requerirá la identificación de rodales selectos y genotipos productivos y adaptados a condiciones ambientales adversas, para lo que habrá que

¹ “Ley 7/2010 para la Dehesa”, BOJA 144, 2010, de la Junta de Andalucía; Directiva “Habitats”, 92/43/CEE.

explotar la variabilidad natural existente en encina (típica de especies alógamas poco intervenidas por el hombre). Es necesario establecer y consolidar una línea de investigación sobre el estudio de la variabilidad en encina y la selección de árboles “plus” que una técnicas de análisis fenotípico y molecular con estudios de relaciones filogenéticas y de dinámica poblacional.

Hemos iniciado nuevos proyectos que pretenden ajustarse a los objetivos priorizados en este momento, como son la investigación translacional y biomédica, sin olvidar de que la función primordial de la Universidad, más allá de las líneas y metodologías, es la formación de estudiantes de grado, máster y doctorado. La investigación traslacional en el área agroalimentaria tiene como objetivo el uso de la investigación básica en la generación de tecnologías innovadoras que son cruciales para el crecimiento económico y agrícola, contribuyendo así a satisfacer las necesidades de alimentos, fibra, combustible, etc.(Jorrín-Novo and Valledor 2013). Este concepto está muy bien comprendido en el campo de la biomedicina, no así en el área ambiental y agrícola.

En concreto, pretendemos aplicar técnicas de uso rutinaria en nuestro laboratorio (p.e. proteómica) a la trazabilidad alimentaria. Según el Comité de Seguridad Alimentaria de AECOC (Asociación Española de Codificación Comercial) “Se entiende trazabilidad como el conjunto de aquellos procedimientos preestablecidos y autosuficientes que permiten conocer el histórico, la ubicación y la trayectoria de un producto o lote de productos a lo largo de la cadena de suministros en un momento dado, a través de unas herramientas determinadas”. Estos sistemas permiten el seguimiento y localización del producto a través de la cadena de procesamiento del alimento y además en la cadena comercial. La implantación de este sistema implica la incorporación nuevas tecnologías, como la proteómica o genómica, que permitan la detección y el registro de los datos relacionados al proceso de producción hasta que este llegue al consumidor. La implantación del sistema de trazabilidad sirve además para localizar un producto inseguro de forma rápida y eficaz para evitar que llegue al consumidor; además permite evitar fraudes relacionados a la autenticidad de un alimento.

Por último, abordamos la caracterización de alérgenos presentes en muestras de polen de distintas especies alergógenas entre las que se incluyen el olivo, pino, encina y gramíneas; y en muestras de aire colectadas en distintos meses del año. Mediante el uso de la proteómica se pretende identificar proteínas alergénicas correspondientes a las distintas especies mencionadas además de las que están descritas, y además identificar las proteínas que permanecen en las muestras de aire durante los picos de casos de alergia.

OBJETIVOS

1. Estudio de la variabilidad mediante marcadores moleculares: Proteotipado y genotipado de poblaciones.
2. Proteómica de polen de distintas especies alergógenas y de muestras de aire.
3. Análisis proteómico de alimentos.

RESULTADOS

Se han llevado a cabo estudios de variabilidad en poblaciones de encinas mediante análisis morfométrico, NIRS (contenido en proteínas, almidón, lípidos y ácidos grasos)(Valero Galván, Jorrín Novo et al. 2012), y proteómico de bellotas y polen(Valero Galván, Valledor et al. 2011; Valero Galván, Valledor et al. 2012). Los resultados permitieron agrupar poblaciones de acuerdo a su localización latitudinal y actitudinal. La variabilidad en el perfil proteico de semillas y polen fue inferior al encontrado en hojas (Jorge et al., 2005, 2006, Echevarría-Zomeño et al., 2009), cuyo análisis no permitió discriminar claramente entre poblaciones. Esto es debido al carácter dinámico del proteoma, como fenotipo molecular, y, por lo tanto, a la influencia del ambiente.

Teniendo en cuenta las limitaciones de la aproximación de proteómica, se planteó, en paralelo, el análisis de la variabilidad utilizando técnicas de marcadores moleculares de DNA. En relación a este punto, se optimizó, para *Quercus* métodos de extracción y análisis de DNA y RNA (Echevarría Zomeño, 2011; Echevarría Zomeño et al., 2012). El tipo de marcador molecular más utilizado para los análisis genéticos o análisis de “huella genética” son los microsátélites o SSR (short sequence repeat). Dicha estrategia ha sido utilizada por nuestro grupo, aunque para un número reducido de poblaciones, el polimorfismo de los SSR nucleares no ha permitido realizar una agrupación con respecto a las

procedencias de las poblaciones analizadas. En cambio los datos obtenidos de diversas regiones polimórficas en el genoma haploide del cloroplasto carente de recombinación y con herencia uniparental paterna, nos permitió agrupar las poblaciones según su procedencia geográfica y podría afirmar las hipótesis de migraciones de poblaciones de encina propuestas por Lumaret (Lumaret, Mir et al. 2002).

En el ámbito de la investigación translacional, se están poniendo a punto técnicas de proteómica basadas en espectrometría de masas e inmunológicas (ELISA, western) para el análisis de alérgenos en muestras de polen y aire, y para el análisis simultáneo de DNA, RNA y proteínas en aceite y alimentos infantiles.

El grupo de investigación continúa o ha iniciado recientemente colaboraciones con otros grupos de nuestro departamento (Prof. Manuel Rodríguez, Prof. Gabriel Dorado), Universidad (Prof. Rafael Navarro; Prof. Carmen Galán, Prof. Ricardo Fernández), otras Universidades Españolas (Dr. Luis Valledor) y Extranjeras (Dr. Christof Lenz, Universidad de Gottingen, Prof. Luz M Melgarejo, Universidad Nacional de Colombia, Prof. Francisco Cabello, Universidad de Rennes, Dr. Gabriel Donoso, INIA Chile).

REFERENCIAS

- Abril et al. 2011. *Phytochemistry* 72: 1219-1242.
- Echevarría-Zomeño et al. 2009. *J Plant Physiol* 66:233–45.
- Jorge et al. 2005. *Proteomics* 2005(5):222–34.
- Jorge et al. 2006. *Proteomics* 6:S207–14.
- Jorrín Novo JV et al. 2009. *Journal of Proteomics* 72: 285-314.
- Jorrín Novo JV et al. 2012. En: *Frontiers in Agriculture Proteome Research: Contribution of proteomics technology in agricultural sciences* (HP Mock, ZY Wang, S Komatsu, ed.). ISBN 978-4-904633-99-1
- Sghaier-Hammami et al. 2012. *Phytochemistry*.
- Valero Galván et al. 2011. *Journal of Proteomics* 74: 1244-1255.
- Valero Galván et al. 2012a. " *European Journal of Forest Research* 131: 893-904
- Valero Galván et al. 2012b. *Journal of Proteomics* 74: 1244-1255.

GRUPO AGR164

BIOQUÍMICA Y PROTEÓMICA VEGETAL Y AGROFORESTAL

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Rodríguez Ortega, Manuel José..... mjrodriguez@uco.es

Olaya Abril, Alfonsob22olaba@uco.es

Jiménez Munguía, Irene z82jimui@uco.es

Cañete Buenestado, Manuelb82cabum@uco.es

Morgado Masa, Pilarz32momap@uco.es

Obando Santaella, Ignacio.....iobando@us.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba; Sección de Enfermedades Infecciosas Pediátricas e Inmunopatología, Hospital Universitario Infantil Virgen del Rocío, Sevilla.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Identificación mediante proteómica de proteínas antigénicas de superficie de bacterias Gram-positivas patógenas con fines vacunales y de diagnóstico.
2. Caracterización de vesículas de membrana derivadas de la superficie de bacterias patógenas y su función en la interacción patógeno-hospedador.
3. Caracterización de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana y estudio de los mecanismos de acción.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Rodríguez-Ortega MJ, Norais N, Bensi G, Liberatori S, Capo S, Mora M, Scarselli M, Doro F, Ferrari G, Garaguso I, Maggi T, Neumann A, Covre A, Telford JL, Grandi G (2006). "Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of group A *Streptococcus* surface proteome". *Nature Biotechnology*, 24(2): 191-197.

Olaya-Abril A, Gómez-Gascón L, Jiménez-Munguía I, Obando I, Rodríguez-Ortega MJ (2012). "Another turn of the screw of shaving Gram-positive bacteria: optimization of proteomics surface identification in *Streptococcus pneumoniae*". *Journal of Proteomics*, 75 (12): 3733-3746.

Gómez-Gascón L, Luque I, Olaya-Abril A, Jiménez-Munguía I, Orbegozo-Medina RA, Peralbo E, Tarradas C, Rodríguez-Ortega MJ (2012). "Exploring the pan-surfome of *Streptococcus suis*: looking for common protein antigens". *Journal of Proteomics*, 75 (18): 5654-5666.

Olaya-Abril A, Jiménez-Munguía I, Gómez-Gascón L, Obando I, Rodríguez-Ortega MJ (2013). "Identification of potential new protein vaccine candidates through pan-surfomic analysis of pneumococcal clinical isolates from adults". *PLoS One* Jul 23;8(7):e70365.

Olaya-Abril A, Prados-Rosales R, McConnell MJ, Martín-Peña R, González-Reyes JA, Jiménez-Munguía I, Gómez-Gascón L, Fernández J, Luque-García JL, García-Lidón C, Estévez H, Pachón J, Obando I, Casadevall A, Pirofski LA, Rodríguez-Ortega MJ (2014). "Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*". *Journal of Proteomics*, en prensa.

PONENCIA

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y ESTRUCTURAS DERIVADAS DE LA SUPERFICIE DE BACTERIAS PATÓGENAS GRAM-POSITIVAS CON FINES DE VACUNAS Y DIAGNÓSTICO

RESUMEN

Las proteínas de superficie bacteriana desempeñan un papel fundamental en la interacción entre célula y ambiente. Constituyen un grupo diverso de moléculas con importantes funciones. Además, son dianas potenciales de fármacos, así como de vacunas, ya que son las moléculas que tienen mayor probabilidad de ser reconocidas por los elementos del sistema inmune. Por otro lado, pueden ser la base para el desarrollo de nuevas y más eficaces herramientas de diagnóstico de infección temprana en pacientes, basadas en el empleo de sueros de personas infectadas. Nuestro grupo de investigación tiene como líneas principales de trabajo la identificación en bacterias patógenas Gram-positivas de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*, mediante estrategias proteómicas, de aquellas proteínas de superficie más prometedoras que cumplan los requisitos para el desarrollo de nuevas vacunas y herramientas de diagnóstico (o sea, expuestas en superficie, inmunogénicas y comunes a los serotipos más prevalentes y virulentos). Además, estudiamos el papel de las vesículas de membrana que estos organismos producen en la interacción patógeno-hospedador.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de superficie bacteriana desempeñan un papel fundamental en la interacción entre célula y ambiente {Navarre, 1999 #11}. Están implicadas en la adhesión e invasión a las células hospedadoras, señalización, defensa, toxicidad, etc. Por tanto, son dianas potenciales de medicamentos dirigidos a prevenir infecciones y enfermedades bacterianas {Janulczyk, 2001 #7; Zagursky, 2003 #8}. Aún más, ya que las proteínas de superficie pueden interactuar con el sistema inmune, pueden convertirse en componentes de vacunas eficaces {Rappuoli, 2003 #10}. Muchos microbios producen además vesículas de membrana que liberan al exterior, con fines tanto de defensa como de ataque a los organismos a los que infectan. Sólo recientemente han empezado a describirse estas estructuras en bacterias Gram-positivas.

En los últimos años, ha crecido mucho la preocupación debido al gran aumento de las infecciones por bacterias Gram-positivas de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*, debido a la creciente resistencia a los antibióticos convencionales. Por tanto, se requieren nuevas armas para poder luchar contra las infecciones causadas por estos microorganismos, cuyas frecuencias están incrementándose en los países desarrollados. Asimismo, se

requieren técnicas de diagnóstico temprano más eficaces que las existentes, y que puedan servir además para monitorizar poblaciones en programas de vigilancia epidemiológica. Los mejores candidatos para nuevas vacunas y moléculas diagnósticas son las proteínas de superficie. En nuestro grupo, aplicamos técnicas proteómicas para identificarlas, principalmente aquella basada en el “pelado” de bacterias vivas con proteasas y el posterior análisis de los péptidos resultantes mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

OBJETIVOS

1. Identificar mediante proteómica un conjunto de proteínas de las especies de trabajo que puedan ser usadas con fines vacunales y de diagnóstico.
2. Ensayar la capacidad de protección de dichas proteínas en modelos animales.
3. Desarrollar chips de proteínas que puedan usarse como herramientas de diagnóstico de infección.
4. Estudiar el papel de las vesículas de membrana en la interacción patógeno-hospedador.

RESULTADOS

La estrategia del “pelado” de células bacterianas vivas con proteasas, originalmente descrita en el patógeno *Streptococcus pyogenes* (Rodríguez-Ortega 2006), ha sido aplicada en tres bacterias con las que trabajamos: *Streptococcus suis*, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) y *Staphylococcus aureus*. En todos los casos, tras la optimización del protocolo para cada especie, hemos analizado sendas colecciones de aislados clínicos para determinar el “pansurfoma” o conjunto de proteínas de superficie, con el fin de encontrar nuevos candidatos para vacunas y diagnóstico. En *S. suis*, hemos encontrado una proteína protectora en ratones (Mandanici 2010), y otra cuyos resultados en cerdos han sido menos satisfactorios (Gómez-Gascón 2012). En neumococo, tras una optimización inicial más compleja, debido al fenómeno de autólisis que experimenta (Olaya-Abril 2012), hemos determinado potenciales candidatos proteicos en colecciones de aislados clínicos de adultos (Olaya-Abril 2013) y niños (resultados aún no publicados), pero los ensayos de protección aún no han dado resultados concluyentes. Los análisis en *S. aureus* son aún algo preliminares. Por otra parte, hemos descrito por primera vez la producción de vesículas extracelulares derivadas de membrana en neumococo, cuyo mecanismo de biogénesis queremos comprender. Hemos obtenido una alta tasa de protección en ratones inmunizados con dichas vesículas (Olaya-Abril 2014), y hemos estudiado el

efecto de las mismas sobre el sistema inmune, viendo que inducen la producción de citoquinas proinflamatorias y la muerte por apoptosis de macrófagos (resultados aún no publicados).

REFERENCIAS

Navarre WW, Schneewind O (1999). "Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope." *Microbiol Mol Biol Rev* 63(1): 174-229.

Zagursky RJ, Olmsted SB, et al. (2003). "Bioinformatics: how it is being used to identify bacterial vaccine candidates." *Expert Rev Vaccines* 2(3): 417-36.

Rappuoli R, Covacci A (2003). "Reverse vaccinology and genomics." *Science* 302(5645): 602.

Rodríguez-Ortega MJ, Norais N, et al (2006). "Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of group A *Streptococcus* surface proteome". *Nature Biotechnology*, 24(2): 191-197.

Mandanici F, Gómez-Gascón L, et al (2010). "A surface protein of *Streptococcus suis* serotype 2 identified by proteomics protects mice against infection". *Journal of Proteomics*, 73 (12): 2365-2369.

Olaya-Abril A, Gómez-Gascón L, et al (2012). "Another turn of the screw of shaving Gram-positive bacteria: optimization of proteomics surface identification in *Streptococcus pneumoniae*". *Journal of Proteomics*, 75 (12): 3733-3746.

Gómez-Gascón L, Luque I, et al (2012). "Exploring the pan-surfome of *Streptococcus suis*: looking for common protein antigens". *Journal of Proteomics*, 75 (18): 5654-5666.

Olaya-Abril A, Jiménez-Munguía I, et al (2013). "Identification of potential new protein vaccine candidates through pan-surfomic analysis of pneumococcal clinical isolates from adults". *PLoS One* Jul 23;8(7):e70365.

Olaya-Abril A, Prados-Rosales R, et al (2014). "Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*". *Journal of Proteomics*, en prensa.

Ponencia empresa

MAGTEL (MAGTEL OPERACIONES)

COMPONENTES:

RESPONSABLE: López Banderas, Francisco..... flopez@magtel.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de I+D+i

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Diseño óptimo de plantas basadas en la hibridación de fuentes renovables de la energía.

Predicción, control y automatización: Nowcasting y Forecasting.

Gestionabilidad de la planta: estabilidad la producción mediante las soluciones técnicas en almacenamiento, hibridación y GDV.

Mantenimiento de centrales: Calibración y limpieza. Técnicas y procesos clave para reducir el riesgo de degradación del HTF y de los equipos.

Optimización de la operación: transitorios, refinado de tiempos de arranque y paradas para maximizar la producción de la planta.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Solar Parabolic Trough – Biomass Hybrid Plants: a costefficient

concept suitable for places in low irradiation conditions. 17th International SolarPACES Symposium on Solar Thermal Concentrating Technologies, Sept 2010.

Concept design of an optimized thermosolar-biomass hybridization plant based on the COEL values. SolarPACES Symposium on Solar Thermal Concentrating Technologies, Sept 2011.

Solar Parabolic Through - Biomass Hybrid Plants: Features and Drawbacks. SolarPACES Symposium on Solar Thermal Concentrating Technologies, 2012.

Thermal Design and Optimization. Symposium on Solar Thermal Concentrating Technologies. CSP Today, Nov 2013.

Tower & CCP: reducing LCOE. Dossier on Solar Thermal Concentrating Technologies. CSP Today Eng., Jun 2013.

PONENCIA

PRIORIDADES DE I+D+I EN EL SECTOR TERMOSOLAR

RESUMEN

Aspectos claves sobre las líneas de investigación y desarrollo tecnológico en el sector de la solar termoeléctrica y diversas técnicas innovadoras de mantenimiento predictivo, así como las posibilidades en hibridación con biomasa de esta tecnología

INTRODUCCIÓN

La potencia termosolar instalada actualmente en España asciende a 382 MW. En 2013, con las 60 plantas finalizadas, se alcanzarán los 2.500 MW, y en 2020, las previsiones apuntan a que alcanzará los 10.000 MW.

OBJETIVOS

- * Descubrir los fundamentos de las técnicas y equipos empleados en el diseño de sistemas de aprovechamiento térmico de alta temperatura
- * Adquirir nociones básicas que permitan abordar convenientemente problemas relacionados con los procesos de generación eléctrica termosolar.
- * Capacitar desde el punto de vista técnico, organizativo y de gestión para la elaboración de proyectos de generación eléctrica de origen termosolar.
- * Integración de dos de las principales fuentes de energía de origen renovable hacia la acción generadora de electricidad. Hibridación sol-biomasa.

RESULTADOS

A partir de las investigaciones realizadas hemos podido comprobar que la hibridación de las centrales solares termoeléctricas con biomasa permitiría mejorar su rendimiento, disminuir su coste de generación y disminuir su impacto medioambiental por una menor superficie ocupada por MWh producido.

De esta manera, hemos podido llegar a la conclusión de que los conceptos de rendimiento, coste de generación e impacto medioambiental están directamente relacionados, de manera que cuanto mayor rendimiento tenga una central de producción de energía eléctrica a partir de una fuente renovable de energía, tendrá asociado un menor coste de generación y

además tendrá un menor impacto medioambiental asociado y, por lo tanto, será más sostenible. El objetivo final es demostrar, mediante la instalación de una planta piloto de demostración, la viabilidad técnica y económica de un nuevo concepto de planta híbrida solar – gasificación de la biomasa.

Gracias también a nuestra labor investigadora acerca de esta tecnología, se ha adquirido un conocimiento sobre problemas asociados a las condiciones de trabajo en planta, que requieren de una solución eficaz.

REFERENCIAS

Solar Parabolic Trough – Biomass Hybrid Plants: a costefficient concept suitable for places in low irradiation conditions. 17th International SolarPACES Symposium on Solar Thermal Concentrating Technologies, Sept 2010.

Concept design of an optimized thermosolar-biomass hybridization plant based on the COEL values. SolarPACES Symposium on Solar Thermal Concentrating Technologies, Sept 2011.

Solar Parabolic Through - Biomass Hybrid Plants: Features and Drawbacks. SolarPACES Symposium on Solar Thermal Concentrating Technologies, 2012.

Thermal Design and Optimization. Symposium on Solar Thermal Concentrating Technologies. CSP Today, Nov 2013.

Tower & CCP: reducing LCOE. Dossier on Solar Thermal Concentrating Technologies. CSP Today Eng., Jun 2013.

Sostenibilidad energética - Agenda 2013. Revista Economía Industrial. Jun 2013. Pág. 47-48.

GRUPO BIO117

METABOLISMO DEL NITRÓGENO MICROBIANO

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Moreno Vivían, Conrado bb1movic@uco.es
 Roldán Ruiz, María Doloresbb2rorum@uco.es
 Caballero Domínguez, Francisco Javierbb1cadof@uco.es
 Luque Almagro, Víctor Manuel..... b42lualv@uco.es
 Sáez Melero, Lara Paloma bb2samel@uco.es
 Manso Cobos, Isabel María b72macoi@uco.es
Ibáñez García, María Isabel b32ibgam@uco.es
 Escribano Fernández, María de la Pazmpazescriba@hotmail.com
 Blanco Moreno, Rafael rablmo67@gmail.com

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Biodegradación bacteriana de residuos cianurados y otros contaminantes nitrogenados.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Luque-Almagro VM, Lyall VJ, Ferguson SJ, Roldán MD, Richardson DJ, Gates AJ. (2013). Nitrogen oxyanion-dependent dissociation of a two-component complex that regulates bacterial nitrate assimilation. *J. Biol. Chem.* 288:29692-296702.

Luque-Almagro VM, Acera F, Igeño MI, Wibberg D, Roldán MD, Sáez LP *et al.*, (2013). Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environ. Microbiol.* 15:253-70.

Estepa J, Luque-Almagro VM, Manso I, Escribano MP, Martínez-Luque M, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD (2012). The nit1C gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involved in assimilation of nitriles is essential for growth on cyanide. *Environ. Microbiol. Rep.* 4:326-334.

Huertas MJ, Sáez LP, Roldán MD, Luque-Almagro VM, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F, Moreno-Vivián C, García-García I (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *J. Hazard. Mater.* 179:72-78.

Roldán MD, Pérez-Reinado E, Castillo F, Moreno-Vivián C (2008). Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:474-500.

PONENCIA

BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS CIANURADOS DE LA INDUSTRIA JOYERA POR LA BACTERIA ALCALÓFILA *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5334.

Ibáñez MI, Sáez L, Luque-Almagro VM, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD

RESUMEN

El cianuro es un compuesto tóxico que genera graves problemas de contaminación como debido a su utilización en un gran número de industrias, principalmente la minera y la joyera. Las formas más tóxicas en las que se puede encontrar el cianuro son el ácido cianhídrico (HCN) y el ión cianuro (CN⁻). La degradación biológica del cianuro supone una forma efectiva de eliminar este compuesto, sin embargo este proceso requiere condiciones alcalinas para impedir la volatilización del cianuro en forma de HCN, ya que el pK_a del par CN⁻/HCN es 9,2. Nuestro grupo de investigación ha aislado una bacteria autóctona alcalófila identificada como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, que es capaz de asimilar y tolerar altas concentraciones de cianuro (hasta 30 mM). En este trabajo se ha optimizado la degradación del cianuro presente en el residuo de la joyería por la estirpe CECT5344 en biorreactor, además se ha estudiado la resistencia de este microorganismo a los distintos metales presentes en el residuo.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de la sociedad actual es la contaminación ambiental ocasionada por residuos generados por la actividad industrial, como los residuos cianurados de las industrias minera y la joyera. A pesar de la toxicidad del cianuro, los microorganismos utilizan este tóxico como fuente de nitrógeno. La mayoría de éstos asimilan cianuro a pH neutro, con lo que el cianuro se evapora como HCN. Para que este proceso sea eficiente se necesitan condiciones alcalinas, y el uso de microorganismos alcalófilos (1, 2). Son numerosos los estudios bioquímicos en los que se describen distintas rutas de degradación de cianuro, contemplando la posibilidad de emplear estos microorganismos en procesos de degradación de cianuro. Sin embargo, los estudios de descontaminación biológica de residuos cianurados en biorreactores son escasos. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria autóctona aislada a partir de lodos del río Guadalquivir a su paso por la ciudad de Córdoba capaz de asimilar cianuro en condiciones alcalinas (2).

Puede tolerar hasta 30 mM de cianuro libre y es capaz de utilizar cianato, nitrilos y complejos cianuro-metálicos como fuente de nitrógeno, por lo que es considerada un organismo cianotrofo ideal para la descontaminación de residuos cianurados procedentes de la industria joyera (2). Recientemente se ha elucidado la ruta de asimilación de cianuro en la estirpe CECT5344 (3) y se ha secuenciado el genoma completo de esta bacteria (4, 5). La secuenciación del genoma de la estirpe CECT5344 ha revelado, además de la presencia de genes implicados en la degradación del cianuro, la existencia de genes de resistencia a metales y metaloides (arsénico, mercurio, etc), genes involucrados en el metabolismo de polihidroxialcanoatos (PHA) o bioplásticos y genes de degradación de compuestos aromáticos. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es una buena candidata para su utilización en procesos biorremediación de residuos contaminados con cianuro y sus derivados, y la producción de bioplásticos durante este proceso podría suponer un valor añadido al proceso de descontaminación.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es la optimización del proceso de biodegradación de residuos industriales cianurados procedentes de la industria joyera por la estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en biorreactor. Para ello, se ha estudiado la influencia de diversos parámetros, tales como pH, concentración de cianuro y fuente de carbono sobre el proceso de degradación de cianuro en el reactor. Además, se ha determinado la resistencia de la estirpe CECT5344 a metales presentes en el residuo joyero. Además, se han estudiado los PHA que se acumulan durante la degradación de cianuro en reactor por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

RESULTADOS

El residuo de la industria joyera contiene, además de cianuro libre, distintos metales y complejos cianuro-metálicos, presentando aproximadamente 1,5 M de cianuro total. Mediante espectrofotometría de absorción atómica se determinó la presencia de los principales metales presentes en dicho residuo, hierro, zinc y cobre. Estudios de tolerancia a distintas concentraciones de estos metales (Fig. 1) indican que esta estirpe es capaz de tolerar altas concentraciones de éstos (5 mM, concentración final), incluso a concentraciones superiores de las que se encuentran en el residuo de la joyería (concentración de cada metal en el residuo alrededor de 1 mM).

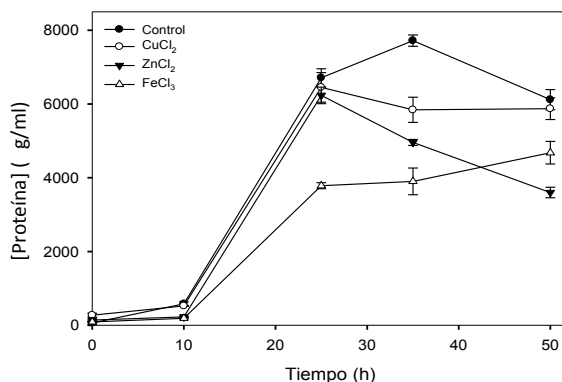


Figura 1. Tolerancia a los metales cobre, hierro y zinc de la bacteria *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

El estudio de degradación del residuo joyero cianurado se llevó a cabo cultivando la bacteria en un biorreactor de 10L de capacidad, donde se optimizaron varios parámetros como pH, fuente de carbono y concentración de cianuro. Para prevenir la formación de HCN es necesario un pH alcalino, por lo que se probaron diferentes valores de pH (8,5; 9,0 y 9,5).

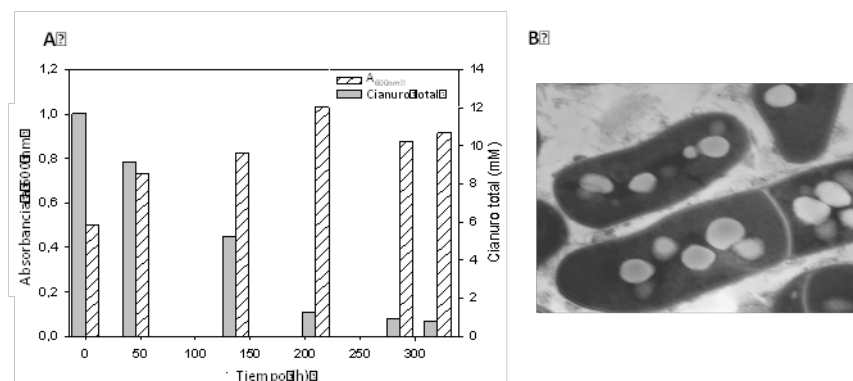


Figura 2. Degradación del residuo joyero en biorreactor por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. **A.** Consumo de cianuro y crecimiento bacteriano. **B.** PHA acumulado durante la degradación de cianuro (imagen obtenida mediante microscopía electrónica).

Aunque la estirpe CECT5344 creció de forma similar en todos los valores de pH, sólo se llevó a cabo la degradación completa de cianuro total a pH 8,5 y 9,0. Otro de los parámetros a tener en cuenta en la degradación de cianuro es la fuente de carbono. En este trabajo se utilizó acetato, octanoato o malato como fuente de carbono en la degradación del cianuro presente en el residuo.

En los tres casos se añadió una concentración fija de citrato a lo largo del experimento, el cual además de una fuente de carbono adicional es un quelante de metales que podría contribuir a la degradación de los complejos cianuro-metálicos. En los tres casos la degradación de cianuro fue similar, eliminándose 10 mM de cianuro total al final de proceso. En la Figura 2 se muestra el consumo de cianuro total y el crecimiento de la estirpe CECT5344 durante la degradación de cianuro total en reactor. Además, se presenta la producción de PHA durante el proceso.

AGRADECIMIENTOS: Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2011-30026-C02-02) y Junta de Andalucía (CVI-7560). Las empresas GEMASUR, SAVECO y AVENIR y a la Profesora María Dolores Luque de Castro y a la Dra. Verónica Sánchez de Medina del Dpto. Química Analítica (UCO) por la determinación de cianuro total y metales del residuo joyero.

REFERENCIAS

1. Huertas MJ, Luque-Almagro VM, Martínez-Luque M, Blasco R, Moreno-Vivián C, Castillo F (2010) Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *J. Hazard. Mater.* 179:72-78.
2. Luque-Almagro VM, Blasco R, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD (2005). Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochem. Soc. Trans.* 33:168-169.
3. Estepa J, Luque-Almagro VM, Manso I, Escribano MP, Martínez-Luque M, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD (2012). The nit1C gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involved in assimilation of nitriles is essential for growth on cyanide. *Environ. Microbiol. Rep.* 4:326-334.
4. Luque-Almagro VM, Acera F, Igeño MI, Wibberg D, Roldán MD, Sáez LP, Hennig M, Quesada A y 20 autores más (2013). Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environ. Microbiol.* 15:253-270.
5. Wibberg D, Luque-Almagro VM, Igeño MI, Bremges A, Roldán MD, Merchán F, *et al.* (2014) Complete genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *J. Biotechnol.* 175:67-68.

GRUPO BIO123

ASIMILACIÓN DE NUTRIENTES EN PROCHLOROCOCCUS, CIANOBACTERIA CLAVE EN ECOSISTEMAS MARINOS

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Díez Dapena, Jesús..... bb1didaj@uco.es
 García Fernández, José Manuel.....bb1gafej@uco.es
Domínguez Martín, María Agustina b32domam@uco.es
 Gómez Baena, Guadalupe.....v52gobag@uco.es
 Muñoz Marín, María del Carmen..... mariazaes@hotmail.com

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Córdoba

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

4. Caracterización y regulación del transportador Pro1404 en *Prochlorococcus* y *Synechococcus*.
5. Efecto de la utilización de glucosa en el metabolismo de *Prochlorococcus*.
6. Diversidad en los mecanismos de control del balance C/N en *Prochlorococcus* y *Synechococcus*.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Munoz-Marin MC, Luque I, Zubkov MV, Hill PG, Díez J & Garcia-Fernandez JM. (2013) *Prochlorococcus* can use the Pro1404 transporter to take up glucose at nanomolar concentrations in the Atlantic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110 (21): 8597-8602.

Gomez-Baena G, Lopez-Lozano A, Díez J, Barcena JA & Garcia-Fernandez JM (2012) Nitrogen starvation induces extensive changes in the redox proteome of *Prochlorococcus* sp. strain SS120. *Environ Microbiol Rep.* 4(2): 257-267.

Gomez-Baena G, Lopez-Lozano A, Gil-Martinez J, Lucena JM, Díez J, Candau P, Garcia-Fernandez JM (2008) Glucose uptake and its effect on gene expression in *Prochlorococcus*. *PLoS ONE* 3(10) e3416.

Gomez-Baena G, Garcia-Fernandez JM, Lopez-Lozano A, Toribio F, Diez J (2006): Glutamine synthetase degradation is controlled by oxidative proteolysis in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511. *Biochim Biophys Acta* 1760:930-940.

Garcia-Fernandez JM, Tandeau de Marsac N, Diez J (2004) Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:630-638.

PONENCIA

PAPEL DEL 2-OXOGLUTARATO EN LA REGULACIÓN DE LOS METABOLISMOS DEL CARBONO Y NITRÓGENO EN *PROCHLOROCOCCUS*

RESUMEN

Prochlorococcus es el organismo fotosintético más abundante de la Tierra, y uno de los principales productores primarios. El objetivo de nuestro estudio es analizar el papel del 2-oxoglutarato en el control del balance C/N en esta cianobacteria, profundizando en las diferencias que existen respecto a otros modelos de cianobacterias e incluso en las posibles diferencias regulatorias entre las diferentes estirpes del género de *Prochlorococcus*. Para abordar este objetivo, hemos medido la concentración de 2-oxoglutarato intracelular y la expresión de diferentes genes (*glnA*, *icd*, *glsF*, *glnB*, *pipX* y *ntcA*) que participan en el metabolismo del C/N en diferentes estirpes de *Prochlorococcus* (PCC9511, MIT9313 y SS120) usando distintas concentraciones de azaserina, inhibidor específico de la glutamato sintasa (GOGAT). En esas mismas condiciones, hemos analizado las actividades glutamina sintetasa (GS) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH). Además, hemos analizado la interacción entre el factor de transcripción NtcA y el promotor para el gen *glnA*, que codifica la glutamina sintetasa. Por último, hemos analizado el efecto de la azaserina sobre el proteoma de *Prochlorococcus* SS120 usando tecnología en espectrometría de masas de última generación.

INTRODUCCIÓN

Los océanos juegan un papel clave en el ciclo global de nutrientes y la regulación del clima. La cianobacteria unicelular *Prochlorococcus* es un importante contribuyente a estos procesos, ya que es responsable de una fracción muy importante de la producción primaria en amplias zonas de los océanos. En el contexto actual de preocupación global por el cambio

climático, la importancia de los estudios sobre uno de los principales fijadores de CO₂, como *Prochlorococcus*, resulta evidente.

La importancia de *Prochlorococcus* ha provocado su utilización como organismo modelo en muy diversos estudios y durante la última década, diversas iniciativas han dado lugar a la secuenciación del genoma de trece estirpes de *Prochlorococcus*. Sin embargo, en otros campos el conocimiento sobre *Prochlorococcus* es muy escaso, y en particular en lo referente a los metabolismos del nitrógeno y del carbono.

En relación con el metabolismo del nitrógeno, durante décadas ha sido aceptado que las cianobacterias tienen un ciclo de los ácidos tricarbónicos incompleto al carecer de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa. Recientemente, se han caracterizado dos enzimas que completan dicho ciclo (Zhang, S., and Bryant, D.A., 2011) excepto en *Prochlorococcus* y *Synechococcus* teniendo así una situación diferente al resto de cianobacterias. Está descrito en cianobacterias que la molécula responsable del control balance C/N es el 2-oxoglutarato (Muro-Pastor, M. et al., 2001) respondiendo a diferentes niveles de nitrógeno. Las variaciones en los niveles de 2-oxoglutarato van a tener efecto sobre NtcA, primer elemento responsable del control del nitrógeno en cianobacterias y dos proteínas reguladoras PII y PipX.

A pesar que *Prochlorococcus* tiene todos los componentes del sistema regulador, estudios previos sugieren, la mayoría realizados por nuestro grupo, que dicha regulación del balance C/N no sigue el modelo descrito para el resto de cianobacterias e incluso, parece ser que esas posibles diferencias también existen entre diferentes estirpes del género de *Prochlorococcus*.

OBJETIVOS

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo principal de este trabajo es comprender los posibles cambios regulatorios en el mecanismo del balance C/N en el metabolismo de *Prochlorococcus*.

RESULTADOS

Hemos analizado el efecto de la acumulación del 2-oxoglutarato en *Prochlorococcus* a diferentes niveles y con diferentes estrategias. Se han realizado distintos tipos de tratamientos: ausencia de diferentes oligoelementos, luz/oscuridad o distintos inhibidores entre los que destacamos la azaserina, un inhibidor específico de la glutamato sintasa (GOGAT) en tres estirpes de *Prochlorococcus*: MIT9313, PCC 9511 y SS120. Este tratamiento conduce a una subida de la concentración de 2-oxoglutarato y hemos estudiado el efecto del aumento de la concentración de este metabolito sobre la actividad glutamina sintetasa e isocitrato deshidrogenasa. También hemos estudiado el efecto de dicho aumento sobre la expresión de

genes claves en el metabolismo del nitrógeno como son *ntcA*, *glnB*, *glnA*, *icd*, *glsF*, *pipX* o *gdh*. Los resultados indican que el 2-oxoglutarato es la molécula responsable del balance C/N en *Prochlorococcus* al igual que en el resto de cianobacterias, pero los datos muestran diferencias en el comportamiento de las enzimas y de los genes entre las tres estirpes analizadas.

Así mismo, se han realizado estudios de interacción DNA-proteína con el objetivo de investigar el papel que juega el factor de transcripción NtcA en el control del balance N/C. Para ello, por un lado se han clonado y sobreexpresado de forma heteróloga el factor de transcripción NtcA, MIT9313 y SS120 (mismo ecotipo pero diferente aparición a lo largo de la evolución). Se han realizado estudios de interacción entre NtcA de ambas estirpes y el correspondiente promotor para el gen *glnA* (codifica la glutamina sintetasa) y el efecto del 2-oxoglutarato sobre dicha interacción usando la técnica de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) gracias a una colaboración con el Dr. Burkovski de la Universidad Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg. Además, datos preliminares sugieren que la afinidad entre ambos elementos, dependiente del 2-oxoglutarato, puede ser diferente dependiendo de la estirpe de *Prochlorococcus*.

Finalmente, se ha realizado una aproximación proteómica usando tecnología de última generación en espectrometría de masas en colaboración con el grupo del Prof. Robert Beynon de la Universidad de Liverpool. Con esta tecnología hemos analizado los cambios en el proteoma debidos al aumento de los niveles intracelulares del 2-oxoglutarato tras añadir azaserina. Hemos identificado aproximadamente el 50% del proteoma. Hemos cuantificado cambios significativos en más de 200 proteínas en la condición azaserina, entre las que se encuentran tanto proteínas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno como con otras rutas metabólicas de interés.

REFERENCIAS

Kelly L, Huang KH, Ding H, Chisholm SW (2012) ProPortal: a resource for integrated systems biology of *Prochlorococcus* and its phage. *Nucleic Acids Res.* 40: 632-640.

Muro-Pastor, M., J. Reyes, et al. (2001). "Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels." *Journal of Biological Chemistry* 276(41): 38320-8.

Zhang, S., and Bryant, D.A. (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* 334: 1551-1553.

García-Fernández JM, Tandeau de Marsac N, Díez J (2004) Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:630-638.

Gomez-Baena G, Lopez-Lozano A, Gil-Martinez J, Lucena JM, Diez J, Candau P, Garcia-Fernandez JM (2008) Glucose uptake and its effect on gene expression in *Prochlorococcus*. *PLoS ONE* 3(10) e3416.

McDonagh M, Domínguez-Martin MA, Gómez-Baena G, López-Lozano A, Diez J, Bárcena JA, García-Fernández JM (2012) Nitrogen starvation induces extensive changes in the redox proteome of *Prochlorococcus* sp. strain SS120. *Environ Microbiol Rep.*

Ponencia investigador egresado

PAPEL DEL GEN *alr4393* EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DEL HETEROCISTO EN *ANABAENA* SP. PCC 7120

López Lozano, Antonio; Herrero Moreno, Antonia; Flores García, Enrique.

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Grupo BIO129. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF). CSIC-Universidad de Sevilla.

RESUMEN

El gen *alr4393* de *Anabaena* sp. PCC 7120 se sitúa a continuación del gen *ntcA*, codificante del regulador transcripcional NtcA, no sólo en el genoma de esta cianobacteria filamentosa, sino también en la mayoría de los genomas cianobacterianos secuenciados hasta la fecha. Los resultados que se presentan en esta ponencia muestran que *alr4393* es un gen que se cotranscribe con *ntcA* y que ve inducida su expresión en ausencia de nitrógeno combinado, principalmente en los proheterocistos. La proteína Alr4393 se localiza en la fracción de membrana y la delección de su gen codificante parece afectar tanto al crecimiento diazotrófico de esta cianobacteria a largo plazo en medio sólido como a la expresión de *ntcA* y otros genes regulados por este factor de transcripción.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son un grupo de organismos procariontes que se caracterizan por su capacidad para realizar la fotosíntesis oxigénica, y se diferencian de otros grupos de bacterias fotosintéticas por utilizar la molécula de agua como donador de electrones [1].

Muchas estirpes de cianobacterias, como la filamentosa *Anabaena* sp. PCC 7120, son capaces de llevar a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico en unas células especializadas llamadas heterocistos. El proceso de diferenciación de los heterocistos implica una serie de cambios, tanto estructurales como metabólicos, encaminados a minimizar la concentración de oxígeno intracelular y a incrementar la eficiencia del proceso de fijación. Este proceso de diferenciación da lugar a un organismo con dos tipos celulares interdependientes especializados en diferentes funciones, representando uno

de los primeros pasos que evolutivamente se han dado hacia la multicelularidad en los seres vivos. Las diferencias que se observan entre los heterocistos y las células vegetativas de las que proceden son en buena medida el resultado de un programa característico de expresión génica que se establece durante el proceso de diferenciación, consistente en la activación, o represión, jerarquizada de múltiples genes. A nivel molecular, la proteína NtcA, que ejerce el control por nitrógeno en las cianobacterias, juega un papel principal en el control de la expresión génica durante todas las fases del desarrollo de los heterocistos, así como en el funcionamiento del heterocisto maduro [2, 3].

La posición que ocupa el gen *alr4393*, situado a continuación del gen *ntcA* no sólo en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120, sino también en la mayoría de los genomas de cianobacterias secuenciados hasta la fecha, sugiere una posible relación funcional de la proteína que codifica *alr4393* con NtcA.

OBJETIVOS

1. Determinar el papel de la proteína Alr4393 en *Anabaena* sp. PCC 7120.
2. Determinar su localización subcelular.
3. Estudiar la posible interacción de Alr4393 con NtcA y otras proteínas de *Anabaena* sp. PCC 7120.

RESULTADOS

En este trabajo se ha abordado el estudio del gen *alr4393* y su producto génico haciendo uso de diferentes aproximaciones experimentales.

El análisis mediante RT-PCR de los transcritos que incluyen las secuencias de los genes *ntcA* y *alr4393* mostró que ambos cotranscriben en *Anabaena* sp. PCC 7120. Aunque la anotación del gen *alr4393* no le asigna ninguna función conocida, el análisis mediante "northern blot" del RNA extraído a partir de cultivos de esta cianobacteria reveló que la expresión de *alr4393* se incrementa en ausencia de una fuente nitrógeno combinado en el medio, si bien con cierto retraso respecto a la mostrada por el gen *ntcA*. Por otra parte, el estudio de un mutante en el que se había fusionado el gen *gfp-mut2* a los tres primeros codones de *alr4393* (estirpe CSAL3) permitió observar la proteína fluorescente GFP localizada principalmente en el proheterocisto, cuando los filamentos se transfirieron a un medio sin fuente de nitrógeno combinado.

Con el objetivo de determinar la localización subcelular de la proteína Alr4393, se generó un mutante de *Anabaena* sp. PCC 7120 que expresaba Alr4393 con la proteína GFP-MUT2 fusionada en su extremo carboxilo (estirpe CSAL4). El fraccionamiento de los extractos obtenidos a partir de cultivos de este

mutante confirmó la presencia de Alr4393 en la fracción de membrana mediante “western blot”, empleando anticuerpos anti-GFP-MUT2 para su detección.

Para determinar la función que pueda tener la proteína Alr4393 en esta cianobacteria filamentosa se generaron un mutante de delección (estirpe CSAL2) y otro de sobreexpresión del gen *alr4393* (estirpe CSAL29). Estas estirpes fueron objeto de un análisis fenotípico, centrado en su capacidad de crecimiento en medio líquido y sólido en ausencia o presencia de diferentes fuentes de nitrógeno. Sólo el mutante de delección mostró un comportamiento diferente al observado en la estirpe silvestre, tras un largo período de crecimiento en sólido sin fuente de nitrógeno combinado.

Además, se ha estudiado mediante análisis de “northern blot” la expresión de los genes *ntcA* y *nifH* tanto en *Anabaena* sp. PCC 7120 como en la estirpe mutante CSAL2. El gen *nifH* codifica una subunidad de la nitrogenasa y está regulado por la proteína NtcA en función de la fuente de nitrógeno disponible. Los resultados obtenidos por “northern blot” han podido compararse con los datos sobre la expresión de *ntcA* aportados por la fusión transcripcional del gen *gfp-mut2* a la región promotora de *ntcA* en fondo silvestre (estirpe CSAL16) y en el mutante de delección (estirpe CSAL19).

El conjunto de los resultados presentados en este trabajo confirma la implicación de la proteína Alr4393 en el proceso de diferenciación del heterocisto en *Anabaena* sp. PCC 7120, además de sugerir una posible relación funcional de esta proteína con el regulador NtcA.

REFERENCIAS

- [1] The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution (2008) A. Herrero y E. Flores (editores). 484 páginas. Caister Academic Press. Norfolk, UK.
- [2] Flores E, Herrero A (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(1): 39-50.
- [3] Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A, Flores E (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(4): 469-487.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN ACTUALES

- 7. Comunicación intercelular en las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos.
- 8. Regulación transcripcional y diferenciación celular en las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES DEL GRUPO BIO129:

Burnat M, Herrero A, Flores E (2014) Compartmentalized cyanophycin metabolism in the diazotrophic filaments of a heterocyst-forming cyanobacterium. *PNAS* 111(10):3823-3828.

Picossi S, Flores E, Herrero A (2014) ChIP analysis unravels an exceptionally wide distribution of DNA binding sites for the NtcA transcription factor in a heterocyst-forming cyanobacterium. *BMC Genomics* 15:22.

Corrales-Guerrero L, Mariscal V, Flores E, Herrero A (2013) Functional dissection and evidence for intercellular transfer of the heterocyst-differentiation PatS morphogen. *Mol. Microbiol.* 88(6): 1093-1105.

Mariscal V, Herrero A, Nenninger A, Mullineaux CW, Flores E (2011) Functional dissection of the three-domain SepJ protein joining the cells in cyanobacterial trichomes. *Mol. Microbiol.* 79(4): 1077-1088.

Flores E, Herrero A (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(1): 39-50.

Sesión Segunda

Ponencia empresa

TIGENIX S.A.U.

COMPONENTES:

CHIEF Technical Officer

Wilfried Dalemans

Scientific Directors in R&D:

De la Rosa Morales, Olgaolga.delarosa@tigenix.com

Lombardo, Eleuterio.....Eleuterio.lombardo@tigenix.com

R&D technicians

Ramirez Bellinchón Cristina

Del Rio Granados Borja

Menta Hernandez Ramón

Mancheño Corvo Pablo

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

R&D department in TIGENIX SAU

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Use of Adipose derived Stem cells to treat Experimental models of inflammation (CIA, IBD). Exploring routes of administration and dose related effects for the cellular product ASCs
2. Understanding the immunomodulatory role of the adipose derived stem cells.
3. Looking for biomarkers of therapeutic effect of the use of adipose derived stem cells in the clinic.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Mancheño-Corvo P, Franquesa M, de la Rosa O, Ramírez C, García-Benzaquén L, Fernández V, Menta R, Beraza A, Dalemans W, Hoogduijn MJ, Lombardo E (2013) Adipose mesenchymal stromal cell function is not affected by methotrexate and azathioprine. *Biores Open Access*. Dec 1;2(6):431-9.

DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E. (2012) Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Curr Opin Biotechnol*. Dec;23(6):978-83. Jun 7. Review

Zonca M, Mancheño-Corvo P, DelaRosa O, Mañes S, Büscher D, Lombardo E, Planelles L. (2012) APRIL and BAFF proteins increase proliferation of human adipose-derived stem cells through activation of Erk1/2 MAP kinase. *Tissue Eng Part A*.

DelaRosa O, Sánchez-Correa B, Morgado S, Ramírez C, del Río B, Menta R, Lombardo E, Tarazona R, Casado JG (2012) Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells Dev*.

DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheño-Corvo P, Ramirez C, Menta R, Rico L, Camarillo E, García L, Abad JL, Trigueros C, Delgado M, Büscher D. (2009) Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. Oct;15(10):2795-806.

PONENCIA

ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS: FROM THE BENCH TO THE INDUSTRY

RESUMEN

TiGenix has developed its platform using expanded stem cells extracted from adipose tissue (eASCs), which are sourced from and applied to consenting patients. Therefore, and in contrast to cells of embryonic origin, there are no complex ethical issues associated with the use of eASCs. By using eASCs, TiGenix is also able to capitalize on the benefits associated with this type of cell compared to other cell types (i.e. bone marrow- derived stem cells). TiGenix aims to exploit the immunomodulatory capacity of eASCs pursuing the delivery of the cells via the most appropriate route of administration according to the indication targeted. Accordingly, clinical stage programs are currently in place using both local and systemic administration. Further programs are in pre-clinical development using additional routes of administration within these two categories.

ADIPOSE DERIVED STEM CELL PLATFORM

Cx611 is an allogeneic eASC product candidate for the treatment of rheumatoid arthritis that has been investigated in a Phase IIa trial. The trial was based on a three-step dose-finding protocol, where each step started with a safety review of the first three patients after 40 days of dosing, and successfully met its primary safety endpoints as well as its secondary endpoint of preliminary efficacy. On April 22, 2013, TiGenix reported positive 6-month safety data of its Phase IIa study of Cx611 in refractory rheumatoid arthritis (RA), as well as a first indication of therapeutic activity on standard outcome measures and biologic markers of inflammation for at least three months after dosing.

The multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled Phase IIa trial enrolled 53 patients with active refractory rheumatoid arthritis (mean time since diagnosis 15 years), who failed to respond to at least two biologics (mean previous treatment with 3 or more disease-modifying antirheumatic drugs and 3 or more biologics). The study design was based on a three-cohort dose-escalating protocol. For both the low and medium dose regimens 20 patients received active treatment versus 3 patients on placebo; for the high dose regimen 6

patients received active treatment versus 1 on placebo. Patients were dosed at day 1, 8, and 15 and were followed up monthly over a six-month period. Follow-up consisted of a detailed monthly workup of all patients measuring all pre-defined parameters. The aim was to evaluate the safety, tolerability and optimal dosing over the full 6 months of the trial, as well as exploring therapeutic activity.

In July 2012, TiGenix enrolled the first patient in the ADMIRE-CD trial, its pivotal Phase III clinical trial with Cx601, an adipose derived allogeneic stem cell suspension for the treatment of complex perianal fistulas in Crohn's disease patients. This multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled Phase III trial will enroll approximately 278 patients at 46 centers in 7 European countries and Israel. The main objectives of the study are to demonstrate safety and superior efficacy over placebo in perianal fistulas in Crohn's disease patients who failed to respond to previous treatment(s), in most cases biologicals, and to confirm the strong safety and efficacy results from the Phase II trial completed in 2011. Readout of the trial is expected in H1 2015, and, if positive, allows the Company to file for marketing authorization with the European Medicines Agency.

Cx621 is an allogeneic eASC product candidate for the treatment of autoimmune diseases via a proprietary technique of intralymphatic administration. The great promise of the intralymphatic route is that the systemic effect of the expanded adipose stem cells occurs at the secondary lymphoid organs: draining lymph nodes and spleen.

Recent preclinical and clinical experience with vaccines and antitumor agents indicates that intralymphatic administration is feasible and safe. Indeed, the subcutaneous lymph nodes are readily visible by ultrasound, as their paracortical area is hypoechoic. Injection of a superficial lymph node in the groin area can be performed very quickly, within minutes, even by doctors who have little experience with ultrasound. Finally intralymphatic injection is relatively painless, since lymph nodes are poorly innervated. After obtaining positive results from toxicology, biodistribution and efficacy models in mice using human eASCs via the intralymphatic route, and TiGenix conducted a Phase I clinical study in 10 healthy volunteers, which was concluded in July 2012.

The results of the Phase I study confirmed the safety, tolerance and the feasibility of injection technique feasibility in the inguinal ganglia. The confirmation of the safety of intra-lymphatic administration of our expanded adipose stem cells (eASCs) has potentially important clinical and commercial implications. It opens up the possibility of achieving efficacy at lower dosage, which would further increase the safety profile of TiGenix's eASCs, while it would simultaneously significantly reduce the cost of goods (COGS) and improve margins. An additional benefit is that the subcutaneous lymph nodes are superficial and readily visible by ultrasound, and thus allow for a rapid and easy injection.

GRUPO TEP169

BIOCOMBUSTIBLES Y SISTEMAS DE AHORRO ENERGÉTICO

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Dorado Pérez, María del Pilar pilar.dorado@uco.es

[Leiva Candia, David Eduardo](mailto:z82lecad@uco.es)z82lecad@uco.es
[Pinzi, Sara](mailto:qf1pinps@uco.es)qf1pinps@uco.es
[Koutinas, Apostolis](mailto:akoutinas@aua.gr) akoutinas@aua.gr
[López García, Isabel](mailto:ilgarcia@uco.es) ilgarcia@uco.es
[Tsakona, Sofia](mailto:tsakona_sofia@hotmail.com)..... tsakona_sofia@hotmail.com
[Redel Macías, María Dolores](mailto:ig1remam@uco.es)..... ig1remam@uco.es
[Kopsahelis, Nikolaus](mailto:kopsahelis@upatras.gr) kopsahelis@upatras.gr
[Papanikolaou, Seraphin](mailto:spapanik@aua.gr).....spapanik@aua.gr

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Química Física y Termodinámica Aplicada, Universidad de Córdoba

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Biocombustibles para motores de combustión interna. Análisis de propiedades, emisiones y prestaciones.
2. Biorrefinerías a partir de la valorización de residuos que incluyen bioplásticos, biodiésel de segunda generación y otros productos de alto valor añadido.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Pinzi S, Leiva-Candia DE, López-García I, Redel-Macías MD, Dorado MP (2014) Latest trends in feedstocks for biodiesel production. *Biofuels bioproducts & biorefining* 8:126-143

Leiva-Candia DE, Pinzi S, Redel-Macías MD, Koutinas A, Webb C, Dorado MP (2014) The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel* 123:33-42

Pinzi S, Leiva-Candia D, Arzamendi G, Gandia LM, Dorado MP (2011) Multiple response optimization of vegetable oils fatty acid composition to improve biodiesel physical properties. *Bioresource Technology* 102: 7280–7288

Leiva-Candia DE, Ruz-Ruiz MF, Pinzi S, García-Ruiz JR, Domínguez J, García IL, Dorado MP (2013) Influence of nitrogen fertilization on physical and chemical properties of fatty acid methyl esters from *Brassica napus* oil. *Fuel* 111:865-871

Redel-Macías MD, Pinzi S, Leiva-Candia D, Cubero-Atienza AJ, Dorado MP (2012) Air and noise pollution of a diesel engine fueled with olive pomace oil methyl ester and petrodiesel blends. *Fuel*. 95:615–621

PONENCIA

REUTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES MEDIANTE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL DE SEGUNDA GENERACIÓN

RESUMEN

El biodiésel es un biocombustible renovable producido principalmente a partir de aceites vegetales. Actualmente, las investigaciones se centran en la identificación de nuevas materias prima que podrían ser utilizadas para su producción, con la característica primordial de que no compitan con la industria alimentaria. El aceite microbiano producido a partir de levaduras oleaginosas constituye una nueva fuente de triglicéridos que puede ser producida a partir de diversos recursos renovables, incluyendo residuos agroindustriales. Este estudio se basa en la producción de aceite microbiano a partir de tres cepas de levadura oleaginosa (*Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 y *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509), utilizando glicerina como fuente de carbono en dos concentraciones diferentes (60 g/l y 100 g/l) y tres fuentes de suplementos nutricionales (hidrolizado de torta de girasol, hidrolizado de torta de girasol previa extracción de antioxidantes y parte proteica y, por último, suplementos comerciales). Los principales ácidos grasos presentes en este aceite son los ácidos oleico (C18:1), palmítico (C16:0) y linoléico (C18:2), similar al aceite de palma. Este estudio demuestra la capacidad de acumular aceite intracelular de las cepas analizadas, lo cual permite valorizar los residuos de la industria agroalimentaria y del biodiésel, conduciendo al

desarrollo de un nuevo concepto tecnológicamente viable de este biocombustible.

INTRODUCCIÓN

La producción de biodiésel se basa en la transesterificación de ácidos grasos con un alcohol en presencia de un catalizador ácido o básico. En la actualidad, los ácidos grasos usados para producir biodiésel provienen en su mayoría de aceites vegetales, lo que incrementa los costos de producción de biodiésel, ya que el precio de la materia prima representa entre un 60-70% del coste total de producción (Dorado et al. 2006). Por esta razón, es necesario financiar esta industria a través de subsidios gubernamentales para mantener un precio competitivo en el mercado. Los beneficios ambientales de la utilización de este biocombustible, entre los cuales se puede mencionar la reducción de gases de efecto invernadero, eleva el interés de reducir costes de la materia prima para extender su uso, lo que proporcionaría una tecnología sostenible.

Una posible alternativa a los aceites vegetales la aporta el aceite microbiano, de composición en ácidos grasos similar a la de los anteriores. Los lípidos se producen cuando las levaduras oleaginosas crecen en un medio con exceso de carbono y presencia limitada de nitrógeno. Sin embargo, sólo un 5% de las levaduras conocidas (entre las que se encuentran las especies *Cryptococcus*, *Rhodospiridium* y *Lipomyces*) puede acumular más de un 20% de aceite (en peso en seco de la célula). Este porcentaje marca el límite para ser considerados microorganismos oleaginosos.

Finalmente, una posible vía de producción de sustratos de bajo coste la pueden aportar los residuos de la industria agroalimentaria (con alto contenido de proteínas y nutrientes) e incluso del biodiésel (glicerina, que puede ser usada como fuente de carbono).

OBJETIVOS

El objetivo de esta investigación es estudiar el comportamiento de tres levaduras oleaginosas (*R. toruloides* DSM 4444, *C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296) utilizando como medio de cultivo subproductos de las industrias del biodiésel tradicional y aceitera, como son la glicerina y la torta proveniente del prensado de la semilla de girasol.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para las concentraciones utilizadas en este estudio demostraron que el diseño propuesto producía mayor biomasa celular que los casos reportados en la literatura, utilizando glicerina y otras levaduras oleaginosas en una fermentación por lote (batch) (Chatzifragkou et al. 2011; Saenge et al. 2011). Si se compara la utilización de fuentes de nutrientes provenientes de residuos (torta de prensado de girasol) y fuentes comerciales (extracto de levadura y peptona) se apreció un aumento del consumo de carbono en dos de las cepas analizadas *R. toruloides* y *C. Curvatus* (Figura 1), lo cual se tradujo en un aumento de producción de lípidos en más de un 30 % para el mejor de los casos.

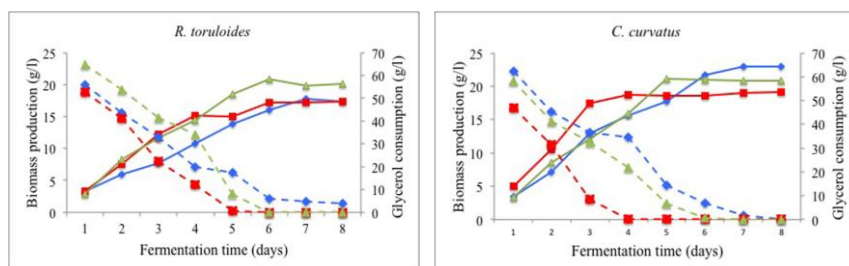


Figura 1. Producción de biomasa celular v/s consumo de glicerina por la levadura *R. toruloides* y *C. curvatus* usando glicerina como fuente de carbono. Leyenda: línea roja: hidrolizado de girasol; línea verde: hidrolizado girasol pretratado; línea azul: extracto de levadura y peptona

Con el objetivo de estudiar el comportamiento en una fermentación por lotes realimentada (fed-batch), se utilizó la cepa que mayor producción de lípidos generó en los estudios previos. Los resultados arrojaron un nuevo aumento en la producción de lípidos para los medios reciclados, además de acortar la diferencia en producción entre ambos medios, lo cual proporciona una nueva vía de reaprovechamiento de antioxidantes y proteínas.

Como punto final de este estudio se procedió a analizar la composición de ácidos grasos y a estimar propiedades del biodiésel obtenido a partir de este aceite, utilizando modelos descritos en la literatura (Ramos et al. 2009; Pinzi et al. 2011). Los resultados mostraron que

tanto en su composición de ácidos grasos como en propiedades, el biodiésel obtenido posee una elevada similitud con el aceite de palma, actualmente una de las fuentes de triglicéridos en la industria del biodiésel. La cepa de mayor producción de lípidos (*C. curvatus*) presentó una mejora en las propiedades relativas al comportamiento en frío y viscosidad, pero un descenso del número de cetano, lo cual puede provocar un aumento de emisiones contaminantes (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades de biodiésel a partir de los distintos aceites microbianos obtenidos

| Propiedades | Número cetano | Poder calorífico (kJ/kg) | Punto de obstrucción del filtro en frío (°C) | Flash point (°C) | Viscosidad a 40°C (mm ² /s) |
|--|---------------|--------------------------|--|------------------|--|
| Hidrolizado de torta de girasol | | | | | |
| <i>R. toruloides</i> | 69.74 | 37533.72 | 9.581 | 168.432 | 4.37 |
| <i>C. curvatus</i> | 66.13 | 37402.81 | 4.650 | 159.330 | 4.20 |
| <i>L. starkeyi</i> | 68.88 | 37560.91 | 9.107 | 170.280 | 4.26 |
| Hidrolizado de torta de girasol pretratada | | | | | |
| <i>R. toruloides</i> | 68.88 | 37519.67 | 8.21 | 167.330 | 4.37 |
| <i>C. curvatus</i> | 65.45 | 37494.71 | 4.29 | 165.374 | 4.15 |
| <i>L. starkeyi</i> | 68.48 | 37533.90 | 9.29 | 168.415 | 4.23 |

REFERENCIAS

Chatzifragkou A, Makri A, et al. (2011) Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* 36(2): 1097-1108

Dorado MP, Cruz F, et al. (2006) An approach to the economics of two vegetable oil-based biofuels in Spain. *Renewable Energy* 31(8): 1231-1237

Pinzi S, Leiva D, et al. (2011) Multiple response optimization of vegetable oils fatty acid composition to improve biodiesel physical properties. *Bioresource Technology* 102(15): 7280-7288

Ramos MJ, Fernández CM, et al. (2009) Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology* 100(1): 261-268

Saenge C, Cheirsilp B, et al. (2011) Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry* 46(1): 210-218

GRUPO FQM162

QUÍMICA ORGÁNICA-BIOREFINERÍA

COMPONENTES:

RESPONSABLE: ^{1,4}Luna Martínez, Diego..... go1lumad@uco.es

¹Luna Durán, Carlos go2luduc@uco.es

¹Calero Mármol, Juan p72camaj@uco.es

²Sancho Puebla, Enrique D..... edsancho@uco.es

³Verdugo Escamilla, Cristóbal..... cverdugoe@lec.csic.es

⁴Posadillo Marín, Alejandro..... seneca@uco.es

¹Bautista Rubio, Felipa M^a..... go1baruf@uco.es

¹Romero Reyes, Antonio A..... go1rorea@uco.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

- 1) Depto. de Química Orgánica, C.U. Rabanales, Universidad de Córdoba.
- 2) Depto. de Microbiología Agrícola, C.U. Rabanales, Universidad de Córdoba.
- 3) Laboratorio de estudios cristalográficos, Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC), Granada.
- 4) Seneca Green Catalyst S.L., Rabanales XXI, Universidad de Córdoba.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Obtención de biodiesel recurriendo a la utilización de enzimas inmovilizadas, como biocatalizadores, en la transesterificación de aceites vegetales, proceso base de preparación del biodiesel. Asimismo se utilizan catalizadores sólidos con características ácido-básicas. En este sentido, contamos con una spin-off dedicada a esta línea.
2. Valorización de compuestos orgánicos obtenidos a partir de la biomasa mediante catálisis heterogénea.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Luna D, Calero J, Sancho ED, Luna C, Posadillo A, Bautista FM, Romero AA, Berbel J, Verdugo C (2014) Technological challenges for the production of biodiesel in arid lands. *Journal of Arid Environments* 102: 127-138.

PONENCIA

PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE UN NUEVO TIPO DE BODIESEL QUE NO PRODUCE GLICERINA COMO SUBPRODUCTO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES LIPASAS

RESUMEN

Investigaciones precedentes de nuestro grupo han descrito la producción de un nuevo tipo de biocombustible similar al biodiesel, evitando la producción de glicerina como subproducto, a partir de aceites vegetales mediante la aplicación de lipasas 1,3-selectivas, generando 2 moles de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) y un mol de Monoglicérido (MG). Diferentes tipos de lipasas microbianas, tanto en forma libre como inmovilizada, purificadas comerciales o extractos muy poco purificados a partir de cepas silvestres aisladas en medios lipófilos, o extractos procedentes de cepas adquiridas en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) han sido probadas como biocatalizadores en esta reacción de etanolisis.

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) se emplea para estimar los efectos de los principales parámetros (temperatura, pH, relación aceite/alcohol) de la reacción de etanolisis selectiva del aceite de girasol. Se comprueba su rendimiento y estabilidad a lo largo del tiempo de reacción en reacciones sucesivas. Resultados obtenidos demuestran su potencial biotecnológico para desarrollar un proceso alternativo de producción de biocombustibles de una forma sostenible así como económicamente viable.

INTRODUCCIÓN

Investigaciones anteriores han descrito la obtención de un nuevo tipo de biocombustible alternativo al biodiesel convencional, denominado ECODIESEL [1] (Figura 1), que integra la glicerina en forma de monoglicérido (MG), obtenido mediante transesterificación enzimática

con lipasas 1,3 selectivas: Lipasa Pancreática Porcina (PPL) [2,3] o lipasas microbianas [4-6]. Así, se consigue evitar la generación del glicerol como subproducto, lo que conlleva una importante reducción de los costes del proceso y mejora del rendimiento. Este estudio, plantea una evaluación y selección de diferentes lipasas, tanto en forma libre como inmovilizada, purificadas comerciales [4,5] o extractos poco purificados a partir de cepas silvestres aisladas en medios lipófilos [6], también se prueban extractos procedentes de cepas (la misma especie que las lipasas comerciales) adquiridas en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), a fin de seleccionar las lipasas más eficaces, que permitan optimizar la producción del biocombustible indicado, así como su desarrollo biotecnológico, para su futura aplicación a escala comercial.

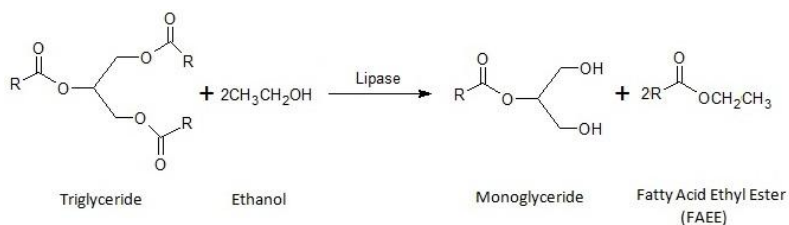


Figura 1. Esquema representativo de la producción de ECODIESEL por la aplicación de biocatálisis 1,3-selectiva.

OBJETIVOS

Evaluación y selección de lipasas comerciales purificadas. Obtención, evaluación y selección de extractos enzimáticos lipasídicos de cepas adquiridas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Búsqueda de cepas microbianas silvestres para la obtención, evaluación y selección de sus extractos enzimáticos lipasídicos. Todos ellos biocatalizadores 1,3-selectivos capaces de realizar reacciones de transesterificación útiles en la síntesis de un biocombustible exento de glicerina y con una viscosidad adecuada para su uso en motores diesel, puro o en mezclas con diesel de origen fósil.

RESULTADOS

Puesta a punto de un método analítico rápido y fiable, basado en la cromatografía de gases, para la caracterización de los productos obtenidos en la reacción de la alcoholisis parcial de triglicéridos (mezclas de FAEEs, MGs y DGs). Así, comprobamos la ausencia de

glicerina en todas las reacciones llevadas a cabo, y por tanto el carácter 1,3 selectivo de todos los biocatalizadores usados, además de que los MG aparecen en el cromatograma se superponen con las de FAEE, FAME y alcanos que componen el diesel fósil, lo que nos lleva a inferir similares propiedades fisicoquímicas (Figura 2) así como su viabilidad como biocombustible alternativo [1-6].

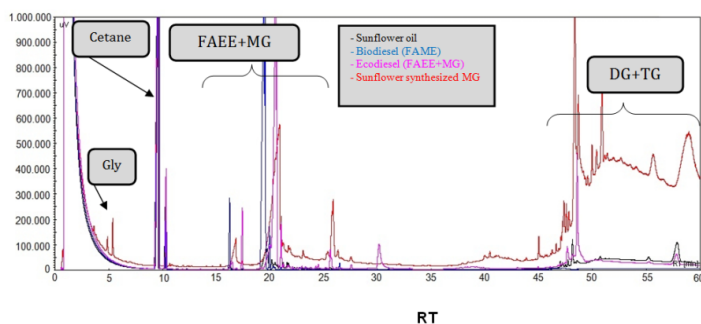


Figura 2. Cromatogramas superpuestos de aceite de girasol, FAME, FAEE y MG.

Respecto al procedimiento de obtención de los extractos, se ha comprobado como el incluir un proceso de diálisis previa a la liofilización, mejora notablemente la eficacia del mismo como biocatalizador de la reacción estudiada [6] (Figura 3).

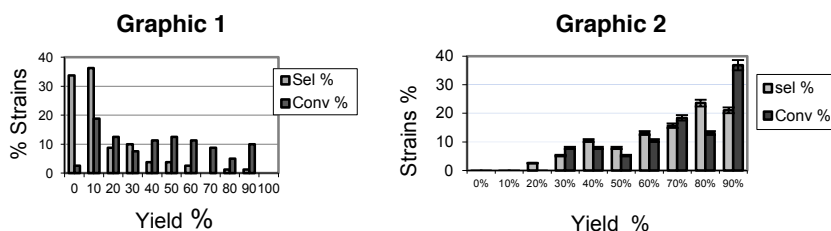


Figura 3. Esquema del rendimiento comparativo en la reacción de etanolisis de la totalidad de los extractos liofilizados, porcentaje de extractos que presenta un porcentaje de rendimiento, sin diálisis previa (Gráfico 1) y con una simple diálisis previa (Gráfico 2). Todos son procedentes de cepas aisladas en ambiente lipófilo vegetal ("almazara de aceite")

REFERENCIAS

- [1] Luna D, Calero J, Sancho ED, Luna C, Posadillo A, Bautista FM, Romero AA, Berbel J, Verdugo C (2014) Technological challenges for the production of biodiesel in arid lands. *Journal of Arid Environments* 102: 127-138.
- [2] Luna C, Sancho ED, Luna D, Caballero V, Calero J, Posadillo A, C. Verdugo C, Bautista FM, Romero AA (2013) Biofuel that Keeps Glycerol as Monoglyceride by 1, 3-Selective Ethanolysis with Pig Pancreatic Lipase Covalently Immobilized on $AlPO_4$ Support. *Energies* 6: 3879-3900.
- [3] Luna D, Posadillo A, Caballero V, Verdugo C, Bautista FM, Romero AA, Sancho ED, Luna C, Calero J (2012) New Biofuel Integrating Glycerol into Its Composition Through the Use of Covalent Immobilized Pig Pancreatic Lipase. *Int J Mol Sci* 13: 10091-10112.
- [4] Verdugo C, Luna D, Posadillo A, Sancho ED, Rodriguez S, Bautista F, Luque R, Marinas JM, Romero AA (2011) Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catal Today* 167: 107–112.
- [5] Calero J, Verdugo C, Luna D, Sancho ED, Luna C, Posadillo A, Bautista FM, Romero AA (2014) Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which avoids glycerol production through the monoglyceride formation. *New Biotechnology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.008>
- [6] Mellado E, Escobar A, Canovas D, Luna D. Microbial strain *Terribacillus* SP.AE2B 122 capable to conduct transesterification reactions and use thereof, *Spanish Patent, Application N.: P201300039*; 11.01.2013

GRUPO AGR248

BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

COMPONENTES

RESPONSABLE: Dorado Pérez, Gabriel..... <bb1dopeg@uco.es>

Caballero Molina, Juan Antonio<ma1camoj@uco.es>

Díaz González, David<david.diaz@lcc.uma.es>

Esteban, Francisco José<fjesteban@uco.es>

Hernández Molina, Pilar<phernandez@ias.csic.es>

DEPARTAMENTOS E INSTITUCIONES

Departamento de Estadística, Campus Rabanales C2-20N, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba.

Servicio de Informática, Edificio Ramón y Cajal, Campus Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba

Departamento de Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 14080 Córdoba.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Genómica vegetal.
2. Biotecnología agroalimentaria.
3. Desarrollo de herramientas bioinformáticas.
4. Desarrollo de herramientas genómicas.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Díaz D, Esteban FJ, Hernández P, Caballero JA, Dorado G, Gálvez S (2011): Parallelizing and optimizing a bioinformatics pairwise sequence alignment algorithm for many-core architecture. *Parallel Computing - Systems & Applications* 37: 244-259.

Díaz D, Gálvez S, Falgueras J, Caballero JA, Hernández P, Claros G, Dorado G (2009): Intuitive bioinformatics for genomics applications: Omega-Brigid

workflow framework. Lecture Notes in Computer Science (IWANN 2009) 5518: 1084-1091.

Gálvez S, Díaz D, Hernández P, Esteban FJ, Caballero JA, Dorado G (2010): Next-generation bioinformatics: using many-core processor architecture to develop a web service for sequence alignment. *Bioinformatics* 26: 683-686.

Esteban FJ, Díaz D, Hernández P, Caballero JA, Dorado G, Gálvez S (2013): Direct approaches to exploit many-core architecture in bioinformatics. *Future Generation Computer Systems - The International Journal of Grid Computing and eScience* 29: 15-26.

Díaz D, Hernández P, Esteban FJ, Caballero JA, Guevara A, Dorado G, Gálvez S (2014): MC64-ClustalWP2: a Highly-parallel Hybrid Strategy to Align Multiple Sequences in Many-core Architectures. *PLoS ONE* 9: e94044 (12 pp).

PONENCIA

APLICACIÓN DE LAS NUEVAS PLATAFORMAS MULTINÚCLEO EN BIOINFORMÁTICA

Francisco José Esteban^{1§}, David Díaz², Pilar Hernández³, Antonio Guevara², Juan Antonio Caballero⁴, Sergio Gálvez^{2*}, Gabriel Dorado^{5*}

¹*Servicio de Informática, Edificio Ramón y Cajal, Campus Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba;* ²*Dep. Lenguajes y Ciencias de la Computación, Campus de Teatinos s/n, Universidad de Málaga, 29071 Málaga;* ³*Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba;* ⁴*Dep. Estadística, Campus de Rabanales, C2-20N, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba;* ⁵*Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales, C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), 14071 Córdoba (Spain); CE: <bb1dopeg@uco.es>.*

[§] *Autor para correspondencia.*

** Autores que contribuyeron a liderar el proyecto.*

RESUMEN

Se ha desarrollado una plataforma bioinformática sobre el microprocesador Tile64 de 64 núcleos. De este modo, se ha conseguido acelerar la ejecución de algoritmos bioinformáticos de alineamiento de secuencias de ácidos nucleicos y péptidos. La arquitectura se ha ampliado en una agrupación (“clúster”) de dichos microprocesadores.

De este modo, se han acelerado las búsquedas en algoritmos bioinformáticos heurísticos.

INTRODUCCIÓN

Se presenta el proceso de construcción de una plataforma para la ejecución de algoritmos bioinformáticos en un entorno masivamente paralelo, usando el microprocesador Tile64 (Tilera). Se trata del primer microprocesador de propósito general masivamente multi-núcleo disponible comercialmente. Dicho microprocesador consta de 64 núcleos, en cada uno de los cuales es posible ejecutar un sistema operativo Linux. Se han empleado microprocesadores integrados en placas PCI-Express, insertadas en un PC estándar, que añaden al microprocesador 8 GB de memoria RAM y dos conectores 10 Gigabit Ethernet.

OBJETIVOS

Se han desarrollado los siguientes algoritmos bioinformáticos para la plataforma Tile64: i) Alineamientos simples Needleman-Wunsch (global) y Smith-Waterman (local), mediante el desarrollo desde cero de una nueva versión paralelizada y optimizada para aprovechar las particularidades del microprocesador Tile64, a través de un esquema maestro-trabajadores en frente de onda; ii) Ensamblaje “de novo” ABySS, mediante la migración del código abierto ofrecido por los autores y su paralelización mediante la adaptación de la implementación original, escrita para la biblioteca MPI, a la biblioteca de paso de mensajes disponible en Tilera; y iii) Alineamiento múltiple ClustalW, usando los alineamientos simples desarrollados anteriormente en la primera fase del algoritmo.

A continuación se ha construido una red de estos dispositivos, según el modelo conocido como agrupación (“clúster”), de modo que el número de microprocesadores disponibles puede incrementarse a voluntad. Finalmente, se ha evaluado el rendimiento de esta plataforma en red, mediante el desarrollo y ejecución en la misma de las técnicas de búsqueda estándares típicamente utilizadas en algoritmos de alineamiento basados en heurísticos.

RESULTADOS

Los desarrollos bioinformáticos sobre la plataforma Tile64 han permitido incrementar el rendimiento de los algoritmos de forma significativa, mediante la paralelización masiva de los mismos. Los mejores resultados se han obtenido cuando se han llevado a cabo desarrollos desde cero, usando además técnicas de computación híbrida. Esta estrategia permite compensar la limitación de recursos en las tarjetas Tilera, usando recursos del ordenador en donde se aloja. Estas posibilidades abren nuevas oportunidades en el estudio bioinformático de los ácidos nucleicos y péptidos (como las proteínas),

dado que hasta ahora no era posible aplicar métodos de alineamiento óptimos desde el punto de vista matemático, estando basados los algoritmos más habituales en aproximaciones heurísticas.

AGRADECIMIENTOS. Agradecemos a Tileria <<http://www.tileria.com>> las herramientas de hardware y software. Financiado por “Ministerio de Economía y Competitividad” (proyectos MINECO AGL2010-17316 y BIO2011-15237-E) e “Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria” (MINECO e INIA RF2012-00002-C02-02); “Consejería de Agricultura y Pesca” (041/C/2007, 75/C/2009 y 56/C/2010) y “Consejería de Economía, Innovación y Ciencia” (AGR-7322 y AGR-482) de “Junta de Andalucía”; “Grupo PAI” (AGR-248); y “Universidad de Córdoba” (“Ayuda a Grupos”), Spain.

REFERENCIAS

Galvez, S, Díaz, D, Hernández, P, Esteban, F.J., Caballero, J.A. Dorado, G (2010): *Next-generation bioinformatics: using many-core processor architecture to develop a web service for sequence alignment*. Bioinformatics vol. 25, issue 5 pp. 683-686.

Esteban, F.J., Díaz, D. Hernández, P. Caballero, J.A. Dorado, G, Gálvez, S. (2011): *MC64: A web platform to test bioinformatics algorithms in a many-core architecture* in: Rocha, M.P. 5th International Conference on Practical Applications of Computational Biology & Bioinformatics vol. 93 pp 9-16. Springer-Verlag Berlin.

Díaz, D., Esteban, F.J., Hernández, P. Caballero, J.A., Dorado, G, Gálvez, S. (2010) *Parallelizing and optimizing a bioinformatics pairwise sequence alignment algorithm for many-core architecture*. Parallel Computing vol. 37 issue 4-5 pp. 244-259.

Esteban, F.J., Díaz, D., Hernández, P., Caballero, J.A., Dorado, G., Gálvez, G. (2012): *Many-Core Processor Bioinformatics and Next-Generation Sequencing* in Liñán, M.: IT Revolutions. Lecture Notes of the Institute for Computer Sciences, Social Informatics and Telecommunications Engineering vol. 82 pp. 172-188 Springer Berlin Heidelberg.

Esteban, F.J., Díaz, D., Hernández, P., Caballero, J.A., Dorado, G., Gálvez, G. (2013): *Direct approaches to exploit many-core architecture in bioinformatics*. Future Generation Computer Systems vol. 29 issue 1 pp. 15-16.

Díaz, D., Esteban, F.J., Hernández, P., Caballero, J.A., Guevara, A., Dorado, G., Gálvez, S. (2014): *MC64-ClustalW, a high parallel strategy to align multiple DNA sequences in many-core architectures*. PLoS ONE 9: e94044 (12 pp).

Esteban, F.J., Díaz, D., Hernández, P., Caballero, J.A., Dorado, G., Gálvez, S. (2013): *MC64-Cluster: A Many-Core CPU Cluster for Bioinformatics Applications* in Correia, A. *Advances in Information Systems and Technologies* vol. 206 pp 819-825 Springer Berlin Heidelberg.

Esteban, F.J., Díaz, D., Hernández, P., Caballero, J.A., Dorado, G., Gálvez, S. (under review): *MC64-Cluster: Architecture of a many-core CPU cluster and performance analysis in B-tree searches*. *Journal of Parallel and Distributed Computing*.

GRUPO AGR158

MERAGEM. MEJORA DE RAZAS Y GENÉTICA MOLECULAR. GENOTOXICOLOGÍA DE ALIMENTOS

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Alonso Moraga, Ángeles.....ge1almoa@uco.es

Merinas Amo, Taniatania_meram@hotmail.com
 Mateo Fernández, Marcosmarcosmatfer@gmail.com
 Merinas Amo, Rocío.....rocio_meram@hotmail.com
 Martínez Jurado, Maríaairam_imj4@hotmail.com
 Balongo Escobar, Manuel.....dolgond@hotmail.com

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Genética, Universidad de Córdoba.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Diagnóstico genético.
2. Carnización y control de calidad.
3. Mejora y conservación animal.
4. Genotoxicología y antigenotoxicología de alimentos.
5. Citogenética aplicada y molecular.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Tasset-Cuevas I, Fernández-Bedmar Z, Lozano-Baena MD, Campos-Sánchez J, De Haro-Bailón A, Muñoz-Serrano A, Alonso-Moraga A (2013) Effect of Borage Seed Oil and Gamma Linolenic Acid in DNA. *In Vivo and In Vitro Studies. PLOS ONE*. 8(2).

Villatoro-Pulido M, Font R, Obregón-Cano S, Moreno-Rojas R, Amaro-López MA, Anter J, Muñoz-Serrano A, De Haro-Bailón A, Alonso-Moraga A, Del Río-Celestino M (2013) Cytotoxic and genotoxic effects of metal(oid)s bioactived in rocket leaves (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* Miller). *Chemosphere*. 93(10): 2554-2561.

Merinas-Amo T, Villalba-Benito L, Almagro-Berlanga R, Romero-Jiménez M, Mateo-Fernández M, Alonso-Moraga A, Calahorra-Núñez F (2013)

Toxicological, genotoxicological, antigenotoxicological, cytotoxicity and lifespan studies of beer and some components. *Toxicol Lett.* 221: S59-S256.

Anter J, Fernández-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Demyda-Peyras S, Moreno Millan M, Alonso-Moraga A, Muñoz-Serrano A, Luque de Castro MD (2011) A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extract. *Mut Res.* 723: 165-170.

Fernández-Bedmar Z, Anter J, Villatoro-Pulido M, Marin-Palanco V, Del Rio-Celestino M, Muñoz-Serrano A, Alonso-Moraga A, Roman-Gomez J (2011) The orange phenol hesperidin can induce genome-wide hypomethylation in cancer cells as a non-genotoxic mechanism of gene regulation. *Toxicol Lett.* 205: S36-S59.

PONENCIA

ENSAYOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BEBIDAS DE ALTO CONSUMO

RESUMEN

Nuestro grupo estudia el potencial nutracéutico de alimentos contenidos en la dieta mediterránea (aceites, plantas medicinales, vegetales y zumos de cítricos) así como sus componentes bioactivos distintivos. En la actualidad nos centramos en bebidas de alto consumo (cerveza y bebidas de cola). Se utiliza el sistema *in vivo* de Mutaciones y Recombinaciones Somáticas en células en proliferación de discos imaginales alares de *Drosophila melanogaster* (SMART) para determinar su seguridad alimentaria, su papel en la protección del daño de ADN así como su influencia en la extensión de la esperanza y calidad de vida. En el sistema *in vitro* de la línea celular promielocítica humana HL-60 se analiza la potencia tumoricida de las sustancias que previamente han sido detectadas como antigenotóxicas frente a genotoxinas de tipo oxidativo, investigando si la capacidad citotóxica de estas sustancias se lleva a cabo por la vía apoptótica mediante fragmentación internucleosómica del ADN. El papel modulador de los niveles de metilación en secuencias repetitivas por parte de la cerveza y de las bebidas de cola se ha estudiado tanto en el sistema *in vitro* de células HL-60 como en ensayos pre-clínicos con grupos de humanos voluntarios sanos.

INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de la Toxicología Genética es asesorar sobre el daño genético causado por diferentes agentes ambientales. Los alimentos interactúan fuertemente con las células somáticas del cuerpo humano. Muchas de las terapias recientes para paliar o prevenir las enfermedades degenerativas relacionadas con el cáncer incluyen el uso de preparados botánicos tradicionales. Aunque pueden ser bioactivados y producir cáncer, la mayoría son consideradas como productos comerciales saludables (Zhou et al., 2004).

Un exceso de especies reactivas de oxígeno (EROS) produce estrés oxidativo, siendo éste el proceso que más contribuye al daño genético basal (Burcham, 1999). El peróxido de hidrógeno puede actuar directamente sobre el ADN o modular la transcripción y suprimiendo rutas de reparación genómicas. Allen y Tresini (2000) han descrito centenares de efectos del peróxido de hidrógeno sobre más de cien genes. Una estrategia alternativa que está teniendo lugar actualmente es consumir deliberadamente alimentos con potencial anticarcinogénico y antimutagénico que puedan prevenir o revertir algunos de los efectos producidos por los carcinógenos.

OBJETIVOS

El objetivo general de nuestros trabajos es realizar un barrido en los componentes comunes de la dieta mediterránea para localizar sustancias antimutagénicas que puedan ser además citotóxicas frente a células cancerosas en proliferación. Ambos enfoques complementan la información requerida para poder aconsejar sobre el consumo de ciertos alimentos como funcionalmente beneficiosos.

RESULTADOS

Todas las cervezas y sus componentes bioactivos estudiados, exceptuando el ácido fólico, muestran un alto potencial citotóxico en todas las concentraciones llevadas a cabo induciendo la muerte celular por vía apoptótica de dichas células cancerosas. En los estudios *in vivo* realizados en *D. melanogaster*, los resultados muestran características potencialmente beneficiosas como sustancias protectoras del ADN tanto frente a agentes genotóxicos, como a toxinas. Además las cervezas muestran características prometedoras en la extensión y calidad de vida de dichos organismos. Ver detalle en tabla 1.

La Coca-Cola clásica y la Coca-Cola sin cafeína muestran potencial quimiopreventivo y protector frente al daño oxidativo ya que presentan carácter antitoxico, antigenotóxico y citotóxico. La bebida de cola clásica alarga la esperanza de vida, así como la calidad de vida en *Drosophila melanogaster*. Por otro lado, la cola sin cafeína solamente aumenta la calidad de vida. La cafeína no es ni promotora de salud ni agente antioxidante. Ver detalle en tabla 1.

Los resultados preliminares sobre estudios epigenéticos en células HL-60 tratadas con cerveza y un grupo de humanos sanos voluntarios tratados con Heineken, muestran un aumento de los patrones de metilación en las secuencias genómicas repetitivas Alu, Line y Sat-alpha. Este mismo patrón se muestra en las células tratadas con ácido fólico y xanthohumol. Las células tratadas con Coca-Cola clásica muestran mayores niveles de desmetilación para las secuencias Alu que los mostrados en la Coca-Cola sin cafeína. Esta diferencia se explica por el efecto desmetilante que presenta la cafeína (ver tabla 1.)

REFERENCIAS

Allen RG, Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 28: 463-499.

Burcham PC (1998) Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 13: 287-305.

Zhou S, Koh HL, Gao Y, Gong ZY, Lee EJD (2004) Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. *Life Sciences.* 74: 935-968.

Tabla1. Resumen de los resultados obtenidos en nuestras investigaciones en bebidas de alto consumo.

| | COCA-COLA CLÁSICA | COCA-COLA SIN CAFEÍNA | CAFEÍNA | HEINEKEN | GUINNESS | AC FÓLICO | COLINA | XANTHOTHUMOL | ISOXANTHOTHUMOL | HUMULONA |
|---------------------|-------------------|-----------------------|---------|----------|----------|-----------|--------|--------------|-----------------|----------|
| TOXICIDAD | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ANTI TOXICIDAD | + | + | 0 | + | + | - | + | + | + | + |
| GENOTOXICIDAD | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ANTI GENOTOXICIDAD | + | + | 0 | + | + | + | + | + | 0 | + |
| LONGEVIDAD | + | 0 | + | + | - | + | + | + | + | - |
| CALIDAD DE VIDA | + | + | + | + | 0 | + | + | + | + | - |
| CITOTOXICIDAD | + | - | + | + | + | - | + | 0 | 0 | + |
| FRAGMENTACION | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + |
| METILACIÓN GENÓMICA | - | - | - | + | N/A | + | N/A | + | N/A | N/A |

+: posee dicho efecto 0: sin efecto significativo -: no posee dicho efecto N/A: no estudiado

GRUPO CTS624

NEUROPLASTICIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Túnez Fiñana, Isaac fm2tufii@uco.es

Luque Carabot, Evelio..... cm1lucae@uco.es

Sánchez López, Fernando fernansanzlo@hotmail.com

Feijóo López, Montserrat monfey@hotmail.com

Gascón Luna, Félix felix.gascon.sspa@juntadeandalucia.es

Agüera Morales, Eduardo..... doctoredu@gmail.com

Vieyra Reyes, Patricia picoslava@yahoo.com.mx

LaTorre Luque, Manolo.....bc2tolum@uco.es

Aguilar Luque, Macarenab82aglum@uco.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Universidad de Córdoba.

Departamento de Ciencias Morfológicas, Unidad de Histología, Facultad de Medicina, IMIBIC/Universidad de Córdoba.

Unidad de Gestión Clínica de Neurología, IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía.

Unidad de Gestión Clínica de Análisis Clínicos, IMIBIC/Hospital Comarcal Valle de los Pedroches de Pozoblanco.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas. Desarrollo de estudios clínicos y modelos animales, especialmente enfermedad de Huntington y esclerosis múltiple, conducentes a una mejor comprensión de la fisiopatología de estas enfermedades y del papel jugado por las especies reactivas, analizando la plasticidad neuronal. Base, para el diseño y planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas.

2. Estudio de los efectos terapéuticos de la estimulación magnética transcraneal en procesos degenerativos en modelos animales y clínicos. Análisis se las bases moleculares y celulares que subyacen en sus efectos neuroprotectores.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Tasset I, Agüera E, Sánchez-López, Feijóo M, Giraldo AI, Cruz AH, Gascón F, Túnez I. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Biochem.* 45: 440-444.

Tasset I, Medina FJ, Jimena I, Agüera E, Gascón F, Feijóo M, Sánchez-López F, Luque E, Peña J, Drucker-Colín R, Túnez I (2012) Neuroprotective effects of extremely low-frequency fields on a Huntington's disease rat model: effects on neurotrophic factors and neuronal density. *Neuroscience* 209: 54-63.

Tasset I, Pérez-Herrera A, Medina FJ, Arias-Carrión O, Drucker-Colín R, Túnez I (2013) Extremely low-frequency electromagnetic fields activate the antioxidant pathway Nrf2 in a Huntington's disease-like rat model. *Brain Stimul.* 6: 84-86.

Medina FJ, Túnez I (2013) Mechanisms and pathways underlying the therapeutic effect of transcranial magnetic stimulation. *Rev Neurosci.* 24: 507-525.

Bahamonde C, Conde C, Agüera E, Lillo R, Luque E, Gascón F, Feijóo M, Cruz AH, Sánchez-López F, Túnez I (2014) Elevated melatonin levels in natalizumab-treated female patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Relationship to oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 730: 26-30.

PONENCIA

EFFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL EN LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL EN LA RATA

INTRODUCCIÓN

La estimulación magnética transcraneal (EMT) es una técnica no-invasiva usada recientemente para el tratamiento de enfermedades psiquiátricas (depresión mayor, esquizofrenia, etc.) y neurodegenerativas (enfermedad de Huntington, ictus, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer,...).

Su fundamento físico es el principio de Faraday donde un campo eléctrico genera perpendicularmente a él un campo magnético y viceversa. Aplicado este campo sobre el cuero cabelludo, el campo magnético volverá a desencadenar en la corteza cerebral otro campo eléctrico perpendicular a él que desencadenará la despolarización de las células excitables.

Numerosos estudios muestran su potencial terapéutico, si bien es conocido que cualquier cambio en sus características de estimulación (frecuencia, intensidad, amplitud, protocolo de aplicación, etc.) implica modificaciones que lo llevarían a ser un nuevo tratamiento o para entendernos “fármaco”. Junto a ello, existe un amplio desconocimiento sobre los cambios bioquímicos, moleculares y celulares que desencadena.

OBJETIVOS

Evaluar el efecto neuroprotector de la estimulación magnética transcraneal con campos de extrema-baja frecuencia en un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) similar a esclerosis múltiple (EM).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron 16 ratas macho de la cepa Dark agouti, con un peso al inicio del estudio entre 180 y 200g y una edad de 2 meses. Éstas fueron distribuidas en cuatro grupos de cuatro animales cada uno: i) control; ii) vehículo (inyectado con el adyuvante de Freund), iii) EAE inyectadas con el adyuvante de Freund complementado con glucoproteína oligodendrocítica de la mielina, MOG); y iv) EAE+EMT (grupo EAE tratado con estimulación magnética transcraneal).

El modelo de EAE, es un modelo con características similares a la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR). Las ratas son inmunizadas subcutáneamente mediante la inoculación de 150 μ g de MOG, emulsionados en medio de Freund suplementado con 400 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor, en la raíz de la cola. Los animales fueron pesados y valorados clínicamente de forma diaria.

La estimulación magnética fue desarrollada mediante un campo magnético oscilatorio con una frecuencia de 60 Hz y una amplitud de 0.7 mT. Este campo fue aplicado durante 21 días (3 semanas) de lunes a viernes y en sesión de dos horas por la mañana. La estimulación comenzó a los 14 días de haberseles inoculado el MOG.

RESULTADOS

Las ratas inyectadas con MOG mostraron una progresiva y significativa parálisis en sus miembros. Esta situación fue paralela al incremento en los biomarcadores de daño oxidativo en el tejido cerebral y en la médula espinal. Por su parte, el peso no mostró cambios significativos (Fig. 1).

La aplicación de EMT causó la mejoría del animal valorada como descensos en la escala clínica de parálisis clínica y reducción en el estrés oxidativo (Fig.1).

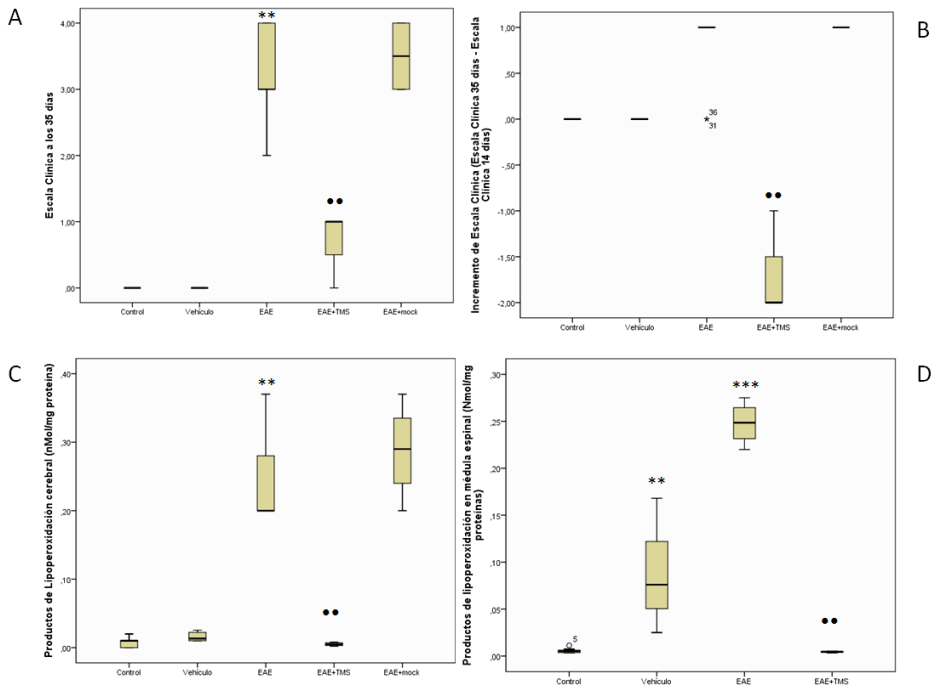


Figura 1. Efectos de MOG y EMT sobre la escala de parálisis clínica (A y B) y los niveles de productos de lipoperoxidación en cerebro (C) y médula espinal (D). La n por grupo fue de 6 animales. Los datos se representan en diagramas de cajas que recogen la mediana, valores máximos y mínimos, los datos *out-layer*. La significancia estadística fue calculado con el programa SPSS 17® mediante la aplicación de un ANOVA con prueba *post hoc* de Bonferroni.

***P < 0.001 vs control; **P < 0.01 vs control; ●●P < 0.01 vs EAE.

CONCLUSIONES

La EMT muestra un efecto neuroprotector en el modelo de encefalomiелitis autoinmune inducida por MOG en la rata. Estos datos avalan el potencial terapéutico de EMT para la EM. Sin embargo, más estudios son necesarios en esta línea.

REFERENCIAS

Medina FJ, Túnez I (2013) Mechanisms and pathways underlying the therapeutic effect of transcranial magnetic stimulation. *Rev Neurosci.* 24:507-525.

Tasset I, Pérez-Herrera A, Medina FJ, Arias-Carrión O, Drucker-Colín R, Túnez I (2013) Extremely low-frequency electromagnetic fields activate the antioxidant pathway Nrf2 in Huntington's disease-like rat model. *Brain Stimul.* 6: 84-86.

Tasset I, Medina FJ, Jimena I, Agüera E, Gascón F, Feijóo M, Sánchez-López F, Luque E, Peña J, Drucker-Colín R, Túnez I (2012) Neuroprotective effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on a Huntington's disease rat model: effects on neurotrophic factors and neuronal density. *Neuroscience.* 209: 54-63.

Medina FJ, Túnez I (2010) Huntington's disease: the value of transcranial magnetic stimulation. *Curr Med Chem.* 17: 2482-2491.

GRUPO BIO202

MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Ramos Ruiz, José mi1raruj@uco.es

Herrera Vega, Rito rhhv76@yahoo.es

Salazar Moreno, Ana g32samo@uco.es

Suarez Lopez, Laura b02sulol@uco.es

Granero expósito, Laura b92grexl@uco.es

Mellado Jiménez, Virginia b02mejiv@uco.es

Ramos Moreno, Laura m72ramol@uco.es

Calero Dueñas, Fernando mi1caduf@uco.es

Medina Navarro, Teresa rb3menam@uco.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Microbiología, UCO.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Homeostasis iónica en levaduras y hongos filamentosos.
2. Respuestas a estreses abióticos en levaduras.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Zajc J, Kogej T, Galinski E, Ramos J, Gunde-Cimerman N (2014) The osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus *Walleimia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. *Appl. Environ. Microbiology* 80:247-256

Herrera R, Alvarez MC, Gelis S, Sychrová H, Kschischo M, Ramos J. (2014) Role of *Saccharomyces cerevisiae* Trk1 in stabilization of intracellular potassium content upon changes in external potassium levels. *BBA-Biomembranes* 1838:127-133

Molero C, Petrényi K, González A, Carmona C, Gelis S, Abrie JÁ, Strauss E, Ramos J, Dombradi V, Hidalgo E, Ariño J. (2013) The *Schizosaccharomyces pombe* fusion gene *hal3* encodes three distinct activities. *Molecular Microbiology* 90:367-382

Herrera R, Alvarez MC, Gelis S, Ramos J. (2013) Subcellular potassium and sodium distribution in *Saccharomyces cerevisiae* wild type and vacuolar mutants. *Biochemical Journal* 454:525–532

Michán C, Martínez JL, Alvarez MC, Turk M, Sychrova H, Ramos J. (2013) Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and *Debaryomyces fabryi*. *FEMS Yeast Research* 13:180-188

PONENCIA

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE POTASIO Y SODIO EN LAS LEVADURAS *Saccharomyces cerevisiae* Y *Debaryomyces hansenii*

RESUMEN

Una distribución intracelular de potasio y sodio correcta es fundamental en la homeostasis de cationes y en el funcionamiento celular. En el caso de las levaduras es sorprendente el hecho de que no han existido protocolos suficientemente fiables para estudiar estos procesos. Nuestro grupo ha puesto a punto recientemente un procedimiento en el que tras aislar los principales orgánulos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, hemos analizado su contenido en potasio y sodio. Lo hemos hecho en una cepa silvestre y en diversos mutantes de interés. Actualmente trabajamos en la adaptación de nuestro protocolo a las peculiaridades de *Debaryomyces hansenii*, una levadura de ambientes salinos e inclusora de sodio que posee menor tamaño y pared celular más resistente que *Saccharomyces*.

INTRODUCCIÓN

Las células vivas acumulan generalmente grandes cantidades de potasio para cumplir diversas funciones fisiológicas y, al mismo tiempo, tratan de mantener niveles bajos de sodio ya que este catión puede ser tóxico si alcanza ciertas concentraciones internas. Por tanto, una distribución intracelular de potasio y sodio correcta es fundamental en la homeostasis de cationes y en el funcionamiento celular. En el caso de las levaduras es sorprendente el hecho de que no han existido protocolos suficientemente fiables para estudiar estos procesos y los pocos estudios que han tratado de determinar la localización subcelular de cationes han resultado ser, en general, demasiado simplistas ya que asumían “de facto” que el 100% de los cationes intracelulares pertenecían a la vacuola o al citoplasma ignorando otras estructuras y compartimentos celulares (Okorokov et al 1980).

OBJETIVOS

El Objetivo de este trabajo es doble. Por una parte pretende establecer una metodología fiable para el aislamiento y análisis de cationes de los principales orgánulos de la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Por otra parte se busca la utilización de ese procedimiento para obtener información sobre la localización subcelular de potasio y sodio en levaduras mutantes, pertenecientes a diversos géneros o crecidas en diferentes condiciones ambientales.

RESULTADOS

Nuestro grupo ha puesto a punto recientemente un procedimiento en el que tras aislar los principales orgánulos de la levadura, hemos analizado su contenido en potasio y sodio. Lo hemos hecho en una cepa silvestre y en diversos mutantes vacuolares. En resumen, hemos concluido que, en todos los casos, los núcleos retienen cantidades importantes de potasio y sodio (aproximadamente un 25-35% del total) y que el contenido de potasio del citosol, aunque relativamente bajo, está altamente regulado y se mantiene aceptablemente constante cuando los niveles del catión en el medio son limitantes. Por otra parte, los mutantes vacuolares mostraron una distribución intracelular de cationes alterada con cantidades mayores de potasio y sodio en citosol y menores en vacuola probable consecuencia de los diversos defectos que presentan en este orgánulo. Finalmente, todas las cepas contenían un porcentaje pequeño pero significativo de cationes en retículo endoplásmico, Golgi y mitocondrias (Herrera et al 2013)

Actualmente estamos ampliando nuestro estudio a otras cepas de *S. cerevisiae* y a nuevas levaduras que, por sus peculiaridades ecológicas y fisiológicas, puedan resultar de interés. De esta manera, hemos determinado la localización subcelular de potasio en mutantes (*trk1,2*) carentes del principal transportador del catión de la membrana plasmática y lo hemos realizado en dos condiciones distintas: utilizando células que crecieron en altas concentraciones del catión (50 mM KCl, condiciones en las que crecen de manera similar a la cepa silvestre) y utilizando células creciendo en condiciones limitantes para el doble mutante *trk* (5 mM KCl). Los resultados, que se mostrarán durante la presentación oral, indican que en alto potasio las dos cepas acumularon cantidades totales de potasio similares y que no hubo grandes diferencias en su compartimentación aunque se midieron valores algo más bajos en el núcleo y la vacuola y valores algo más altos en la fracción citoplasmática del mutante. Las diferencias fueron mucho más importantes cuando las dos cepas crecieron en 5 mM de KCl. En estas condiciones la cepa control crece sin problemas pero el mutante presenta un crecimiento defectivo debido a sus problemas para transportar potasio al interior celular. De esta manera, el potasio intracelular total del mutante sólo alcanzó poco

más de la mitad del valor medido en la cepa control. Estas diferencias se vieron reflejadas en todos los orgánulos con disminuciones importantes en el contenido de potasio. Es reseñable que la fracción citoplasmática fue la que, en proporción, mantuvo valores más cercanos a los de la cepa silvestre, lo que confirma la importancia del mantenimiento de cantidades de potasio citosólico lo más constantes posible frente a situaciones de cambio en el exterior.

Por último cabe mencionar que, como se ha indicado anteriormente, estamos interesados en el estudio de otras levaduras de las denominadas no-conconvencionales. En este sentido, pretendemos analizar el caso de *Debaryomyces hansenii*, una levadura de ambientes salinos e incluso de sodio (Ramos et al 2011). Habitualmente se ha aceptado que un posible determinante de halotolerancia en este organismo podría residir en una muy eficiente capacidad de secuestrar el sodio en ciertos orgánulos manteniendo un citoplasma prácticamente libre del catión pero una hipótesis alternativa es la posibilidad de que esta levadura se haya adaptado a utilizar sodio en las diversas funciones fisiológicas para las que se usa habitualmente solo potasio y, de esta manera, no sería intoxicada por el catión. Actualmente trabajamos en la adaptación de nuestro protocolo a las peculiaridades de *D. hansenii* (menor tamaño, pared celular más resistente...) con el fin de poder dar respuesta a las hipótesis alternativas y no mutuamente excluyentes, que se han planteado.

REFERENCIAS

Okorokov LA, Lichko LP, Kulaev IS (1980) Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium, and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J. Bacteriol.* 144: 661-665

Herrera R, Alvarez MC, Gelis S, Ramos J. (2013) Subcellular potassium and sodium distribution in *Saccharomyces cerevisiae* wild type and vacuolar mutants. *Biochemical Journal* 454:525–532

Ramos J, Ariño J, Sychrová H. (2011) Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* 317:1-8

GRUPO BIO139

ADIPOLOGÍA Y ENFERMEDAD METABÓLICA (Línea 2)

COMPONENTES:

RESPONSABLE:

Línea 2: Malagón Poyato, María del Mar..... bc1mapon@uco.es

Línea 2:

Almabouada Farid bc2alaf@uco.es
 Crespo Echeverria Karen Gwendolynez32creck@uco.es
 García Navarro, Socorrobc1ganas@uco.es
 Gracia Navarro, Francisco.....fgracia@uco.es
 Guzmán Ruiz, Rocío bc2gurur@uco.es
 Molero Murillo, Laura..... bc2momul@uco.es
Moreno Castellanos, Natalia Rocío z92mocan@uco.es
 Rabanal Ruiz, Yoana b62raruy@uco.es
 Sá Gomes, Andreia Cristina acgomes@med.up.pt
 Trávez García, Andrés Ricardo.....z02trgaa@uco.es
 Vazquez Martinez, Rafael.....bc2vamar@uco.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba.

CIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Fisiopatología del tejido adiposo. Identificación mediante técnicas ómicas y caracterización de biomarcadores de disfunción de tejido adiposo en obesidad y lipodistrofia. Adipobiología. Regulación de tráfico intracelular de proteínas y lípidos. Regulación del metabolismo lipídico en adipocitos.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Guzman-Ruiz, R., Ortega, F., Rodriguez, A., Vazquez-Martinez, R., Diaz-Ruiz, A., Garcia-Navarro, S., Giralta, M., Garcia-Rios, A., Cobo-Padilla, D., Tinahones, F.J., et al. (2014) Alarmin high-mobility group B1 (HMGB1) is regulated in human adipocytes in insulin resistance and influences insulin secretion in beta-cells. *Int J Obes (Lond)*. Feb 28. doi: 10.1038/ijo.2014.36. [Epub ahead of print]

Peinado, J.R., Diaz-Ruiz, A., Fruhbeck, G., and Malagon, M.M. (2014) Mitochondria in metabolic disease: Getting clues from proteomic studies. *Proteomics* 14:452-466.

Malagon, M.M., Diaz-Ruiz, A., Guzman-Ruiz, R., Jimenez-Gomez, Y., Moreno, N.R., Garcia-Navarro, S., Vazquez-Martinez, R., and Peinado, J.R. (2013) Adipobiology for novel therapeutic approaches in metabolic syndrome. *Curr Vasc Pharmacol* 11:954-967.

Almabouada, F., Diaz-Ruiz, A., Rabanal-Ruiz, Y., Peinado, J.R., Vazquez-Martinez, R., and Malagon, M.M. (2013) Adiponectin receptors form homomers and heteromers exhibiting distinct ligand binding and intracellular signaling properties. *J Biol Chem* 288:3112-3125.

Peinado, J.R., Quirós, P.M., Pulido, M.R., Mariño, G., Martínez-Chantar, M.L., Vázquez-Martínez, R., Freije, J.M., López-Otín, C., Malagón, M.M. (2011) Proteomic profiling of adipose tissue from *Zmpste24*^{-/-} mice, a model of lipodystrophy and premature aging, reveals major changes in mitochondrial function and vimentin processing. *Mol Cell Proteomics* 10:M111.008094.

PONENCIA (Línea 2)

NUEVOS MARCADORES CELULARES DE OBESIDAD Y ENFERMEDAD METABÓLICA

El grupo de Adipobiología está interesado en la identificación de biomarcadores del tejido adiposo que definan la asociación de la disfunción de dicho tejido con el desarrollo de enfermedades metabólicas (resistencia a insulina y diabetes de tipo 2, y patologías asociadas), como ocurre en condiciones de exceso (obesidad) o defecto (lipodistrofia) del mismo. En este mismo contexto, nos interesa determinar los mecanismos moleculares que definen la transición desde la obesidad sin complicaciones metabólicas a aquella asociada a enfermedad metabólica (obesos metabólicamente sanos –MHO- vs. resistentes a insulina o con diabetes de tipo 2 –MUO-), así como los responsables de la recuperación de la normalidad metabólica observada tras cirugía bariátrica.

Para alcanzar dichos objetivos, nuestro grupo aplica una estrategia multidisciplinaria que incluye estudios de biología celular, biología molecular, regulación de la expresión génica y análisis proteómicos. En particular, hemos caracterizado el perfil proteómico del tejido adiposo de pacientes metabólicamente sanos y pacientes insulino resistentes antes y un año después de someterse a cirugía bariátrica. Hemos identificado 49 proteínas que se agrupan en 3 grupos biológicos atendiendo a su función: proteínas asociadas al citoesqueleto, relacionadas con angiogénesis y con metabolismo celular.

Dentro de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto, identificamos una que no había sido previamente caracterizada en tejido adiposo, Septin 11 (Sept11), una GTPasa de la familia de las septinas, que han sido definidas como el cuarto componente del citoesqueleto {Mostowy, 2012 #205}. Nuestros primeros hallazgos indican que Sept11 se expresa preferencialmente en adipocitos cuando se compara con la expresión en los demás tipos celulares del tejido adiposo. Además, la expresión de Sept11 está elevada en diversos depósitos grasos (tejido adiposo subcutáneo y visceral) de pacientes obesos normoglucémicos y/o insulino resistentes, está regulada por estímulos lipolíticos (agonistas de receptores β -adrenérgicos como el isoproterenol y agentes pro-inflamatorios como TNF- α y LPS) y

lipogénicos (insulina). En conjunto, estos resultados sugieren una relación entre Sept11 y el desarrollo de obesidad e insulino resistencia.

Para profundizar en la caracterización de la posible función de Sept11 en adipocitos, hemos investigado su distribución en estas células en relación a diferentes componentes del citoesqueleto, con los que se ha demostrado que interaccionan las septinas {Kinoshita, 2002 #208}. Estudios de microscopía confocal de Sept11 en adipocitos 3T3-L1 diferenciados (día 8-9) muestran que esta proteína forma anillos en la superficie celular, con una distribución similar a las caveolas, que son estructuras especializadas de la membrana plasmática enriquecidas en actina {Richter, 2008 #365}. Además, en adipocitos en diferenciación, murinos o humanos, Sept11 tiene una distribución similar a las fibras de estrés de actina, en algunos casos asociadas a las gotas lipídicas. Finalmente, hemos identificado el interactoma de Sept11 en adipocitos mediante ensayo de doble híbrido de levadura, que incluye desde proteínas relacionadas con la polimerización de actina (ARHGAP21) a transportadores de ácidos grasos (FABP5).

En definitiva, nuestros resultados permiten identificar a Sept11 como un nuevo elemento básico del citoesqueleto asociado a actina y estructuras relacionadas, las caveolas, que puede jugar un papel en la adaptación de la fisiología celular del adipocitos a un incremento de su metabolismo.

REFERENCIAS

1. Mostowy, S., and Cossart, P. 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:183-194.
2. Weirich, C.S., Erzberger, J.P., and Barral, Y. 2008. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:478-489.
3. Kinoshita, M., Field, C.M., Coughlin, M.L., Straight, A.F., and Mitchison, T.J. 2002. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell* 3:791-802.
4. Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M.R., Morgan, G.P., Marsh, B.J., and Parton, R.G. 2008. High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic* 9:893-909.

Sesión Tercera

GRUPOS BIO151 Y BIO187

Grupo PAI BIO151: BIOMARCADORES MOLECULARES DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Grupo PAI BIO187: BIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS MECANISMOS DE RESPUESTA A ESTRÉS

COMPONENTES:

RESPONSABLE: LÓPEZ BAREA, JUAN.....bb1lobaj@uco.es
PUEYO DE LA CUESTA, CARMENbb1pucuc@uco.es

ABRIL DÍAZ, M^a NIEVES

ALHAMA CARMONA, JOSÉ

FERNÁNDEZ CISNAL, RICARDO

GARCÍA GARCÍA, TRANSITO

GÓMEZ-CHAPARRO MORENO, JOSÉ LUIS

JURADO CARPIO, JUAN

MICHÁN DOÑA, CARMEN M^a

MORALES PRIETO, NOELIA

OSUNA JIMÉNEZ, INMACULADA

PRIETO ÁLAMO, M^a JOSÉ

RUIZ LAGUNA, JULIA

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, UCO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Evaluación de Respuestas Biológicas a Contaminantes Convencionales y Emergentes Integrando Métodos Analíticos en Exposiciones Controladas. Validación en Ecosistemas Estuáricos (CTM2012-38720-CO3-02, MEC)
2. Respuestas biológicas a contaminantes del entorno de Doñana: Integración de metodologías ómicas en exposiciones controladas y validación en estudios de campo (BIO1657, JA)
3. Acuicultura: Efecto del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre los patrones de expresión transcripcional y proteica en

peces de interés en acuicultura (*Solea senegalensis* y *Sparus aurata*) (AGL2011-30381-C03-03. 2012-2014)

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Aguilar-Melero P, Prieto-Álamo MJ, Jurado J, Holmgren A, Pueyo C (2013) Proteomics in HepG2 hepatocarcinoma cells with stably silenced expression of *PRDX1*. *Journal of Proteomics* 79: 161-171

González-Fernández M, García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, Navarro-Roldán F, García-Barrera T, López-Barea J, Pueyo C, Gómez-Ariza JL (2013) Use of metallomics in environmental pollution assessment using mice *Mus musculus*/*Mus spretus* as bioindicators. *Current Analytical Chemistry* 9: 229-243.

Jara-Biedma R, González-Domínguez R, García-Barrera T, López-Barea J, Pueyo C, Gómez-Ariza JL (2013) Evolution of metallothionein isoforms complexes in hepatic cells of *Mus musculus* along cadmium exposure. *Biometals* 26: 639-650.

Abril N, Ruiz-Laguna J, García-Sevillano MA, Mata AM, Gomez-Ariza JL, Pueyo C (2014) Heterologous microarray analysis of transcriptome alterations in *Mus spretus* mice living in an industrial settlement. *Environmental Science & Technology* 48: 2183-2192.

García-Sevillano MA, García-Barrera T, Abril N, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL. (2014) Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator. *J Proteomics*. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.032. [Epub ahead of print] Review.

PONENCIA

NUEVAS HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RESPUESTAS BIOLÓGICAS A LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Noelia Morales-Prieto, Ricardo Fernández-Cisnal y Nieves Abril

RESUMEN

El estudio de situaciones de estrés ambiental precisa del conocimiento de la respuesta biológica a los contaminantes. Esta respuesta resulta compleja de interpretar por los numerosos los factores que influyen en la misma, asociados a procesos de sinergismo/antagonismo entre los contaminantes y la interacción con sustancias presentes en los ecosistemas. Por ello se hace necesario el uso integrado de herramientas analíticas muy potentes que informen de forma simultánea sobre las biomoléculas que participan en los mecanismos de defensa y el restablecimiento de los ciclos homeostáticos alterados por la contaminación. Las metodologías *ómicas* ofrecen grandes posibilidades en este sentido. La integración de los resultados obtenidos mediante su aplicación tanto en animales de vida libre como en experimentos de exposición controlas en laboratorio, está permitiendo identificar nuevos biomarcadores moleculares, no sesgados y altamente discriminatorios, que pretendemos convertir en una herramienta precisa y asequible tanto para la detección temprana de contaminantes específicos como para la monitorización rutinaria de la calidad ambiental.

INTRODUCCIÓN

El Parque Nacional de Doñana (PND), declarado Reserva de la Biosfera y Patrimonio de la Humanidad, es hoy un ecosistema en estado crítico debido a la entrada, a través de los numerosos acuíferos que lo riegan, de contaminantes procedentes de las actividades industriales y agrícolas que se desarrollan en su entorno. Los biomarcadores convencionales sólo proporcionan información de un número limitado de parámetros, lo que han impulsado la introducción de las metodologías de información masiva (las *ómicas*) en estudios medioambientales{Abril, 2011; Lopez-Barea, 2006; Abril, 2011; Lopez-Barea, 2006}. Las metodologías *ómicas* (transcriptómica, proteómica,

metabolómica) persiguen el conocimiento del conjunto de transcritos, proteínas y metabolitos que se expresan en una célula, tejido u organismo en un tiempo determinado. Mediante proyectos integradores de resultados obtenidos por métodos biológicos, bioquímicos y químicos, convencionales o de última generación (algunos en vías de desarrollo), de respuestas dirigidas o masivas, etc., pretendemos obtener una visión global de los procesos que se producen en el ambiente entre contaminantes y animales de vida libre capturados en ecosistemas terrestres y acuáticos del entorno de Doñana {Abril, 2014; Garcia-Sevillano, 2014; Garcia-Sevillano, 2012}.

OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es la integración de resultados obtenidos por aproximaciones ómicas (transcriptómica, proteómica y metabolómica) para la **identificación de biomarcadores y su aplicación a la evaluación de la calidad ambiental** de ecosistemas terrestres y acuáticos. Asimismo, se pretende evaluar la respuesta biológica a contaminantes modelo en experimentos de exposición controlada en laboratorio para **dilucidar cuál es la base molecular subyacente a las respuestas biológicas observadas** frente a contaminantes individuales, en exposiciones controladas, de modo que las respuestas biológicas observadas en el campo permitan identificar con cierta seguridad qué tipo de contaminante está presente en el ecosistema. Un estudio final con animales de campo permitirá la validación de los resultados obtenidos en las experiencias de exposición y el **diseño de una metodología analítica integrada para una evaluación segura de ecosistemas**.

RESULTADOS

1. **Estudios con animales de campo: Utilización del ratón moruno *Mus spretus* como organismo bioindicador de contaminación en el entorno de Doñana.** La técnica proteómica iTRAQ utiliza etiquetas isobáricas para cuantificar proteínas. Con esta metodología pudimos comparar cambios cuantitativos en proteínas hepáticas de *M. spretus* capturados en diversas áreas del entorno de Doñana, con altos niveles de contaminación por metales y pesticidas. El estudio funcional de estas proteínas indicó diferentes estrategias defensivas en estos animales procedentes de zonas contaminadas.

2. Estudios con animales de campo: Utilización del cangrejo rojo *Procambarus clarkii* como organismo bioindicador de contaminación en ecosistemas acuáticos. Mediante proteómica 2-DE-DIGE se ha identificado un conjunto de proteínas de *P. clarkii* diferencialmente expresadas en las mismas zonas objeto de análisis transcriptómico, encontrándose coincidencias que demuestran que algunos de los cambios a nivel de proteínas tienen su origen en cambios a nivel del correspondiente mRNA.

Se ha optimizado un método electroforético (1-DE y 2-DE) para la determinación de disulfuros proteicos, identificándose un conjunto de proteínas (e isoformas) oxidadas en animales problema en comparación con los de referencia, poniéndose de manifiesto que algunas de las proteínas diferencialmente expresadas contienen tioles susceptibles de oxidación. El estrés oxidativo de los animales con proteínas oxidadas se ha confirmado mediante la cuantificación de los niveles de malondialdehído.

La construcción de genotecas supresivas sustractivas (SSH) permite hacer análisis transcriptómicos aun en ausencia de conocimiento previo de las secuencias del organismo en estudio. Mediante SSH se han podido identificar transcritos de *P. clarkii* diferencialmente expresados en animales capturados en las zonas problema del entorno de Doñana. Los resultados se han validado mediante cuantificación absoluta por qRT-PCR y verificado en individuos capturados en otras zonas problema. Los genes diferencialmente expresados en animales procedentes de zonas contaminadas indican alteraciones en los patrones de expresión de proteínas implicadas en múltiples procesos biológicos, como la respuesta inmune innata, la respuesta a estrés y regulación del metabolismo.

3. Exposiciones controladas a contaminantes ambientales: Utilización de ratones *Mus spretus* para la determinación de las bases moleculares de la toxicidad de contaminantes modelo como el DDE. A partir de ratones *M. spretus* capturados hace pocas generaciones en la provincia de Cádiz, hemos establecido una colonia en las instalaciones del SCAE de la UCO que nos permite realizar exposiciones controladas a contaminantes. Las consecuencias de la exposición crónica a DDE (diclorodifenil-dicloroetileno), un organoclorado derivado del DDT, de alto impacto debido a su estabilidad y elevado grado de bioacumulación, se ha estudiado a nivel de transcritos mediante PCR-

arrays. Esta metodología permite la cuantificación relativa de hasta 94 transcritos mediante qRT-PCR en tiempo real. El tratamiento con DDE generó estrés oxidativo y daños en el DNA y proteínas del hígado de *M. spretus*, induciendo apoptosis y respuesta inmune. El estrés oxidativo se confirmó también cuantificando tioles oxidados en las proteínas y niveles de peroxidación lipídica.

REFERENCIAS

1. Abril, N., et al., (2012) Omic approaches in environmental issues. *J Toxicol Environ Health A*. 74:1001-1019.
2. Lopez-Barea, J. and J.L. Gomez-Ariza (2006) Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics*. 6: 51-62.
3. Abril, N., et al., (2014) Heterologous microarray analysis of transcriptome alterations in *Mus spretus* mice living in an industrial settlement. *Environ Sci Technol*. 48: 2183-2192.
4. Garcia-Sevillano, M.A., et al., (2014) Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator. *J Proteomics* (en prensa).
5. Garcia-Sevillano, M.A., et al., (2012) Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem*. 404: 1967-1981.

GRUPO BIO128

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO EN ALGAS

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Fernández Reyes, Emilio bb1feree@uco.es

Galván Cejudo, Aurora bb1gacea@uco.es

Llamas Azúa, Ángel bb2llaza@uco.es

González Ballester, David.....q62gobad@uco.es

José Javier Higuera Sobrino.....b92hisoj@uco.es

Sanz Luque, Emanuel.....q92salue@uco.es

Chamizo Ampudia, Alejandro.....b42chaaa@uco.es

González Sánchez, Zahira.....q12gosaz@uco.es

Ocaña Calahorro, Francisco J.....bb2occaf@uco.es

Macías Gómez, María Isabel.....bb2magom@uco.es

Onieva Jiménez, Rocío.....q62onjir@uco.es

Jurado Oller, José Luis.....b22juolj@uco.es

Calatrava Porras, M. Victoriab82capom@uco.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Excelencia CeIA3, Universidad de Córdoba.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Señalización para la regulación de la asimilación de nitrato y amonio.
2. Metabolismo del molibdeno y ensamblado de la apo-enzima.
3. Fotoproducción de almidón e hidrógeno.

PROYECTOS

P08-CVI-04157

Título del proyecto: *Chlamydomonas* como Organismo Modelo para el Estudio de los transportadores de Nitrato/Nitrito y la adaptación a las condiciones ambientales

Entidad financiadora: Junta de Andalucía

Duración, desde: 01/01/2009 hasta 31/03/2014

Investigador responsable: Aurora Galván Cejudo

BFU2011-29338

Título del proyecto: Genómica Funcional de la Asimilación de Nitrógeno y producción de energía en *Chlamydomonas*

Entidad financiadora: MEC, Plan Nacional I+D+i

Duración, desde: 28/01/2011 hasta: 31/12/2014

Investigador responsable: Emilio Fernández Reyes

BIO-502

Título del proyecto: Señalización positiva y negativa para la asimilación de nitrato y la producción de hidrógeno en *Chlamydomonas*

Entidad financiadora: Junta de Andalucía

Duración, desde: 30/01/2014 hasta: 29/01/2017

Investigador responsable: Emilio Fernández Reyes

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Chlamydomonas NZF1, a tandem-repeated zinc finger factor involved in nitrate signalling by controlling the regulatory gene NIT2. Higuera JJ, Fernandez E, Galvan A.

Plant Cell Environ. 2014 doi: 10.1111/pce.12305.

Combined intracellular nitrate and NIT2 effects on storage carbohydrate metabolism in *Chlamydomonas*. Remacle C, Eppe G, Coosemans N, Fernandez E, Vigeolas H.

J Exp Bot. 2014, 65:23-33. doi: 10.1093/jxb/ert339.

Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Sanz-Luque E, Ocaña-Calahorro F, Llamas A, Galvan A, Fernandez E.

J Exp Bot. 2013 64:3373-83. doi: 10.1093/jxb/ert175.

A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. Léran S, Varala K, Boyer JC, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B, Gassmann W, Geiger D, Gojon A, Gong JM, Halkier BA, Harris JM, Hedrich R, Limami AM, Rentsch D, Seo M, Tsay YF, Zhang M, Coruzzi G, Lacombe B.

Trends Plant Sci. 2014, 19:5-9. doi: 10.1016/j.tplants.2013.08.008.

Characterization of *Chlamydomonas* 102 and 104 mutants reveals intermolecular complementation in the molybdenum cofactor protein CNX1E. Chamizo-Ampudia A, Galvan A, Fernandez E, Llamas A. Protist. 2013; 164:116-28. doi: 10.1016/j.protis.2012.04.003.

Ketocarotenoid biosynthesis in transgenic microalgae expressing a foreign β -C-4-carotene oxygenase gene. Vila M, Galván A, Fernández E, León R. Methods Mol Biol. 2012; 892:283-95. doi: 10.1007/978-1-61779-879-5_17.

The *Chlamydomonas reinhardtii* molybdenum cofactor enzyme CrARC has a Zn-dependent activity and protein partners similar to those of its human homologue. Chamizo-Ampudia A, Galvan A, Fernandez E, Llamas A. Eukaryot Cell. 2011, 10:1270-1282

Molybdenum metabolism in the alga *Chlamydomonas* stands at the crossroad of those in *Arabidopsis* and humans. Llamas A, Tejada-Jiménez M, Fernández E, Galván A. Metallomics 2011, 3: 578-590

Reverse Genetics in *Chlamydomonas*: A Moderate Throughput Platform for Isolating Insertional Mutants. Gonzalez-Ballester D, Pootakham W, Mus F, Yang W, Catalanotti C, Magneschi L, Higuera JJ, de Montaigu A, Prior M, Galván A, Fernandez E, Grossman AR. Plant Methods. 2011, 7:24.

Algae and humans share a molybdate transporter. Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, 108(16):6420-6425

A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expresión of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. de Montaigu A, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E. Plant Cell 2010, 22:1532-1548

Transcriptional regulation of CDP1 and CYG56 is required for proper NH_4^+ sensing in *Chlamydomonas*. de Montaigu A, Sanz-Luque E, Macias MI, Galvan A, Fernandez E. (2010)
J Exp Bot. 2010, 62:1425-1437

Homeostasis of the micronutrients Ni, Mo and Cl with specific biochemical functions. Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E, Llamas A (2009)
Curr Opin Plant Biol 2009, 12:358-863

The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. Castaings L, Camargo A, Pocholle D, Gaudon V, Texier Y, Boutet-Mercey S, Taconnat L, Renou JP, Daniel-Vedele F, Fernandez E, Meyer C, Krapp A.
Plant J. 2009, 57:426-435

PONENCIA

GENÓMICA FUNCIONAL DE LA ASIMILACION DE NITRÓGENO Y PRODUCCION DE ENERGÍA EN *CHLAMYDOMONAS*

Nuestro grupo utiliza el alga fotosintética eucariota y haploide *Chlamydomonas reinhardtii* como sistema modelo para el estudio de cuestiones fundamentales del conocimiento no bien conocidas en organismos superiores más complejos como plantas o animales. Para ello utiliza estrategias de genómica funcional y el aislamiento y caracterización de mutantes afectados en el (los) gen(es) de interés.

Actualmente enfocamos la atención sobre los siguientes aspectos:

1. Definir y caracterizar funciones de proteínas/genes implicados en la señalización positiva y negativa de la asimilación de nitrato.

El óxido nítrico (NO) tiene un papel regulador importante tanto transcripcional como post-transcripcional de la asimilación de nitrato y amonio, que hemos caracterizado. Hemos identificado cuatro hemoglobinas truncadas cuya expresión se regula por nitrógeno. Una de ellas, la THB1, tiene actividad dioxigenasa y participa directamente en la regulación de los niveles celulares de NO. Asimismo, hemos identificado NZF1 como un factor de dedo de zinc repetido en tandem que regula la poliadenilación de NIT2, el factor transcripcional crítico

para la asimilación de nitrato en el alga. Finalmente, estamos caracterizando el único sistema NRT1 de *Chlamydomonas*, que tiene un papel fundamental en la señalización por nitrato.

2. Metabolismo del molibdeno y ensamblado de la apo-enzima.

El molibdeno es esencial para la construcción del sitio activo de reducción de nitrato en la enzima nitrato reductasa, donde participa en la forma activa de cofactor de molibdopterina (MoCo). La ruta de biosíntesis de MoCo es universal. Hemos identificado MOT1 como un transportador de molibdato de alta afinidad que está presente en los diversos organismos a excepción de animales. También hemos identificado el transportador de molibdato MOT2 presente en organismos eucarióticos (como el hombre) pero ausente en procariotas. Recientemente, hemos identificado el sistema ARC de reducción de hidroxiderivados de bases nitrogenadas, que resultan tóxicos en diversos organismos procariotas y eucariotas. Se trata de una molibdoenzima que permite la destoxificación de estos compuestos. El sistema ARC del alga *Chlamydomonas* es similar al de humanos e implica citocromo b5 y citocromo b5 reductasa. La proteína CrARC dimeriza e interacciona con el cit b5 con una estequiometría 1:1.

3. Fotoproducción de almidón e hidrógeno.

La enzima más importante para la producción de hidrógeno es una [Fe]-hidrogenasa activa. Las condiciones más comunes para conseguir la producción de hidrógeno en *Chlamydomonas* son en primer lugar la eliminación de la fuente S, donde debido al desbalance inducido entre la fotosíntesis y la respiración se induce la expresión de la hidrogenasa, y en segundo lugar en anaerobiosis. Hemos identificado estirpes mutantes de *Chlamydomonas* que poseen una capacidad aumentada de almacenar almidón. Estos mutantes se han analizado para la fotoproducción de hidrógeno. Hemos conseguido mejorar las condiciones de fotoproducción de hidrógeno en el alga en más de sesenta veces utilizando cultivos con acetato para producir una respiración muy activa y sin pretratamientos o preadaptación de las células.

GRUPO AGR231

GENÓMICA Y MEJORA ANIMAL

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Garrido Pavón, Juan José ge1gapaj@uco.es

| | |
|-----------------------------|---------------------------|
| Moreno López, Angela | ge1moloa@uco.es |
| Morera Sanz, Luiz | gm1mosal@uco.es |
| Lucena Martínez, Concepción | bc1lumac@uco.es |
| Jiménez Marín, Angeles | gm2jimaa@uco.es |
| <u>Zaldívar López, Sara</u> | v12zalos@uco.es |
| Aguilar Jurado, Carmen | toucherleciel@hotmail.com |
| Domínguez Martínez, Miguel | madm02@hotmail.com |
| Juber Herrera Uribe | jurrera18@hotmail.com |

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Genética. Departamento de Biología Celular.
Universidad de Córdoba.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Genómica funcional de la interacción patógeno-hospedador en especies animales de interés agroalimentario. El objetivo general es la identificación del catálogo completo de eventos moleculares que ocurren simultáneamente como consecuencia de la expresión del genoma y proteoma del patógeno y el hospedador durante la infección por microbios patógenos. El fin último es el desarrollo de mejores métodos de tratamiento y control de la enfermedad animal, contribuyendo a la identificación de dianas terapéuticas que permitan desarrollar nuevos y eficientes protocolos de prevención frente a los principales patógenos de transmisión alimentaria.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Martins RP, Aguilar-Jurado C, JE Graham, Carvajal A, Bautista R, Claros MG, Garrido JJ. 2013. Pyroptosis and adaptive immunity mechanisms are promptly engendered in mesenteric lymph-nodes during pig infections with Salmonella enterica serovar Typhimurium. Veterinary Research 44:120.

Martins RP, Lorenzi V, Arce C, Lucena C, Carvajal A, Garrido JJ. 2013. Innate and adaptive immune mechanisms are effectively induced in ileal Peyer's patches of *Salmonella typhimurium* infected pigs. *Dev Comp Immunol.* 41(1):100-104.

Martins RP, Collado-Romero M, Arce C, Lucena C, Carvajal A, Garrido JJ. 2013. Exploring the immune response of porcine mesenteric lymph nodes to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: an analysis of transcriptional changes, morphological alterations and pathogen burden. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 36(2):149-160.

Collado-Romero M, Martins RP, Arce C, Moreno Á, Lucena C, Carvajal A, Garrido JJ. 2012. An in vivo proteomic study of the interaction between *Salmonella Typhimurium* and porcine ileum mucosa. *Journal of Proteomics* 75(7): 2015-2026.

Collado-Romero M., Arce C., Ramírez-Boo M., Carvajal A., Garrido JJ. 2010. Quantitative analysis of the immune response upon *Salmonella typhimurium* infection along the porcine intestinal gut. *Veterinary Research* 41:23.

PONENCIA

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN SALMONELLA-HOSPEDADOR MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA (RNAseq). CARACTERIZACIÓN DEL INTERACTOMA EN UN SISTEMA CELULAR MODELO: EL NEUTRÓFILO.

RESUMEN

La salmonelosis es una enfermedad que, además de tener graves consecuencias para la salud humana, provoca grandes pérdidas económicas en ganadería. Para poder desarrollar estrategias preventivas ante dicha enfermedad, es necesario entender la naturaleza de la infección, empezando por las "armas" que la bacteria usa para invadir y replicarse en los tejidos y sus consecuencias en el sistema inmune del hospedador. Cuando *Salmonella typhimurium* penetra el epitelio intestinal, se produce un reclutamiento de fagocitos (entre ellos neutrófilos) a los tejidos, estableciendo así la primera barrera inmune ante la infección. Con este trabajo hemos investigado el interactoma (transcriptoma de la interacción patógeno-hospedador) mediante Dual RNAseq, observando que muchos de los genes sobreexpresados por *Salmonella typhimurium* durante la infección

afectan procesos de fosforilación, necesarios en rutas de señalización del sistema inmune del hospedador. Asimismo, los genes pertenecientes a dichas rutas se encuentran diferencialmente expresados.

INTRODUCCIÓN

Salmonella spp. es una bacteria de transmisión alimentaria (principalmente por consumo de carne de pollo y cerdo) que provoca alta morbilidad y mortalidad en personas. La salmonelosis es considerada la segunda zoonosis más importante a nivel mundial, afectando a más de 90 millones de personas al año [1], de las cuales unas 100.000 están en la Unión Europea [2]. Tras el exitoso establecimiento de sistemas y programas de control en ganadería avícola, el cerdo se ha convertido en la principal fuente de infección en la Unión Europea (56.8% de los casos).

La Salmonelosis porcina no tifoidea causa infecciones intestinales que además de su importancia clínica, producen pérdidas económicas a los productores y ganaderos y constituyen un riesgo para la seguridad alimentaria; además, el cerdo también actúa como reservorio de la enfermedad, siendo diseminador de ésta por heces. Sorprendentemente, la respuesta del hospedador a la infección bacteriana a nivel tisular está poco estudiada y, sin duda, su conocimiento ayudaría a explicar el origen de la enfermedad y cómo puede tratarse o prevenirse. Tras su entrada por vía digestiva, *Salmonella* penetra el epitelio intestinal mediante diferentes vías, y pronto se encuentra con la primera línea de defensa en la respuesta inmune innata: los fagocitos, principalmente macrófagos y neutrófilos [3]. En esta etapa de la infección, el objetivo es eliminar al patógeno mediante fagocitosis para controlar la enfermedad. Previos estudios realizados por nuestro grupo han demostrado que la infección intestinal por *Salmonella typhimurium* provoca un reclutamiento de fagocitos (entre ellos neutrófilos) a los tejidos, que permite limitar el alcance de la infección [4].

En los últimos años, los avances en el desarrollo de nuevas tecnologías genómicas han permitido realizar estudios transcriptómicos a nivel global (genoma completo), bien usando sondas representativas de los genes (micromatrices) [5], o bien realizando secuenciación masiva de

transcritos tanto del hospedador como del patógeno (dual RNA-seq) [6].

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son el estudio transcriptómico de los genes implicados en la respuesta inmune del hospedador (cerdo) ante el patógeno (*Salmonella*), y el estudio transcriptómico del patógeno frente al hospedador (mecanismos de virulencia), a través de la secuenciación del transcriptoma de ambos organismos (“dual RNAseq”)

RESULTADOS

ARN procedente de muestras de neutrófilos controles e infectados con *Salmonella typhimurium* se envió a secuenciar mediante RNAseq (Illumina) a la plataforma de Genómica Funcional del Instituto de Investigación Biomédica (IRB) de Barcelona. El análisis estadístico se realizó en la Plataforma Andaluza de Bioinformática (PAB) de la Universidad de Málaga.

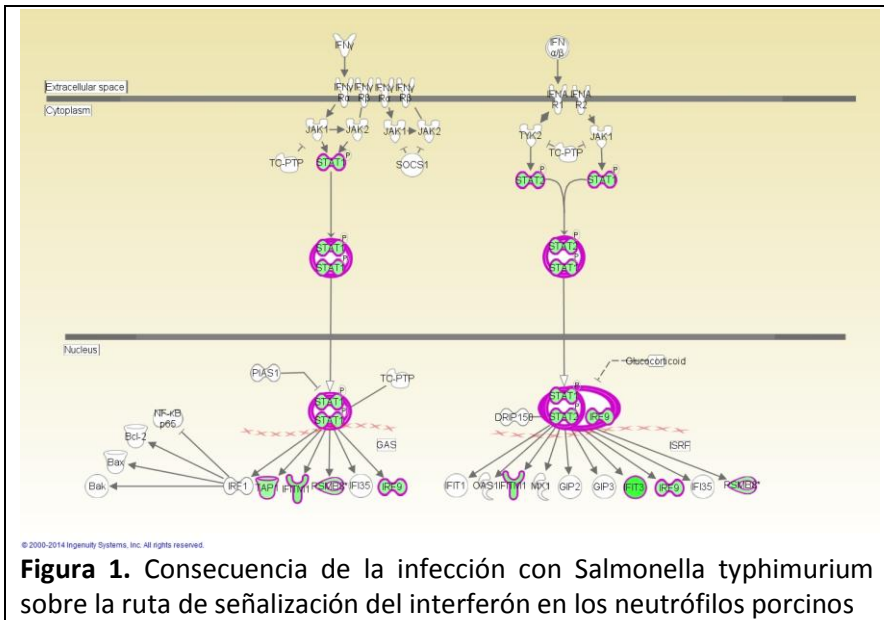
Las librerías de RNAseq fueron creadas de manera que además de eucariotas, se pudieran secuenciar también transcritos de procariotas. Se obtuvieron una media de 70 millones de lecturas por muestra, de las cuales alrededor del 25% pertenecían a *Salmonella* en las infectadas. Se realizó un control de calidad en las muestras crudas, limpiándolas de adaptadores y secuencias contaminantes, y descartando las que no pasaban un mínimo de calidad (phred score > 20).

Las lecturas limpias fueron mapeadas frente al transcriptoma del cerdo (*Sscrofa10.2*), lográndose un mapeo del 74% sobre la referencia. El cálculo de expresión diferencial se realizó mediante 4 algoritmos/herramientas diferentes, paramétricas y no paramétricas. Una vez obtenidos los resultados de cada análisis (p-value corregido por FDR < 0.05), se identificaron mediante un análisis de Venn 387 genes (incluyendo 4 ncRNA) diferencialmente expresados que son comunes a los 4 análisis. De estos genes, 103 están reprimidos, mientras que 284 se encuentran sobreexpresados.

Alrededor de un 25% de las lecturas de las muestras infectadas mapearon al genoma de *Salmonella typhimurium*. Como de este estudio tenemos muestras sólo de los neutrófilos infectados (es decir,

no tenemos referencia para poder comparar), se usó el transcriptoma de *Salmonella typhimurium* LT2 como referencia (disponible públicamente en la base de datos del European Nucleotide Archive). De un total de 207 genes diferencialmente expresados (p-value corregida < 0.05), la mayoría lo hacen en sobreexpresión (n=117).

El análisis de los genes diferencialmente expresados, así como de las funciones biológicas y rutas canónicas en las que están implicados, indican que el principal mecanismo de infección de la *Salmonella* es sobreexpresando genes que afectan la fosforilación en el hospedador. De esta manera, la bacteria provoca una disregulación de rutas de señalización del sistema inmune innato (mediados por kinasas, Figura 1). Además, y con el objetivo de alargar su supervivencia, *Salmonella* también inhibe mecanismos de apoptosis del neutrófilo



CONCLUSIÓN

El objetivo de nuestro grupo de investigación es establecer modelos para el estudio de la interacción patógeno-hospedador (interactoma). En el presente trabajo ha sido estudiado un modelo de respuesta de neutrófilos frente a *Salmonella* mediante “dual RNAseq”. El estudio transcriptómico llevado a cabo nos ha permitido caracterizar con

mayor profundidad los mecanismos de infección del patógeno, así como su efecto modulador en la respuesta de la célula hospedadora.

REFERENCIAS

1. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM, International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness S: **The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis**. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2010, **50**(6):882-889.
2. Eurosurveillance editorial t: **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 has been published**. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2013, **18**(15):20449.
3. Tam MA, Rydstrom A, Sundquist M, Wick MJ: **Early cellular responses to Salmonella infection: dendritic cells, monocytes, and more**. *Immunological reviews* 2008, **225**:140-162.
4. Martins RP, Collado-Romero M, Arce C, Lucena C, Carvajal A, Garrido JJ: **Exploring the immune response of porcine mesenteric lymph nodes to Salmonella enterica serovar Typhimurium: an analysis of transcriptional changes, morphological alterations and pathogen burden**. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 2013, **36**(2):149-160.
5. Sanz-Santos G, Jimenez-Marin A, Bautista R, Fernandez N, Claros GM, Garrido JJ: **Gene expression pattern in swine neutrophils after lipopolysaccharide exposure: a time course comparison**. *BMC proceedings* 2011, **5 Suppl 4**:S11.
6. Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J: **Dual RNA-seq of pathogen and host**. *Nature reviews Microbiology* 2012, **10**(9):618-630.

GRUPO BIO272

GENÉTICA Y TRASTORNOS DEL COMPORTAMIENTO

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Ruiz Rubio, Manuelge1rurum@uco.es

Osuna Luque, Jaimejosuna1412@gmail.com

Cascales Picó, Nurianuri_90s@hotmail.com

Gámez Del Estal, M^a Del Marmargamez18@hotmail.com

Alejandro Durán, Encarnage1aldue@uco.es

Martín Borreguero, Pilarpmartin.psicologa@gmail.com

Guijarro Granados, Teresa ...mariat.guijarro.sspa@juntadeandalucia.es

Romero Balsera, M^a Auxiliadoramauroba@terra.es

Sánchez Raya, M^a Aracelied1saram@uco.es

Burgos Marín, Rafaelrafadbm@gmail.com

Sánchez Vázquez, Vicenteusmi.hrs.sspa@juntadeandalucia.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIONES

Departamento de Genética Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba. Unidad de Salud Mental Infanto-Juvenil, Hospital Reina Sofía de Córdoba. Departamento de Psicología, Facultad de Ciencias de la Educación, Universidad de Córdoba. Instituto Maimonides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). 14071 Córdoba.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Genética del autismo: estudio de endo-fenotipos en pacientes y familiares y relación con genes específicos.
2. *Caenorhabditis elegans* como modelo en el estudio de la función sináptica neuronal implicada en autismo.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Gámez-del-Estal MM., Contreras I, Prieto-Pérez R. and Ruiz-Rubio M (2014). Epigenetic effect of testosterone in the behavior of *C. elegans*. A clue to explain androgen-dependent autistic traits? **Front. Cell. Neurosci.** 8:69. doi: 10.3389/fncel.2014.00069

Izquierdo P.G., Calahorro, F. and M. Ruiz-Rubio, M (2013) Neuroligin modulates the locomotory dopaminergic and serotonergic neuronal pathways of *C. elegans*. **Neurogenetics** 14:233-242

Calahorro, F; Ruiz-Rubio, M (2013) Human alpha- and beta-NRXN1 isoforms rescue behavioral impairments of *C. elegans* neurexin-deficient mutants. **Genes, Brain & Behavior**. 12:453-464.

Calahorro, F; Ruiz-Rubio, M (2012) Functional phenotypic rescue of neuroligin-deficient mutant of *C. elegans* by human and rat NLGN1 genes. **PLoS One**; 7(6): e39277.

Calahorro, F; Ruiz-Rubio, M (2011) *Caenorhabditis elegans* as an experimental tool for the study of complex neurological diseases: Parkinson's diseases, Alzheimer's diseases and autism spectrum disorder. **Invert. Neurosci.** 11, 73-83.

Suárez-Gómez, M; Alejandre-Durán, E; Ruiz-Rubio, M (2011) MicroRNAs in bipolar disorder: diagnostic and therapeutic applications. **Rev. Neurol.** 53, 91-98.

Calahorro F., E. Alejandre and M. Ruiz-Rubio (2009) Osmotic Avoidance in *Caenorhabditis elegans*: Synaptic Function of Two Genes, Orthologue of Human NRXN1 and NLGN1, as Candidates for Autism. **J. Vis. Exp.** (34), e1616, DOI : 10.3791/1616

Calahorro F., E. Alejandre, N. Anaya, T. Guijarro, Y. Sanz, A. Romero, P. Tienda, R. Burgos, E. Gay, V. Sánchez and M. Ruiz-Rubio (2009) A preliminary study of gene polymorphisms involved in the neurotransmitters metabolism of a homogeneous Spanish autistic group. **Research in Autism Spectrum Disorders** 3, 438-443.

POENCIA

CAENORHABDITIS ELEGANS, UN GUSANO PARA ESTUDIAR TRASTORNOS DEL COMPORTAMIENTO EN HUMANOS. APLICACIONES AL ESTUDIO DE LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA

RESUMEN

En los últimos años se han producido avances significativos en el conocimiento de las causas que pueden originar trastornos del espectro autista (TEA). La alteración de las conexiones neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso podría explicar el origen de estos trastornos. Existen varias estrategias para tratar de determinar las causas que originan los TEA. En los estudios genéticos con pacientes es esencial establecer subgrupos en base a características fenotípicas bien definidas o sub-fenotipos y antecedentes familiares. Posteriormente estos se estudian con diferentes herramientas de análisis genéticos y técnicas genómicas. Estas estrategias se pueden combinar con otras basadas en utilizar cultivos celulares o/y organismos modelos para profundizar en los mecanismos moleculares implicados. El animal modelo más utilizado es el ratón. En nuestro laboratorio hemos sido pioneros en utilizar el nematodo *Caenorhabditis elegans* como sistema experimental para analizar *in vivo* mecanismos neurobiológicos básicos implicados en TEA. La ventaja de este sistema es su simplicidad, ya que el nematodo adulto posee solo 302 neuronas perfectamente cartografiadas de un total de 959 células somáticas. Además, más del 80%, de las proteínas de *C. elegans* son homólogas a proteínas humanas. En este sentido nuestro grupo ha podido demostrar que determinadas proteínas humanas, neuroliquina-1, alpha-neurexina-1 y beta-neurexina-1, que intervienen en la sinapsis neuronal y que han sido implicadas en casos de TEA, son funcionales en el nematodo. Además, alteraciones del comportamiento relacionadas con la dopamina y la serotonina en mutantes deficientes en neuroliquina de *C. elegans*, fueron recuperadas con fármacos ampliamente usados para el tratamiento de trastornos del comportamiento humano: metilfenidato (un inhibidor de la recaptación de la dopamina) y fluoxetina/Prozac (inhibidor de la recaptación de la serotonina). Por otra parte hemos podido demostrar que por medio de mecanismos epigenéticos la testosterona, hormona que ha sido propuesta como posible causa de originar características fenotípicas autísticas, es capaz de inducir cambios en el sistema

nervioso en el nematodo. Otros fármacos como los antipsicóticos risperidona y aripirazol también están siendo analizados en nuestro grupo. Por lo tanto, *C. elegans*, aunque muy apartado a nivel evolutivo de los mamíferos, permite llevar a cabo experimentos para esclarecer mecanismos neurobiológicos con estrategias que no son posibles con otros modelos animales.

INTRODUCCIÓN

El concepto de autismo ha evolucionado significativamente desde su primera definición, hace ya unos 70 años {Kanner, 1968}. Hoy día sigue siendo motivo de un profundo debate y diferentes interpretaciones. Actualmente el autismo se define como un trastorno que se caracteriza por dos tipos de síntomas a) déficits persistentes de comunicación e interacción social, y b) patrones restringidos y repetitivos de comportamiento, actividades o intereses. Estas características son las recogidas en la última versión del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-5 {DSM-5, 2013}. En esta nueva versión aparecen modificaciones significativas respecto a la versión anterior DSM-IV {DSM-IV-TR, 2000}. En el DSM-IV se definían cinco categorías diagnósticas dentro de lo que se denominaba Trastornos Generalizados del Desarrollo: a) Trastorno Autista, b) Trastorno de Rett, c) Trastorno Desintegrativo Infantil, d) Trastorno de Asperger y e) Trastorno Generalizado del Desarrollo no Especificado. En el nuevo manual DSM-5, todas las categorías se engloban en una sola, denominada Trastornos del Espectro Autista (TEA), a excepción del síndrome de Rett que se considera una categoría independiente porque tiene una etiología genética conocida (mutaciones en el gen MECP2). Pero las personas con TEA no sólo presentan las dos características diagnósticas recogidas en el DSM-5. Pueden aparecer asociados otros síntomas no necesariamente relacionados entre sí, que no son los mismos en todos los casos, ni se dan con la misma intensidad y que pueden solapar con otros trastornos del desarrollo y del comportamiento. Existe además mucha variabilidad en el cociente intelectual y en la capacidad de articular el lenguaje. Es decir, los pacientes diagnosticados con TEA forman un grupo muy heterogéneo que presentan características clínicas muy diversas. TEA o “autismo” no es un trastorno único en sí, sino un continuo que varía mucho en grado y forma. Una persona con TEA se encuentra en algún lugar de un amplio espectro que va del “bajo” a “alto” funcionamiento, en base a

un coeficiente intelectual de menos o más de 70-80, respectivamente; y a una capacidad de comunicación que puede oscilar entre la ausencia del habla, a un uso del lenguaje bien articulado.

OBJETIVOS

La utilización de *C. elegans* como organismo modelo para crear un escenario experimental que facilite el estudio genético de componentes sinápticos implicados en TEA. Extrapolar los resultados obtenidos a humanos para poder explicar mecanismos neurobiológicos que intervienen en TEA y otros trastornos del desarrollo.

RESULTADOS

En *C. elegans* los genes *nrx-1* y *nlg-1* son homólogos a los genes humanos que codifican alfa- y beta-neurexinas, y neuroliginas respectivamente. Los dominios funcionales en estas proteínas están conservados en humanos y el nematodo. El porcentaje de identidad entre alfa- y beta-neurexinas ó neuroliginas entre ambas especies varía entre el 22 y el 32%.

Hemos podido demostrar que neuroliginas y neurexinas humanas son funcionales en el nematodo {Calahorro, 2012; Calahorro, 2013}. Este hecho demuestra que aunque *C. elegans* esté muy apartado a nivel evolutivo de los mamíferos, es un buen modelo para llevar a cabo experimentos que no son posibles con otros modelos animales, y que ayuden a esclarecer mecanismos a nivel molecular que puedan estar implicados en TEA. La Figura 1 muestra un ejemplo de los resultados en los se puede observar como un mutante deficiente en el gen *nrx-1* recupera la capacidad de exploración en animales transgénicos que expresan isoformas de alfa- o beta-neurexina humanas.

Otras observaciones relacionadas con estas proteínas sinápticas se refieren al hecho de que los mutantes deficientes en neuroligina y neurexinas tienen afectados comportamientos que dependen de rutas dopaminérgicas y serotoninérgicas. Estas alteraciones fueron recuperadas con fármacos ampliamente usados para el tratamiento de trastornos del comportamiento humano: metilfenidato (un inhibidor de la recaptación de la dopamina) y fluoxetina/Prozac (inhibidor de la recaptación de la serotonina) {Izquierdo, 2013}. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de los resultados con metilfenidato. En este caso la BSR (basal slowing response), relacionada con la dopamina, es

deficiente en un mutante *nlg-1*, pero se recupera en presencia de metilfenidato.

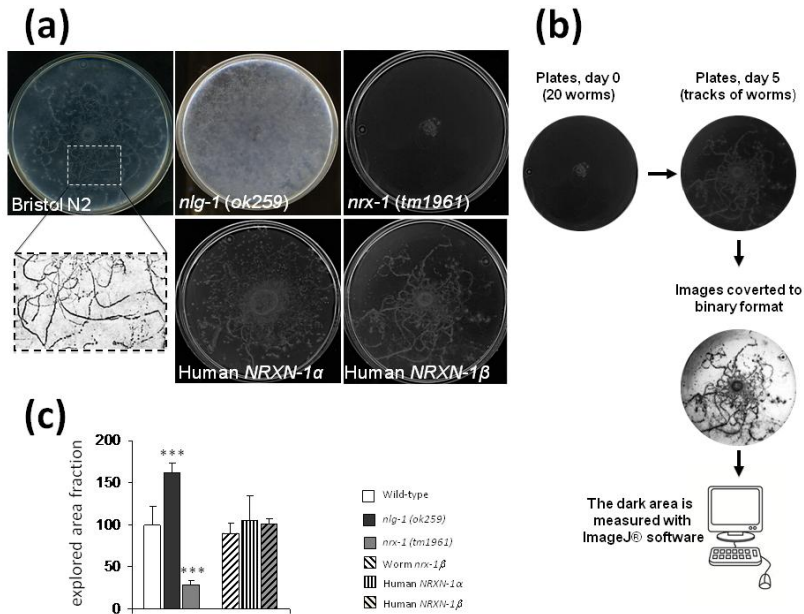


Figura 1. Rescate de la capacidad de exploración en mutantes *nrx-1* de *C. elegans* mediante microinyección de cDNAs correspondientes a los genes *alfa- and beta-NRXN-1* humanos. (a) Ensayos que muestran que los mutantes *nrx-1* pierden la capacidad de exploración en un medio sin comida. El fenotipo tipo silvestre se recupera cuando en dichos mutantes se expresan neurexinas humanas. (b) y (c) Muestra los resultados de la cuantificación del área explorada por los nematodos. En estos experimentos se colocaban 20 gusanos en el centro de una placa de Petri sin comida y lo que se mide en la huella que dejan al cabo de varios días {Calahorro, 2013}.

Otros resultados destacables se refieren al efecto de la testosterona {Gamez-Del-Estal, 2014}. La exposición de elevadas cantidades de esta hormona ha sido relacionada con el desarrollo de rasgos autistas durante el desarrollo prenatal {James, 2014}. La testosterona es capaz de afectar al comportamiento del nematodo y además parece actuar mediante mecanismos epigenéticos. Estos cambios epigenéticos se mantienen hasta la cuarta generación. Este resultado podría esclarecer algunos de los mecanismos moleculares por los que actuaría la hormona {Gamez-Del-Estal, 2014}. En humanos también hay indicios

de que la acción de la testosterona puede estar relacionada con mecanismos epigenéticos {Baum, 2009}.

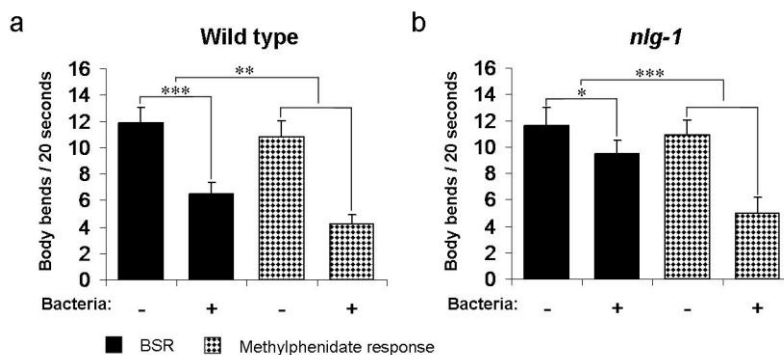


Figure 2. Efecto del metilfenidato en la respuesta dopaminérgica “BSR” en la estirpe silvestre N2 y deficiente en neuroliquina (*nlg-1*). (a) Como consecuencia de que el metilfenidato inhibe el transportador de la serotonina se produce un incremento de la dopamina en el espacio sináptico y un incremento en la BSR. (b) El mutante *nlg-1* es deficiente en dicha respuesta BSR, dependiente de la dopamina, pero en presencia de metilfenidato se observa una respuesta BSR similar al de la estirpe silvestre {Izquierdo, 2013}.

Finalmente, comentar que aunque las causas exactas de los trastornos del espectro autista (TEA) siguen siendo desconocidas, la atención médica utiliza terapias psicológicas y tratamientos farmacológicos para paliar determinados síntomas que pueden estar asociados a TEA. La irritabilidad-agresividad es uno de ellos. El aripiprazol y la risperidona, ambos clasificados como fármacos antipsicóticos atípicos, son los únicos fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para tratar dichos síntomas {McPheeters, 2011}. Estamos utilizando *C. elegans* como modelo para analizar comparativamente los mecanismos de acción de la risperidona y el aripiprazol. Los resultados obtenidos permitirían determinar el mecanismo de acción y genes que pudieran estar implicados en la respuesta a estos fármacos en humanos. El análisis de la secuencia de dichos genes en los pacientes permitiría establecer una correlación con las respuestas específicas observadas en los ensayos clínicos.

El Trastorno del Espectro Autista no es un único trastorno, sino muchos trastornos con etiologías diferentes que coinciden en determinados síntomas. Los resultados que están surgiendo de la

investigación están contribuyendo a determinar las causas de algunas de las formas de autismo y ayudan a esclarecer los mecanismos por los cuales se produce el trastorno. Conocer las causas y los mecanismos a nivel molecular que subyacen en estos trastornos es fundamental para poder encontrar y aplicar terapias adecuadas. En algunos casos de TEA es posible paliar algunos de los síntomas mediante diferentes terapias, entre las que se incluyen psicoterapéuticas y farmacológicas. No hay que descartar que algunos casos de TEA puedan tener cura.

REFERENCIAS

1. Kanner, L., *Autistic disturbances of affective contact*. Acta Paedopsychiatr, 1968. **35**(4): p. 100-36.
2. DSM-5, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. <http://www.psychiatry.org/mental-health/key-topics/autism>, 2013.
3. DSM-IV-TR, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. <http://www.psychiatry.org/practice/dsm/dsm-iv-tr>, 2000.
4. Calahorro, F. and M. Ruiz-Rubio, *Functional phenotypic rescue of Caenorhabditis elegans neuroligin-deficient mutants by the human and rat NLGN1 genes*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39277.
5. Calahorro, F. and M. Ruiz-Rubio, *Human alpha- and beta-NRXN1 isoforms rescue behavioral impairments of Caenorhabditis elegans neuroligin-deficient mutants*. Genes Brain Behav, 2013. **12**(4): p. 453-64.
6. Izquierdo, P.G., F. Calahorro, and M. Ruiz-Rubio, *Neuroligin modulates the locomotory dopaminergic and serotonergic neuronal pathways of C. elegans*. Neurogenetics, 2013. **14**(3-4): p. 233-42.
7. Gamez-Del-Estal, M.M., et al., *Epigenetic effect of testosterone in the behavior of C. elegans. A clue to explain androgen-dependent autistic traits?* Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 69.
8. James, W.H., *An update on the hypothesis that one cause of autism is high intrauterine levels of testosterone of maternal origin*. J Theor Biol, 2014. **355C**: p. 33-39.
9. Baum, M.J., *New evidence that an epigenetic mechanism mediates testosterone-dependent brain masculinization*. Endocrinology, 2009. **150**(9): p. 3980-2.

10. McPheeters, M.L., et al., *A systematic review of medical treatments for children with autism spectrum disorders*. *Pediatrics*, 2011. **127**(5): p. e1312-21.

Sesión Cuarta

GRUPO CTS985

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN REGENERACIÓN MUSCULAR

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Peña Amaro, José ⁽¹⁾ cm1peamj@uco.es

Agüera Vega, Antonio J ⁽¹⁾

Benito Ysamat, Alberto ⁽²⁾

Cambrón Carmona, Angela ⁽¹⁾

Casado Ruiz, Julia ⁽¹⁾

García Ortega, M^a José ⁽²⁾

Giovanetti González, Rubén ⁽¹⁾

Heredia Torres, Ángela ⁽³⁾

Jimena Medina, Ignacio María ⁽¹⁾

Leiva Cepas, Fernando ^{(1) (4)} fleivacepas@gmail.com

López Martos, Ricardo ⁽⁵⁾

Mayordomo Riera, Fernando ^{(3) (6)}

Montero Pérez-Barquero, Rafael ⁽²⁾

Muñoz Cabello, Laura ⁽³⁾

Peña Toledo, M^a Angeles ⁽⁷⁾

Ruz Caracuel, Ignacio ⁽¹⁾

Tallón de Lara, Carmen ⁽¹⁾

Zurita Lozano, Soledad ⁽¹⁾

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

- (1) Departamento de Ciencias Morfológicas. Área de Histología. Facultad de Medicina y Enfermería. Universidad de Córdoba.
- (2) U.G.C. de Rehabilitación y Medicina Física Hospital Universitario Reina Sofía. Servicio Andaluz de Salud. Córdoba
- (3) U.G.C. de Radiodiagnóstico. Hospital Universitario Reina Sofía. Servicio Andaluz de Salud. Córdoba.
- (4) Unidad Docente de Medicina Familiar y Comunitaria de Córdoba (Zona I). Servicio Andaluz de Salud. Córdoba.

- (5) U.G.C. de Cirugía Maxilofacial. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Servicio Andaluz de Salud. Sevilla.
- (6) Departamento de Ciencias Sociosanitarias, Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina y Enfermería. Universidad de Córdoba
- (7) U.G.C. de Neurología. Coordinadora de Ensayos Clínicos. Hospital Universitario Reina Sofía. Servicio Andaluz de Salud. Córdoba

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. HISTOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN MUSCULAR: Estimulación de la miogénesis por extractos musculares. Participación de los pericitos en la regeneración muscular. Perfil histoquímico e inmunohistoquímico de la célula satélite en músculo postmortem. Control ecográfico del proceso de regeneración muscular.
2. INGENIERÍA TISULAR EN MÚSCULO ESQUELÉTICO: Implantación de tejido adiposo en músculo esquelético. Reconstrucción muscular con matrices decelularizadas. Elaboración por ingeniería tisular de constructos para la neoformación muscular.
3. MIOPATOLOGÍA EXPERIMENTAL: Histología muscular en modelos animales de esclerosis múltiple. Miotoxicidad del ácido 3-nitropropiónico. Caracterización de tipos de fibras musculares tras la administración de anestésicos locales.
4. PATOLOGÍA MUSCULAR HUMANA: Estudio de biopsias musculares en pacientes trasplantados. Regeneración en músculo esquelético humano.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Jimena I, Tasset I, López-Martos R, Rubio AJ, Luque E, Montilla P, Peña J, Túnez I (2009) Effects of magnetic stimulation on oxidative stress and skeletal muscle regeneration induced by mepivacaine in rat. *Medicinal Chemistry*, 5: 44-49.

Rodríguez-Bies E, Santa-Cruz S, Fontán A, Peña J, Berral FJ, Carrión AM, Navas P, López-Lluch G (2010) Muscle physiology changes induced by

every other day feeding and endurance exercise in mice: effects on physical performance. *PLoS ONE*, 5: e13900-1 - e13900-12.

Jimena I, Leiva-Cepas F, Rubio AJ, Luque E, Villalba R, Peña J (2011) Degree of histological recovery in skeletal muscle after reconstruction by adipose tissue implantation. *Histology & Histopathology*, 26: 430-431.

Jiménez-Díaz F, Jimena I, Luque E, Mendizábal S, Bouffard A, Jiménez-Reina L, Peña J (2012) Experimental muscle injury: correlation between ultrasound and histological findings. *Muscle & Nerve*, 45: 705–712

Ruz-Caracuel I, Leiva-Cepas F, Luque E, Jimena I, Peña J (2013) Relaciones topográficas entre capilares, fibras musculares y células satélite durante la regeneración. *Actualidad Médica*, 98: 27-32.

PONENCIA

ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN MEDICINA REPARATIVA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa se centra en el desarrollo de terapias destinadas a sustituir, reparar o promover la regeneración del tejido lesionado o enfermo. En el caso del músculo esquelético podemos diferenciar, al menos desde un punto de vista experimental, tres estrategias básicas (1,2): (i) el implante o trasplante celular, (ii) la creación de órganos artificiales por medio de ingeniería tisular y (iii) la estimulación de la propia y natural capacidad regenerativa. En todas ellas, su fundamento radica en el propio proceso regenerativo que, en el caso del músculo esquelético es muy bien conocido que posee una gran potencia regenerativa para hacer frente a la lesión.

La regeneración muscular es un proceso complejo en el cual intervienen, y se superponen de forma coordinada, diferentes tipos celulares y componentes de la matriz extracelular que cambian sus genotipos, maduran y secretan y son afectados por diferentes

componentes humorales, creando un microambiente tisular complejo pero perfectamente programado para la recuperación estructural y funcional del músculo lesionado (3). Son muchos los modelos experimentales que se han diseñado y ensayando en este campo, pero son de especial interés aquellos en los que la capacidad regenerativa puede verse dificultada o impedida. En este sentido si bien en condiciones normales la propia capacidad regenerativa del músculo es suficiente para hacer frente a la lesión, existen determinadas situaciones que conllevan importantes pérdidas de volumen muscular –traumatismo grave por accidentes de tráfico en nuestro medio, extirpación tumoral masiva o heridas de guerra- donde esa pérdida de volumen es sustituida por tejido conectivo que conduce a una fibrosis con las implicaciones funcionales que ello conlleva.

OBJETIVOS

Una de las líneas de investigación que viene abordando nuestro Grupo de Investigación se centra en el desarrollo de dos modelos experimentales que abordan la reconstrucción del músculo esquelético: en un primer modelo se intenta reconstruir un déficit de volumen mediante la trasplante autólogo de tejido adiposo (4) y un segundo modelo en que se intenta neoformar un músculo a partir de una matriz natural decelularizada (5).

Los objetivos específicos incluyen:

- Determinar si células troncales ubicadas en el tejido adiposo pueden contribuir a la neoformación muscular.
- Confirmar si el empleo de una matriz descelularizada de músculo esquelético puede servir de andamiaje para la reconstrucción del músculo dañado.
- Conocer las características microscópicas del músculo neoformado en cada uno de los dos modelos.

RESULTADOS

Nuestros resultados:

- Muestran que un proceso regenerativo o neoformativo de fibras musculares se establece en el modelo de implantación in vivo de matriz decelularizada probablemente por migración de células miogénicas desde el músculo subyacente lesionado(Fig.1)

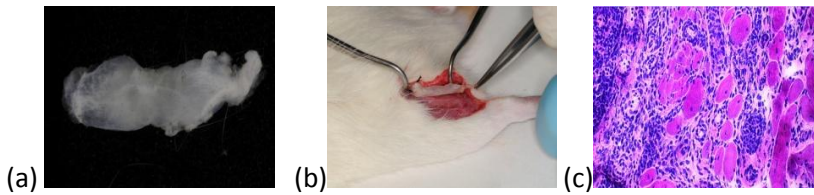


Fig. 1. (a) Matriz de músculo sóleo tras la decelularización. (b) implantación de la matriz en la superficie del músculo gastrocnemio. (c) Respuesta inflamatoria y neoformación de fibras musculares en la matriz implantada, H-E 20x.

- Apoyan la hipótesis de que (al menos desde un punto de vista morfológico) el trasplante de tejido adiposo autólogo favorece la reconstrucción de una pérdida volumétrica de músculo esquelético mediante la combinación de la respuesta regenerativa del propio órgano y la diferenciación miogénica de células madre ubicadas en el tejido adiposo.

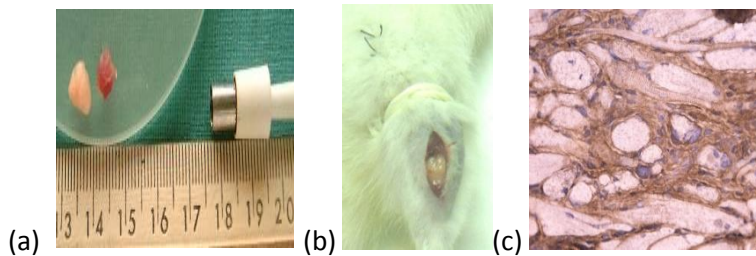


Fig.2. (a) Fragmento muscular extirpado y fragmento de tejido adiposo. (b) tejido adiposo implantado en el defecto muscular. (c) fibras musculares neoformadas con anomalías citoarquitecturales y desorientación, antidesmina 40x

En conclusión, los resultados obtenidos hasta el momento apuntan a que ambos modelos que venimos desarrollando en nuestro laboratorio son útiles para explorar las posibilidades en la reconstrucción de lesiones que conllevan pérdidas de masa muscular considerables.

REFERENCIAS

- (1) Bach AD et al. (2004) Skeletal muscle tissue engineering. *J. Cell Mol Med*, 8, 4: 413-422.
- (2) Tanzi MC, Faré S, Draghi, L, Altomare L. (2006) Scaffold for muscle tissue engineering. *Basic Appl Myol*, 16: 117-118.

- (3) Tajbakhsh S, Relaix F (2011) Du développement à la régénération du muscle squelettique. *Biofutur*; 321: 50-52.
- (4) Jimena I, Leiva-Cepas F, Rubio AJ, Luque E, Villalba R, Peña J (2011) Degree of histological recovery in skeletal muscle after reconstruction by adipose tissue implantation. *Histol Histopathol*, 26: S430-S431.
- (5) Jimena I, Luque E, Leiva-Cepas F, Rubio AJ, López-Martos R, Martínez Baena FJ, Jiménez-Reina L, Peña J. (2009) Muscle reconstruction using a decellularized matrix scaffold: preliminary results. *Histol Histopathol*, 24: S111-S112.

GRUPO BIO139

HORMONAS Y CÁNCER (Línea 1)

COMPONENTES DE LA LÍNEA-1:

RESPONSABLE DEL GRUPO: Gracia Navarro, Francisco fgracia@uco.es

RESPONSABLE DE LA LÍNEA: Castaño Fuentes, Justo P. justo@uco.es, y Luque Huertas, Raúl Miguel raul.luque@uco.es

Martínez Fuentes, Antonio Jesúsbc2mafua@uco.es
 Gahete Ortíz, Manuel David bc2gaorm@uco.es
 Córdoba Chacón, Joséjcordoba@uic.edu
 Villa Osaba, Alicia b42viosa@uco.es
 Ibáñez Costa, Alejandro aibanezcosta@gmail.com
 Rivero Cortés, Esther esther.rivero.cortes@gmail.com
 Rincón Fernández-Pacheco, David davidrfp@gmail.com
 Hormaechea Agulla, Daniel hormaechea85@gmail.com
 López López, Fernandobc2lolof@uco.es
 Santamaría Peiteado, Ramón ramonsape@hotmail.es
 Vázquez Borrego, M^a Carmen marvazbor@gmail.com
 José Antonio Ramos Fernández b82rafej@uco.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

1. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, edificio Severo Ochoa (C6), 3^a planta.
2. Grupo de Hormonas y Cáncer. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) / Hospital Universitario Reina Sofía.
3. CIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn).

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Fenotipado molecular de tumores (hipófisis, sistema digestivo, mama, próstata, tiroides y glándulas suprarrenales, entre otros), y estudio de la relación de las características clínicas de los pacientes. Se realiza el ensayo *in vitro* de drogas y fármacos conocidos o

experimentales para mejorar el diagnóstico y tratamiento de estas patologías.

2. Investigar el papel funcional de ciertos sistemas de neuropéptidos, destacando: somatostatina, cortistatina, ghrelina, kisspeptinas y sus familias de receptores correspondientes; especialmente el papel de los receptores truncados de somatostatina tipo 5 (sst5) y de una nueva variante de ghrelina (In1-ghrelina) identificadas por nuestro grupo en diferentes especies, incluida la humana. Hemos observado que dichas variantes truncadas del receptor sst5 y la In1-ghrelina están altamente expresadas en varias patologías tumorales de carácter endocrino, y que su presencia podría estar alterando las características moleculares y funcionales de estos sistemas reguladores pudiendo explicar las propiedades fisiopatológicas de estas patologías tumorales.
3. Estudiar la relación entre obesidad y cáncer, particularmente de mama y próstata; y definir el posible papel los sistemas de neuropéptidos de somatostatina-cortistatina y ghrelina en dicha interacción.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Luque RM, Córdoba-Chacón J, Ibáñez-Costa A, Gesmundo I, Grande C, Gracia-Navarro F, Tena-Sempere M, Ghigo E, Gahete MD, Granata R, Kineman RD, Castaño JP (2014) Obestatin plays an opposite role in the regulation of pituitary somatotrope and corticotrope function in female primates and male/female mice. *Endocrinology*. 155:1407-17.

Gahete MD, Rincón-Fernández D, Villa-Osaba A, Hormaechea-Agulla D, Ibáñez-Costa A, Martínez-Fuentes AJ, Gracia-Navarro F, Castaño JP, Luque RM (2014) Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight. *J Endocrinol*. 220:R1-24.

Luque RM, Ibáñez-Costa A, López-Sánchez LM, Jiménez-Reina L, Venegas-Moreno E, Gálvez MA, Villa-Osaba A, Madrazo-Atutxa AM, Japón MA, de la Riva A, Cano DA, Benito-López P, Soto-Moreno A, Gahete MD, Leal-Cerro A, Castaño JP (2013) A cellular and molecular basis for the selective desmopressin-induced ACTH release in Cushing disease patients: key role of AVPR1b receptor and potential therapeutic implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 98:4160-9.

Durán-Prado M, Gahete MD, Hergueta-Redondo M, Martínez-Fuentes AJ, Córdoba-Chacón J, Palacios J, Gracia-Navarro F, Moreno-Bueno G, Malagón MM, Luque RM, Castaño JP (2012) The new truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 is associated to poor prognosis in breast cancer and increases malignancy in MCF-7 cells. *Oncogene*. 31:2049-61.

Durán-Prado M, Saveanu A, Luque RM, Gahete MD, Gracia-Navarro F, Jaquet P, Dufour H, Malagón MM, Culler MD, Barlier A, Castaño JP (2010) A potential inhibitory role for the new truncated variant of somatostatin receptor 5, sst5TMD4, in pituitary adenomas poorly responsive to somatostatin analogs. *J Clin Endocrinol Metab* 95(5):2497-502.

PONENCIA

RESPUESTA DIFERENCIAL *IN VITRO* A OCTREÓTIDO Y PASIREÓTIDO EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS HIPOFISARIAS NORMALES Y TUMORALES EN HUMANOS

INTRODUCCIÓN

Los análogos de somatostatina (SSA) constituyen el tratamiento de primera línea para los adenomas hipofisarios. Concretamente, octreótido, que se une con gran afinidad al receptor de somatostatina (sst)-2, y pasireótido, que tiene afinidad por sst5, sst2 y sst3, están siendo utilizados satisfactoriamente para el control de la secreción hormonal y/o el crecimiento tumoral. Sin embargo, los SSA no siempre son eficaces, lo cual puede estar relacionado con la presencia, abundancia, disponibilidad de ssts y/o su señalización asociada.

OBJETIVOS

Nuestro principal objetivo es definir las características moleculares y celulares que subyacen a la respuesta diferencial asociada a los SSA en tumores hipofisarios humanos. Para ello hemos evaluado en paralelo la respuesta *in vitro* a octreótido y pasireótido utilizando cultivos primarios de adenomas hipofisarios analizando: señalización intracelular asociada a movilización de calcio libre citosólico ($[Ca^{2+}]_i$), secreción hormonal (ELISA e inmuno-blotting) y proliferación celular (Alamar-blue). Además, para evaluar los niveles de expresión de

hormonas hipofisarias y receptores utilizamos PCR cuantitativa en tiempo real. En este estudio, se han incluido 44 muestras: 16 somatotropinomas (GHomas), 6 corticotropinomas (ACTHomas), 5 prolactinomas (PRLomas), 15 adenomas no funcionantes (NFPA) y 2 hipófisis no tumorales (usadas como controles).

RESULTADOS

El tratamiento con octreótido y pasireótido disminuyó los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en 13/16 y 7/16 **GHomas**, respectivamente; ambos SSA redujeron similarmente la secreción de GH y la proliferación celular. En el caso de los **corticotropinomas**, octreótido y pasireótido disminuyeron los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en 2/6 y 4/6, respectivamente; sin embargo, ninguno de los SSA alteró significativamente la secreción de ACTH. Octreótido, pero no pasireótido, inhibió la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ en **PRLomas**. Ambos SSA inhibieron, de forma moderada, la señalización mediada por calcio en **NFPA**, siendo pocos los tumores respondedores, con una inhibición moderada en un pequeño porcentaje de células; sin embargo ambos SSA estimularon la proliferación celular en un considerable número de NFPA. Por último, octreótido no alteró la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ en **hipófisis normales**, mientras que pasireótido ejerció una débil inhibición. Finalmente, los resultados de nuestro estudio demuestran que la respuesta diferencial observada entre los tumores respondedores y los no respondedores a uno o ambos SSA no puede ser explicada por un patrón diferencial de expresión de receptores de somatostatina. El conjunto de nuestros resultados sugieren la existencia de una respuesta diferencial *in vitro* a octreótido y pasireotido en cultivos primarios de células hipofisarias normales y tumorales y por tanto, son necesarios estudios más profundos para conocer los factores claves implicados en esta respuesta diferencial a SSA en estas patologías tumorales.

REFERENCIAS

Taboada GF, Luque RM, Neto LV, Machado Ede O, Sbaffi BC, Domingues RC, Marcondes JB, Chimelli LM, Fontes R, Niemeyer P, de Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR (2008) Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *Eur J Endocrinol.* 158:295-303.

Duran-Prado M, Gahete MD, Martínez-Fuentes AJ, Luque RM, Quintero A, Webb SM, Benito-Lopez P, Leal A, Schulz S, Gracia-Navarro F, Malagon MM, Castaño JP (2009) Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:2634-2643.

Martínez-Fuentes AJ, Molina M, Vázquez-Martínez R, Gahete MD, Jiménez-Reina L, Moreno-Fernández J, Benito-López P, Quintero A, de la Riva A, Diéguez C, Soto A, Leal-Cerro A, Resmini E, Webb SM, Zatelli MC, degli Uberti EC, Malagón MM, Luque RM, Castaño JP (2011) Expression of functional KISS1 and KISS1R system is altered in human pituitary adenomas: evidence for apoptotic action of kisspeptin-10. *Eur J Endocrinol* 164(3):355-62.

Luque RM, Ibáñez-Costa A, López-Sánchez LM, Jiménez-Reina L, Venegas-Moreno E, Gálvez MA, Villa-Osaba A, Madrazo-Atutxa AM, Japón MA, de la Riva A, Cano DA, Benito-López P, Soto-Moreno A, Gahete MD, Leal-Cerro A, Castaño JP (2013) A cellular and molecular basis for the selective desmopressin-induced ACTH release in Cushing disease patients: key role of AVPR1b receptor and potential therapeutic implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 98:4160-9.

Colao A, Bronstein M, Freda P, Gu F, Shen CC, Gadelha M, Fleseriu M, van der Lely A, Farrall A, Hermosillo Reséndiz K, Ruffin M, Chen Y, Sheppard M; on behalf of the Pasireotide C2305 Study Group (2014) Pasireotide versus octreotide in acromegaly: a head-to-head superiority study. *J Clin Endocrinol Metab.* 13:jc20132480.

GRUPO BIO310

BALANCE ENERGÉTICO Y FUNCIÓN REPRODUCTORA

RESPONSABLE: M. Tena-Sempere fi1tesem@uco.es

COMPONENTES: L. Pinilla, D. González, J. Roa, A. Romero-Ruiz, M.J. Vázquez, J.M. Castellano, V.M. Navarro, R. Pineda, D. García Galiano, M.A. Sánchez-Garrido, F. Ruiz-Pino, M. Manfredi-Lozano, S. León, V. Heras, A. Barroso, A.B. Rodríguez, A.B. Pedraza, R. Onieva

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) y Área de Fisiología, Facultad de Medicina. Avda. Menéndez Pidal s/n. 14004 Córdoba

PONENCIA

INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN PUBERTAD, BALANCE ENERGÉTICO Y FERTILIDAD

La ingesta de alimentos, la homeostasis energética y la reproducción son funciones esenciales para la supervivencia de los individuos o de las especies, y están por ello bajo el control de sistemas de regulación muy sofisticados, cuyas señales y mecanismos de acción son aun en gran medida desconocidos. Como prueba adicional de su importancia funcional, el control de estos sistemas neuroendocrinos está estrechamente relacionado entre sí, lo que contribuye a un perfecto acoplamiento de funciones corporales relevantes tales como el control de los depósitos energéticos del organismo, la pubertad, el crecimiento y la fertilidad. Es destacable que los trastornos del metabolismo, el peso corporal, la pubertad y la fertilidad presentan una frecuencia creciente en las últimas décadas, sin que se hayan clarificado suficientemente las causas de este fenómeno y las estrategias terapéuticas para afrontarlo.

El **Objetivo General** de nuestro grupo de investigación es el de contribuir a una mejor caracterización de las señales y mecanismos moleculares implicados en el control fisiológico de la pubertad y la

función reproductora, así como de la interacción de éstos con los sistemas responsables de la regulación del balance energético y el peso corporal. Aunque nuestra actividad investigadora es de carácter básico, ésta posee un claro potencial *traslacional*, habida cuenta nuestros resultados podrían tener interés aplicado en el medio y largo plazo, permitiendo un mejor conocimiento de las causas y protocolos de tratamiento de alteraciones de la función reproductora (infertilidad, síndrome de ovario poliquístico, trastornos de la pubertad) y el peso corporal (obesidad, anorexia), que presentan una prevalencia elevada y creciente en sociedades desarrolladas como la nuestra.

A modo ilustrativo, presentaremos en estas Jornadas algunas de las actividades de investigación de nuestro grupo relacionadas con el estudio de la **Neurobiología de la Pubertad**. La pubertad es un evento madurativo clave en el desarrollo del individuo que es sensible a numerosas señales tanto internas como ambientales. Entre éstas, la maduración puberal es influenciada por factores nutricionales y por el estado metabólico del organismo. Es destacable que las alteraciones de la edad de pubertad se han asociado a una mayor frecuencia de patologías de diversa naturaleza, incluyendo trastornos metabólicos, psicológicos y cardiovasculares, e incluso con una menor esperanza de vida, a través de mecanismos aún no bien conocidos.

Nuestro grupo ha desarrollado estudios neuroendocrinos en modelos preclínicos de pubertad normal y alterada, que nos han permitido caracterizar el papel de diversos sistemas de péptidos cerebrales implicados en el control preciso de la edad de la pubertad y de su regulación por el estado metabólico y energético del organismo. En este campo, es destacable la caracterización de la función del sistema de kisspeptinas (sistema Kiss1/Gpr54), y de señales centrales relacionadas, como la neurokinina B (NKB), la nesfatina-1 y las melanocortinas, a través de una combinación de estudios de expresión y funcionales, desarrollados en modelos silvestres (WT) y genéticamente modificados.

Del mismo modo, nuestros estudios recientes se han dirigido a identificar las posibles interacciones de los sistemas de péptidos cerebrales antes indicados con señales procedentes de células no neuronales del sistema nervioso, como las células de la glía, así como con sensores del estado energético celular, tales como mTOR, AMPK y sirtuinas, que podrían contribuir a explicar las bases fisiopatológicas de

las alteraciones de la pubertad asociadas a situaciones de desregulación metabólica, tales como la desnutrición o la obesidad de inicio temprano. En este campo, los estudios funcionales (farmacológicos) y de expresión están siendo complementados por otros que incluyen la generación de modelos genéticamente modificados, tanto congénitos como condicionales.

Igualmente, en nuestro objetivo de clarificar los mecanismos moleculares de regulación puberal, hemos iniciado en los últimos años estudios dirigidos a la caracterización de la participación de microRNAs y sistemas de control epigenético en la regulación precisa de la maduración puberal. Estos análisis incluyen tanto estudios de expresión (por ej., perfiles de expresión de miRNAs en hipotálamo durante la pubertad normal y alterada en modelos preclínicos) y farmacológicos (por ej., de alteración de la actividad de metilación o acetilación cerebral y su impacto sobre la pubertad), como estudios de genómica funcional, dirigidos a alterar la expresión global o específica de miRNAs en células clave en el control puberal, tales como las neuronas Kiss1 y GnRH.

En su conjunto, las actividades de investigación desarrolladas en este campo nos están permitiendo avanzar en el conocimiento de las bases moleculares por las que se regulan los procesos madurativos (principalmente a nivel central) que conducen a la pubertad, así como de mecanismos fisio-patológicos de alteración puberal, en condiciones tales como el estrés metabólico y los trastornos del peso corporal. Esta investigación traslacional busca, como último objetivo, la identificación de estrategias preventivas y eventualmente terapéuticas que permitan un manejo más racional de las alteraciones de la edad de la pubertad, sus causas y sus posibles consecuencias en humanos.

Proyectos de Investigación y Tesis Doctorales: Las líneas de trabajo de nuestro grupo (incluyendo la expuesta arriba) se han desarrollado en el marco de diversos proyectos de investigación competitivos, financiados por agencias públicas nacionales (MINECO, MICINN, MEC, ISCIII-FIS, CIBERobn, PAIDI-Junta de Andalucía) e internacionales (EU-FP5, EU-FP7), así como por contratos de investigación con entidades privadas. Los proyectos vivos del grupo incluyen: 1 proyecto del Plan Nacional (MINECO), 1 proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía, 1 proyecto de la Convocatoria de Salud de la Junta de Andalucía y 1 proyecto EU del programa People del FP7, además de fondos del

centro de investigación biomédica en red del ISCiii (CIBERobn), ayudas anuales del PAIDI y el plan propio de la UCO, así como proyectos financiados por empresas farmacéuticas.

Por otra parte, el desarrollo de las líneas de investigación del grupo ha permitido completar en los últimos años un total de 8 Tesis Doctorales; doctores que han obtenido becas y contratos de investigación post-doctoral –programas Marie Curie (4 en los últimos años; tres de ellos en las convocatorias 2007, 2008 y 2010), Parga-Pondal (Xunta de Galicia), Juan de la Cierva, Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fulbright-. Adicionalmente, en la actualidad están en desarrollo un total de 5 proyectos de Tesis Doctoral en nuestro grupo de investigación. Igualmente, nuestro grupo viene desarrollando proyectos de colaboración con numerosos grupos de investigación nacionales e internacionales, y ha recibido (para estancias formativas de distinta duración) la visita de numerosos investigadores procedentes de universidades de diversos países europeos (Dinamarca, Francia, Italia, Polonia, Eslovaquia, Turquía, España) y americanos (México, Argentina).

Metodologías: Nuestro grupo aplica de rutina diversas técnicas y metodologías analíticas en el ámbito de la Endocrinología Experimental, que incluyen fundamentalmente aproximaciones in vivo y que emplean la rata y el ratón como especies modelo. Entre ellas se incluyen la administración intracerebral y sistémica de hormonas y neuropéptidos; la obtención de muestras biológicas -incluyendo diversos tejidos y muestras seriadas de sangre-; la monitorización in vivo de parámetros reproductores y metabólicos, así como peso corporal e ingesta; el testado farmacológico en incubaciones de tejidos (hipotálamo, hipófisis, gónadas); el análisis de niveles hormonales mediante radioinmunoensayo (RIA); la determinación de niveles de expresión de RNA mediante RT-PCR en tiempo real; y la evaluación de perfiles de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica. Igualmente, son operativos de rutina en nuestro grupo análisis de localización de RNA mediante hibridación in situ y estudios de niveles de proteínas por Western blot en tejidos de interés (cerebro, gónadas, tracto GI). Por otra parte, hemos potenciado en los últimos años el desarrollo de estudios en modelos murinos transgénicos y genéticamente modificados (GM); actualmente el grupo cuenta con hasta 12 líneas diversas de ratones GM, que incluyen KO globales y

condicionales. Igualmente, hemos optimizado técnicas para el análisis de expresión y manipulación funcional de microRNAs en tejidos de interés (stem-loop qPCR, LNA-ISH, sistemas químicos y lentivirales de interferencia de microRNAs). Del mismo modo, desarrollamos estudios de análisis masivo, con especial atención a aproximaciones proteómicas en tejido cerebral. Finalmente, estamos en fase de incorporación y/o optimización de un set-up de análisis electrofisiológico, así como sistemas optogenéticos de estimulación/inhibición de la actividad neuronal.

Publicaciones y otras actividades: Desde el año 2006, los miembros del grupo han publicado un total de 140 artículos en revistas internacionales con censores, que incluyen contribuciones a revistas tales como *Endocrinology*, *Cell Metabolism*, *Diabetes*, *Journal of Clinical Investigation*, *Physiological Reviews*, *Journal of Neuroscience*, *Nature Communications*, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *Nature Medicine*, *Nature Neuroscience*, *Nature Reviews in Endocrinology*, *Frontiers in Neuroendocrinology*, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *American Journal of Physiology*, *Human Reproduction Update*, *Biology of Reproduction*, *Molecular & Cellular Endocrinology* y *Journal of Neuroendocrinology*, entre otros. Adicionalmente, en los últimos años, los miembros del grupo de investigación han sido invitados a impartir >65 conferencias en congresos y >30 seminarios en foros científicos nacionales e internacionales. Igualmente, miembros de nuestro grupo forman parte de los comités editoriales de revistas de alto prestigio en nuestra disciplina, tales como *Endocrinology*, *Molecular & Cellular Endocrinology*, *Neuroendocrinology*, *Journal of Neuroendocrinology*, *Scientific Reports* y *PLoS ONE*, así como en la dirección científica del CIBERobn y el IMIBIC. Finalmente, nuestro grupo mantiene colaboraciones científicas con más de 20 grupos de investigación nacionales y extranjeros; colaboraciones que en su mayoría han resultado ya en publicaciones conjuntas en revistas internacionales.

GRUPO BIO276

BIOMEMBRANAS, ANTIOXIDANTES Y ESTRÉS OXIDATIVO

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Villalba Montoro, José Manuel jmvillalba@uco.es

Ariza Gómez, Julia..... julia.ariza.gomez@gmail.com

Burón Romero, María Isabel bc1burom@uco.es

Fernández del Río, Lucía..... luciafernandezdelrio@gmail.com

González Reyes, José Antoniobc1gorej@uco.es

Gutiérrez Casado, Elenae.gutierrezcasado@gmail.com

Khraiwesh, Husam..... husamn nutrition@yahoo.com

López Domínguez, José Alberto josealbertold@gmail.com

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Biología Celular, Fisiología e Inmunología; Facultad de Ciencias; Universidad de Córdoba; CEIA3.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Extensión de la longevidad por restricción calórica. Efecto del componente lipídico de la dieta en restricción calórica. Nuestro objetivo es estudiar de qué manera la composición lipídica de las membranas, que puede modularse mediante la grasa mayoritaria de la dieta, afecta a la fisiología y estructura mitocondrial, así como a distintos procesos celulares en los cuales interviene este orgánulo, como la biosíntesis de coenzima Q o la apoptosis celular, entre otros.
2. Papel del sistema Nrf2/NQO1 en la regulación del crecimiento celular y del metabolismo. Nuestro objetivo es estudiar el efecto del estatus de Nrf2 (factor de transcripción clave en la respuesta celular al estrés oxidativo), y de NQO1 (quinona reductasa cuya expresión está regulada por Nrf2) sobre el balance redox celular y el control del crecimiento y muerte celular.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Khraiwesh H, López-Domínguez JA, Fernández del Río L, Gutiérrez-Casado E, López-Lluch G, Navas P, de Cabo R, Ramsey JJ, Burón MI, Villalba JM, González-Reyes JA (2014) Mitochondrial ultrastructure and markers of dynamics in hepatocytes from aged, calorie restricted mice fed with different dietary fats. *Exp Gerontol*. doi: 10.1016/j.exger.2014.03.023

López-Domínguez JA, Khraiwesh H, González-Reyes JA, López-Lluch G, Navas P, Ramsey JJ, de Cabo R, Burón MI, Villalba JM (2014) Dietary fat and aging modulate apoptotic signaling in liver of calorie-restricted mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. En prensa.

Khraiwesh H, López-Domínguez JA, López-Lluch G, Navas P, de Cabo R, Ramsey JJ, Villalba JM, González-Reyes JA (2013) Alterations of Ultrastructural and Fission/Fusion Markers in Hepatocyte Mitochondria From Mice Following Calorie Restriction With Different Dietary Fats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 68:1023-1034

López-Domínguez JA, Khraiwesh H, González-Reyes JA, López-Lluch G, Navas P, Ramsey JJ, de Cabo R, Burón MI, Villalba JM (2013) Dietary fat modifies mitochondrial and plasma membrane apoptotic signaling in skeletal muscle of calorie-restricted mice. *Age*. 35:2027-2044

Jódar L, Mercken EM, Ariza J, Younts C, González-Reyes JA, Alcaín FJ, Burón I, de Cabo R, Villalba JM (2011) Genetic deletion of Nrf2 promotes immortalization and decreases lifespan of murine embryonic fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 66:247-256

PONENCIA

RESTRICCIÓN CALÓRICA, BALANCE REDOX CELULAR Y ENVEJECIMIENTO

RESUMEN

Utilizando un modelo experimental con ratones alimentados en restricción calórica con dietas en que contenían distintas fuentes grasas (manteca de cerdo, aceite de soja, aceite de pescado) hemos comprobado que la composición de ácidos grasos de las membranas es un factor clave a la hora de determinar los efectos beneficiosos de la restricción calórica con el envejecimiento, afectando la estructura y funcionamiento de las mitocondrias y a la señalización apoptótica, tanto en tejidos mitóticos como postmitóticos. Distintas alteraciones en la dinámica y estructura de las mitocondrias han sido también encontradas en otros modelos fisiológicos y patológicos. La falta Nrf2, regulador maestro de la respuesta celular al estrés oxidativo, y de NQO1, una de las principales enzimas antioxidantes cuya expresión se regula por Nrf2, produce importantes alteraciones en el crecimiento y muerte de las células.

INTRODUCCIÓN

La restricción calórica sin malnutrición (RC) es la intervención más estudiada que, de manera consistente, incrementa la longevidad máxima de los animales de laboratorio y retrasa el ritmo del envejecimiento biológico y de muchas enfermedades relacionadas con la vejez [1]. El/los mecanismo(s) responsable(s) de este retardo del envejecimiento aún se encuentran sometidos a debate. En 1956, Harman propuso que el envejecimiento es el resultado de las interacciones deletéreas de los radicales libres con los constituyentes celulares [2]. Aunque no exenta de debate en la actualidad [3], la teoría de los radicales libres continúa encontrándose entre las más aceptadas para explicar las causas del envejecimiento [4]. La disminución del estrés oxidativo celular se encuentra entre los distintos efectos positivos de la RC que pueden estar relacionados con sus efectos beneficiosos sobre la longevidad y el retraso de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Por otra parte, la RC disminuye la insaturación de los lípidos de membrana en distintos órganos de la rata, lo que también puede constituir una adaptación importante para prevenir el daño oxidativo (teoría de las membranas) [5]. El factor-2

relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2) está considerado como un regulador maestro de la respuesta celular ante condiciones de estrés oxidativo y electrofílico, regulando la expresión de muchas enzimas antioxidantes y enzimas detoxificadoras de fase II que se inducen bajo condiciones de estrés. Tras su activación, Nrf2 se estabiliza y se transloca rápidamente al núcleo, donde activa sus genes diana uniéndose al elemento de respuesta antioxidante (ARE), un elemento regulador común encontrado en las regiones flanqueantes 5' de los genes que codifican para enzimas antioxidantes y detoxificantes. Existe un gran número de genes regulados por ARE, entre los cuales se encuentra el que codifica la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), una enzima que detoxifica xenobióticos de tipo quinona y reduce los antioxidantes vitamina E y coenzima Q₁₀ a sus formas activas. Esta señalización es crítica para la regulación del balance redox celular, particularmente bajo condiciones de estrés [6,7].

OBJETIVOS

Nuestro objetivo ha sido analizar los efectos de tres dietas en RC que contenían distintas fuentes grasas principales: manteca de cerdo (rica en ácidos grasos saturados y monoinsaturados MUFA_n-9), aceite de soja (rica en PUFA_n-6) y aceite de pescado (rica en PUFA_n-3) sobre la longevidad, la señalización apoptótica y la ultraestructura y fisiología mitocondrial en hígado y músculo esquelético de ratones. Por otra parte, estudiamos el impacto de la pérdida de Nrf2 o de NQO1 sobre el crecimiento y el metabolismo celular en fibroblastos embrionarios de ratón obtenidos de ratones KO para estos genes.

RESULTADOS

Utilizando un modelo experimental en ratones hemos comprobado que la grasa de la dieta modula la adaptación metabólica mitocondrial durante la restricción calórica en ratones jóvenes, tanto en músculo esquelético como en hígado. Comparada con una dieta en RC cuya grasa principal fue el aceite de soja, una dieta en RC con manteca de cerdo resultó en una disminución de la fuga de protones en mitocondrias de músculo esquelético, mientras que una dieta en RC conteniendo aceite de pescado disminuyó sensiblemente la producción de ROS en mitocondrias de hígado. La grasa de la dieta en RC también alteró de manera significativa los sistemas de señalización apoptótica, tanto en músculo esquelético como en hígado, así como la

ultraestructura mitocondrial. Resulta muy interesante el hecho de que la longevidad resultó especialmente incrementada en el grupo de animales alimentados en RC con una dieta que contenía manteca de cerdo, resultado esperado de acuerdo con las previsiones de la teoría de las membranas. Las modificaciones en la fisiología mitocondrial por restricción calórica con distintas fuentes grasas podrían estar relacionadas con alteraciones en la biosíntesis/acumulación de coenzima Q, molécula transportadora de electrones de la membrana mitocondrial interna, tanto en modelos animales *in vivo*, como en sistemas celulares *in vitro*. Por otra parte, utilizando un modelo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) obtenidos de ratones knockout (Nrf2^{-/-} o NQO1^{-/-}) hemos demostrado que la falta de Nrf2 resulta en una inmortalización temprana de los MEFs debido a la pérdida prematura de la señalización mediada por p53. Sin embargo, las células muestran una longevidad disminuida así como una menor tasa de crecimiento respecto a los controles. Por su parte, los MEFs NQO1^{-/-} experimentan una inmortalización normal pero, sorprendentemente, las células muestran una longevidad sensiblemente aumentada y una mayor capacidad proliferativa respecto a los controles. Estas alteraciones pueden estar mediadas por alteraciones en la actividad de distintas proteína quinasas y de los sistemas de señalización apoptótica en las células carentes de Nrf2 o de NQO1. Finalmente, encontramos que la falta de Nrf2 o de NQO1 también produjo cambios en el perfil metabólico celular que podrían estar relacionados con su distinta capacidad de crecimiento. Mediante colaboraciones con otros grupos de investigación, hemos contribuido asimismo a la demostración de la importancia de las alteraciones en la ultraestructura y dinámica mitocondrial en distintos modelos fisiológicos o patológicos [8-10], y de Nrf2 en la regulación del metabolismo celular [11].

REFERENCIAS

[1] Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*. 489:318-321

[2] Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 11:298-300.

- [3] López-Otín C1, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell*. 153:1194-1217
- [4] Barja G (2013) Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxid Redox Signal*. 19:1420-1445
- [5] Lee J, Yu BP, Herlihy JT (1999) Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. *Free Radic Biol Med*. 26:260-265.
- [6] Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK (2014) Regulation of Nrf2—an update. *Free Radic Biol Med*. 66:36-44.
- [7] Martín-Montalvo A., Villalba JM, Navas P, de Cabo R (2011) NRF2, cancer and calorie restriction. *Oncogene*. 30:505-520
- [8] Mercken EM, Mitchell SJ, Martín-Montalvo A, Minor RK, Almeida M, Gomes AP, Scheibye-Knudsen M, Palacios HH, Licata JJ, Zhang Y, Becker KG, Khraiweh H, González-Reyes JA, Villalba JM, Baur JA, Vlasuk GP, Ellis JL, Sinclair DA, Bernier M, de Cabo R (2014) SRT2104 extends survival of male mice on a standard diet and preserves bone and muscle mass. *Aging Cell*. En prensa
- [9] Ruiz-Limón P, Barbarroja N, Pérez-Sánchez C, Aguirre MA, Bertolaccini ML, Khamashta MA, Rodríguez-Ariza A, Almadén Y, Seguí P, Khraiweh H, González-Reyes JA, Villalba JM, Collantes-Estévez E, Cuadrado MJ, López-Pedrerá C (2014) *Annals of the Rheumatic Diseases*. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204351
- [10] Pérez-Sánchez C, Ruiz-Limón P, Aguirre MA, Bertolaccini ML, Khamashta MA, Rodríguez-Ariza A, Seguí P, Collantes-Estévez E, Barbarroja N, Khraiweh H, González-Reyes JA, Villalba JM, Velasco F, Cuadrado MJ, López-Pedrerá C (2012) *Blood*. 119:5859-5870
- [11] Siendones E, Santa-Cruz S, Martín-Montalvo A, Cascajo MV, Ariza J, López-Lluch G, Villalba JM, Acquaviva-Bourdain C, Roze E, Bernier M, de Cabo R, Navas P (2014) Membrane-bound CYB5R3 is a common effector of nutritional and oxidative stress response through FOXO3a and Nrf2. *Antioxidants Redox Signaling*. En prensa.

BIO216

DEFENSA ANTIOXIDANTE CELULAR

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Bárcena Ruiz, José Antonio ja.barcena@uco.es
 Martínez Galisteo, Emilia bb1magam@uco.es
 Peinado Peinado, José bb1pepej@uco.es
 Padilla Peña, C. Alicia bb1papec@uco.es
 González Ojeda, Raúl b62goojr@uco.es
 Miranda Fuentes, Pedro g02mifup@uco.es
 Carmona Talavera, Diego b02catad@uco.es
 Muñoz Gómez, Lourdes Laura nila2121@hotmail.com

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC); Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3).

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Estructura y función de “redoxinas” y modulación de la homeostasis redox celular.
2. Desarrollo y aplicación de métodos proteómicos para el estudio del proteoma redox tiólico.
3. Implicación de redoxinas en la acción del óxido nítrico (NO) sobre la proliferación de células de hepatoblastoma.
4. Estudio de las propiedades antioxidantes de productos derivados de la industria vitivinícola.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

[1] McDonagh, B., Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., & Bárcena, J. A. (2013). Thiol Redox Sensitivity of Two Key Enzymes of Heme Biosynthesis and Pentose Phosphate Pathways: Uroporphyrinogen Decarboxylase and Transketolase. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 13 pages. doi:10.1155/2013/932472

- [2] González, R., Ferrín, G., Aguilar-Melero, P., Ranchal, I., Linares, C. I., Bello, R. I., et al. (2013). Targeting hepatoma using nitric oxide donor strategies. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(5), 491–506. doi:10.1089/ars.2011.4476
- [3] Peinado, J., de Lerma, N. L., Peralbo-Molina, A., Priego-Capote, F., de Castro, C., & McDonagh, B. (2013). Sunlight exposure increases the phenolic content in postharvested white grapes. An evaluation of their antioxidant activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1566–1575. doi:10.1016/j.jff.2013.06.007
- [4] McDonagh, B., Padilla, C. A., Pedrajas, J. R., & Bárcena, J. A. (2011). Biosynthetic and iron metabolism is regulated by thiol proteome changes dependent on glutaredoxin-2 and mitochondrial peroxiredoxin-1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 15565–15576. doi:10.1074/jbc.M110.193102
- [5] Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., McDonagh, B., & Bárcena, J. A. (2010). Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(3), 249–258. doi:10.1089/ars.2009.2950

PONENCIA

EL EQUILIBRIO REDOX CELULAR: DE LA LEVADURA A LOS TUMORES

RESUMEN

La adaptación a una vida dependiente del oxígeno ha llevado a las células a convivir con las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) aprovechándolas como moléculas señalizadoras, mediante la oxidación reversible de los grupos tiol de las proteínas. El Grupo BIO-216 estudia la implicación de las proteínas Tiorredoxina (Trx), Glutarredoxina (Grx) y Peroxirredoxina (Prx) y del tripéptido Glutatión (GSH) en la modulación del estado redox de tioles en proteínas clave del metabolismo del hierro y biosintético y de vías de señalización. Se estudia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que es un modelo de célula eucariótica con un gran número de genes homólogos a los de mamíferos y de fácil manipulación. El conocimiento adquirido se extrapola a células tumorales de hígado en cultivo y modelos de hepatocarcinoma en rata y ratón para conocer los mecanismos de regulación redox en estas células y contribuir a la mejora de la terapia antitumoral.

INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producen estrés oxidativo y oxidan a las macromoléculas dañándolas, lo que impide su correcto funcionamiento y puede dar lugar a enfermedades. En consecuencia, conviene mantener un buen nivel de antioxidantes e incluso cuantos más mejor, razón por la cual, incluir antioxidantes en la dieta se ha convertido en una rutina. Sin embargo, esta tendencia ha sido cuestionada recientemente por James D. Watson, el descubridor de la estructura del ADN y premio Nobel, quien piensa que probablemente los suplementos nutricionales antioxidantes, más que prevenir el cáncer, lo han podido causar_ {Watson, 2013}. Efectivamente, se sabe que la imposibilidad de tratar muchos de los cánceres terminales se debe a que poseen demasiada capacidad antioxidante.

La mayoría de los factores de riesgo asociados con enfermedades crónicas interaccionan con las células mediante la generación de ROS. Pero las ROS también se producen normalmente como subproductos de la propia actividad celular, cuya adaptación a una vida dependiente

del oxígeno les ha llevado a convivir con las ROS y a aprovecharlas para usarlas como moléculas señalizadoras o incluso como unos elementos más del metabolismo. Así, de nuevo James D. Watson acaba de postular que la resistencia a la insulina en la diabetes de tipo 2 puede haber surgido como consecuencia de una insuficiencia de ROS, que normalmente oxidan moléculas clave para controlar los niveles de azúcar en sangre {Watson, 2014}.

La clave está en el correcto equilibrio entre oxidantes y antioxidantes y sólo cuando la balanza se descompensa en un sentido o en otro por causas diversas, es cuando surgen los problemas. Resulta de gran interés el estudio de los mecanismos mediante los que las células consiguen mantener el equilibrio redox adecuado o la “homeostasis redox”, evitando el exceso de ROS con una maquinaria molecular antioxidante pero, al mismo tiempo, utilizando algunas modificaciones oxidativas de las proteínas como señales reguladoras del metabolismo.

En este contexto se enmarcan las líneas de investigación del grupo BIO216. Utilizamos la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de célula eucariótica para la investigación básica de las funciones metabólicas y la regulación de proteínas particulares, debido a que posee un gran número de genes homólogos a los de mamíferos y a su fácil manipulación. Los conocimientos adquiridos en el estudio de este modelo se extrapolan a células tumorales de hígado en cultivo y a modelos de rata y ratón.

El aspecto principal de nuestra investigación es el hecho de que las proteínas tienen un “punto débil” frente a la oxidación, que es el aminoácido cisteína (Cys), uno de los menos abundantes y cuyo átomo de azufre, normalmente en estado reducido (tiol, Cys-SH o tiolato, Cys-S⁻), puede oxidarse a sulfénico (Cys-SOH), sulfínico (Cys-SO₂H) o sulfónico (Cys-SO₃H) en presencia de peróxidos de oxígeno (H₂O₂; ROOH), a S-nitrosoCys (Cys-SNO) con peróxidos de nitrógeno (ONOO⁻) o a disulfuro (Cys-S-S-X) por simple intercambio tiol- disulfuro. La naturaleza esencialmente reversible de estas oxidaciones de Cys, a excepción del sulfónico, les permite modular la función de las proteínas. Su reversión al estado reducido está catalizada por las redoxinas Glutarredoxina (Grx) y Tiorredoxina (Trx), a menudo con la implicación del abundante tripéptido Glutatión, cuya forma reducida (GSH) puede formar un disulfuro mixto con Cys proteicas (Cys-S-SG), proceso que se conoce como glutationilación.

Otro grupo de redoxinas, constituido por la familia de las Peroxirredoxinas (Prx), posee una Cys activa, denominada peroxidática, capaz de reducir peróxidos. La regeneración de esta Cys tras cada ciclo catalítico requiere poder reductor proveniente normalmente de Trx, aunque nosotros hemos demostrado que la Prx1 mitocondrial de la levadura también acepta electrones del sistema GSH/Grx [5].

Los objetivos que se relacionan a continuación van encaminados a comprobar la siguiente hipótesis: *las alteraciones de la homeostasis redox celular dependientes de redoxinas dan lugar a cambios metabólicos que conducen a situaciones patológicas.*

OBJETIVOS

- Conocer las funciones de las redoxinas Grx2, Prx1 y Trx3 de levadura en el metabolismo del Fe y en la función mitocondrial.
- Diferenciar las funciones de las formas citosólica y mitocondrial de Grx2.
- Descubrir elementos del proteoma sensibles a cambios redox tiólicos y describir cómo esos cambios afectan a sus funciones in vivo e in vitro.
- Extrapolar los conocimientos obtenidos en el modelo de levadura para conocer el papel de las redoxinas humanas en la proliferación y en la muerte de células cancerosas.

RESULTADOS

- El sistema GSH/Grx2 cataliza cambios en el estado redox de Cys concretas de las proteínas Tkl1 y Hem12 con consecuencias sobre la actividad de estas dos importantes enzimas implicadas en la síntesis del grupo hemo y en el desvío del flujo glucolítico hacia vías biosintéticas {McDonagh, 2013}.

- La Prx1 mitocondrial está implicada en la comunicación entre mitocondria y citosol en relación con el metabolismo del hierro, pues su ausencia impide la exportación de la señal inhibitoria del regulón del Fe derivada de la maquinaria generadora de [Fe-S] mitocondrial, que está operativa {McDonagh, 2011}. Además, este efecto requiere la presencia de Grx2. Actualmente estamos “rescatando” mutantes delecionados en Grx2 y en Grx2 y Prx1 con las isoformas mitocondrial y

citosólica de Grx2 para comprobar cuál de ellas es responsable de esta implicación en el metabolismo del Fe.

- La reintroducción de la isoforma mitocondrial o la citosólica o ambas en un mutante carente de Grx2 tiene efectos diferenciales sobre el estado redox tiólico global y sobre el de un grupo de proteínas en particular. En concreto, la isoforma mitocondrial es relevante en condiciones fermentativas, en las que el papel de la mitocondria como productora de energía es secundario, pero su participación en el metabolismo biosintético y del Fe es determinante. En cambio, la forma citosólica tiene papel destacado en condiciones de crecimiento respiratorio en el que la actividad energética mitocondrial es muy intensa [resultados sin publicar].

- El patrón de expresión de algunos genes del metabolismo del Fe en estos mutantes es acorde con la activación del factor de transcripción Aft1. La expresión de otros genes relacionados con la biosíntesis de [Fe-S] y con el metabolismo glucídico implica a otros factores de transcripción sensibles al estado redox. Los niveles de GSH/GSSG son acordes con esta situación [resultados sin publicar].

- El Óxido Nítrico (NO) es un radical libre y una molécula señalizadora implicada en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Un aumento de los niveles de NO en células de hepatoblastoma en cultivo mediante la sobreexpresión de la NO Sintasa-3 (NOS-3) tiene efecto pro-apoptótico {González, 2013}. Recientemente hemos comprobado que, en paralelo con ese efecto, aumentan los niveles, la actividad y el grado de oxidación de Grx1 y Trx1 en estas células, así como otros sistemas antioxidantes y la síntesis de [Fe-S] mitocondrial. Ocurre lo mismo en tumores hepáticos de ratas y en tumores de ratones que sobreexpresan NOS-3, coincidiendo con un incremento de las actividades proapoptóticas de las Caspasas 8 y 3 [resultados sin publicar]. Mediante el silenciamiento de Grx1 o Trx1 con siRNA específicos, estamos comprobando el grado de implicación de estas redoxinas en el efecto antitumoral del NO. También estamos comprobando el estado redox de algunas proteínas de vías de señalización en estas condiciones y durante el tratamiento con fármacos anticancerígenos. Esperamos encontrar claves de los mecanismos moleculares implicados en estos procesos que contribuyan a la mejora de las terapias antitumorales.

REFERENCIAS ADICIONALES:

[6] Watson, JD (2013) Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open biology*, vol. 3(1), pp. 120144-120144.

[7] Watson, JD (2014) Type 2 diabetes as a redox disease. *The Lancet*, vol. 383(9919), pp. 841-843.

BIO138

GENÉTICA MOLECULAR DE LA PATOGÉNESIS FÚNGICA

COMPONENTES:

M.I. González-Roncero, C. de la Hera, A. Di Pietro, M.C. Ruiz-Roldán, E. Pérez-Nadales, K. Schaefer, D. Turra, S. Vitale, G. Bravo-Ruíz, M. El Ghalid, D. Segorbe Luque, E. Martínez Aguilera, C. Corral Ramos, T. Fernandes.

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Genética, Campus Rabanales Edificio Gregor Mendel C5, Universidad de Córdoba, E-14071 Córdoba

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Mecanismos de patogénesis en *Fusarium oxysporum*

Los hongos patógenos producen daños devastadores en la agricultura y la salud humana. El género *Fusarium* representa el grupo más relevante entre los fitopatógenos, ya que ataca prácticamente a todas las plantas cultivadas. *Fusarium oxysporum* es la especie con mayor distribución dentro del género. Este hongo produce marchitez vascular en más de 100 especies vegetales y es un emergente patógeno oportunista de humanos, causando infecciones sistémicas en pacientes inmunodeprimidos.

Nuestro grupo utiliza *F. oxysporum* como modelo para el estudio de los mecanismos que definen la patogénesis en hongos filamentosos. Nos centramos principalmente en los aspectos básicos de la virulencia que están conservados en todos los hongos patógenos, sea cual sea la especie hospedadora.

1. Señalización y patogénesis en hongos: regulación de cascadas MAPK y patogenicidad por el pH y respuesta quimiotrópica.

Los hongos patógenos utilizan señales químicas y físicas para percibir la disponibilidad de nutrientes, el contacto con superficies y la presencia del huésped. Las cascadas MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos) juegan un papel fundamental en la traducción de señales activadoras de

la patogénesis en los hongos patógenos. Nuestro grupo ha sido el primero en caracterizar una MAPK (denominada Fmk1 de Fusarium MAP Kinase 1) en un hongo patógeno del suelo {Di Pietro, 2001}. Esta cascada MAPK es esencial para la infección y controla múltiples procesos tales como la adhesión a la planta, la producción de enzimas líticas o el crecimiento invasivo en tejido vegetal {Di Pietro, 2001; Perez-Nadales, 2011; Prados Rosales, 2008; Rispail, 2009}. Otras dos MAPKs, Mpk1 y Hog1 son relevantes para la infección en *F. oxysporum* (Segorbe-Luque y Di Pietro, unpublished results) y existen otras proteínas quinasas como TOR (target of rapamycin) que también regulan la infección {Lopez-Berges, 2010}. Actualmente, nuestro objetivo es entender cómo estas cascadas son reguladas por factores ambientales, particularmente el pH, y su papel en la patogénesis fúngica. Además, nuestro grupo está interesado en la respuesta quimiotrópica o de crecimiento dirigido hacia la planta durante los primeros estadios de la infección en *F. oxysporum*. Nuestros resultados demuestran que *F. oxysporum* es capaz de crecer hacia una variedad de compuestos tales como nutrientes, feromonas sexuales o compuestos secretados por raíces de tomate (Turrá y Di Pietro, unpublished results). Estamos trabajando en la caracterización molecular de las señales y de sus respectivos receptores celulares, además de las rutas implicadas en la percepción y transducción.

2. Mecanismos genéticos de adaptación al estilo de vida patogénico

F. oxysporum es considerado un patógeno de amplio rango, ya que es capaz de causar enfermedad en una gran variedad de especies vegetales y animales. Actualmente representa el único modelo descrito en hongos que hace posible estudiar los mecanismos de infección en ambos reinos de huéspedes {Navarro-Velasco, 2011; Ortoneda, 2004; Schafer, 2014}. Esto nos ha permitido identificar una serie de genes y mecanismos importantes para la patogénesis en plantas de tomate y/o en ratón. Datos recientes del grupo indican que determinadas regiones del genoma de *F. oxysporum* sufren reorganizaciones frecuentes (Pérez-Nadales y Di Pietro, unpublished results). Esto puede considerarse un mecanismo para incrementar la variabilidad fenotípica del hongo. En colaboración con otros laboratorios estamos tratando de identificar los mecanismos genéticos que causan estos cambios y de estudiar su posible función en la evolución de nuevas formas patogénicas de *F. oxysporum*.

3. El complejo ubiquitin ligasa-Fbp1: identificación de proteínas diana, su papel en patogénesis y en el ciclo celular.

El proteosoma regula la expresión de genes eucarióticos mediante la rápida eliminación de proteínas que no son necesarias. Las proteínas F-box juegan un papel fundamental en este proceso, uniendo proteínas que son dirigidas al llamado complejo SCF (F-box containing complex), donde estas proteínas son marcadas con ubiquitina para la degradación final en el proteosoma. Las proteínas F-box no actúan indiscriminadamente, sino que reclutan dianas específicas, regulando así el nivel de las mismas.

En hongos, las proteínas F-box han sido asociadas con el control del ciclo celular, regulación por glucosa, el reloj circadiano y, más recientemente, la patogenicidad en plantas. En *Fusarium*, dos proteínas F-box del complejo SCF están implicadas en patogénesis, Frp1 en *F. oxysporum* y Fbp1 en *F. graminearum*. En *F. oxysporum* hemos identificado un gen ortólogo con *fbp1* de *F. graminearum*. Fbp1 está implicada en la virulencia de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, ya que mutantes nulos en dicho gen presentan un retraso importante en la infección de plantas de tomate {Miguel-Rojas, 2013}. Nuestros trabajos indican que la proteína Fbp1 está implicada en la ruta de señalización MAPK Fmk1. El objetivo actual es conocer las proteínas diana de Fbp1 implicadas en dicha ruta de señalización. El análisis proteómico ha revelado la presencia de hasta 80 proteínas con expresión diferencial en condiciones de crecimiento en medio mínimo, en el que la cepa mutante está limitada en el crecimiento invasivo. Entre ellas, Bmh2, una proteína 14-3-3, ha sido identificada con un nivel de expresión 5 veces superior en la estirpe mutante, sugiriendo que dicha proteína está regulada por Fbp1 (Miguel-Rojas y De la Hera, unpublished results). Nuestro interés se centra ahora en entender el papel de Bmh2 en la patogénesis de *F. oxysporum* y su regulación por Fbp1.

4. Caracterización molecular del sistema lítico de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Durante la patogénesis intervienen numerosas enzimas líticas de compuestos y polímeros vegetales, cuya producción requiere la activación de los genes estructurales responsables así como de factores de transcripción que responden a ciertos estímulos y que regulan la expresión de los anteriores. Recientemente nuestro grupo ha caracterizado el sistema lipolítico de *F. oxysporum* {Bravo-Ruiz, 2013} y en el marco de la colaboración establecida con un grupo de la Universidad de Hamburgo (Alemania), estamos realizando un estudio comparativo

extenso de las lipasas estructurales y de los factores de transcripción que regulan dicho sistema, en las especies *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium graminearum*. Además, el grupo está trabajando en la caracterización de los mecanismos de regulación y modulación de la expresión de poligalacturonasas (PGs), encargadas de despolimerizar la pectina, componente principal de la pared celular primaria de la planta. Asimismo nos proponemos analizar la respuesta de defensa de la planta hospedadora *Solanum lycopersicum*, específicamente la inducción de genes responsables de Poligalacturonase Inhibiting Proteins (PGIP) en respuesta a la presencia /ausencia de distintas versiones (mutantes o silvestres) de las PGs de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

5. Regulación de genes implicados en la biogénesis y remodelado de la pared celular durante el desarrollo y la infección

La biogénesis y el remodelado de la pared celular implican numerosas rutas biosintéticas con la acción concertada de cientos de productos génicos, como sintasas de quitina, sintasas de glucano, glicosiltransferasas, glicosilhidrolasas, quitinasas y glucanasas. El entrecruzamiento entre glucano, quitina y proteínas está estrechamente relacionado con la plasticidad que la pared celular presenta durante los diferentes estadios del desarrollo en hongos filamentosos y por ende del proceso de infección. En el patógeno de arroz *Magnaporthe grisea* se ha identificado un factor de transcripción, Con7p, que regula procesos morfogénicos relacionados con la patogénesis y la expresión de genes implicados en la estructura o función de la pared celular. En *F. oxysporum* hemos identificado tres genes ortólogos al *con7* de *M. grisea*: *Focon7-1*, *Focon7-21* y *Focon7-22*. Los mutantes deficientes $\Delta con7-1$ han resultado ser no patógenos sobre plantas de tomate, mientras que los mutantes $\Delta con7-2$ presentan comportamiento patotípico igual al silvestre. Por otro lado, la transcripción del gen *Focon7-1* tiene lugar mediante un procesamiento diferencial de sus intrones, originando cuatro tipos de mRNA distintos y representados con distinta abundancia relativa en las condiciones del estudio.

POENCIA

REVERTIENTES ESPONTÁNEOS DE *F. OXYSPORUM* PORTAN DELECCIONES Y DUPLICACIONES DE GRANDES SEGMENTOS CROMOSÓMICOS

PONENTE: Elena Pérez-Nadales

RESUMEN

Los distintos aislados naturales del hongo patógeno *Fusarium oxysporum* presentan una llamativa inestabilidad fenotípica, asociada con cambios en el crecimiento, desarrollo y virulencia. Se conoce poco sobre las bases genéticas de este fenómeno. Identificamos que el mutante $\Delta rho1$ de *F. oxysporum*, que presenta un fenotipo de colonia severamente reducido, origina sectores de crecimiento más rápido, fácilmente detectables tras 2-3 días de incubación en medio sólido. La caracterización fenotípica de varios revertientes independientes reveló cambios en varios fenotipos, entre ellos el crecimiento en distintas fuentes de nutrientes o la resistencia a drogas que dañan la pared celular. Con el fin de estudiar los mecanismos genéticos implicados, se realizó el análisis de varios revertientes mediante re-secuenciación del genoma completo. La caracterización de las reorganizaciones genéticas reveló la presencia de deleciones y/o duplicaciones de extensos (20 a 160 Kb) segmentos cromosómicos, algunos de los cuales se localizaban en regiones subtelo méricas. Algunas de las deleciones y duplicaciones se confirmaron experimentalmente mediante PCR y PCR cuantitativa en tiempo real. Es más, encontramos que estos sectores de crecimiento rápido también se originan con frecuencias similares en colonias de la cepa silvestre de *F. oxysporum*, lo que indica que el mecanismo implicado es independiente de la mutación $\Delta rho1$. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo intrínseco de inestabilidad genómica en *F. oxysporum* que induce reorganizaciones internas del genoma, contribuyendo con ello a la plasticidad genómica de este importante hongo patógeno.

OBJETIVOS

Analizar y caracterizar la base genética de los cambios fenotípicos observados en revertientes de *F. oxysporum*.

METODOLOGÍA

Se aislaron revertientes de la cepa $\Delta rho1$ de *F. oxysporum* tras 5 días de crecimiento en placas de medio mínimo mediante dos tandas de "single

springing". Se analizó el fenotipo de crecimiento de las colonias de los revertientes en distintas condiciones nutricionales (medio rico/medio mínimo) y en presencia de estrés de pared mediante la adición de Calcofluor White al medio de cultivo. El genoma de los revertientes fue re-secuenciado en las Instalaciones de Genómica del Centro de Regulación Genómica de Barcelona (Illumina Genome Analyzer). Las secuencias fueron alineadas con el genoma de referencia. La predicción de variaciones en el número de copia (CNV) se basó en los valores de cobertura de las secuencias, realizados en ventanas de 1 Kb (Duplicaciones cuando $\log_2 > 0.75$ o Delecciones cuando $\log_2 < -0.75$), seguido por inspección manual. La confirmación experimental de varias delecciones y duplicaciones se realizó, respectivamente, mediante PCR y PCR cuantitativa en tiempo real.

RESULTADOS MÁS RECIENTES

La re-secuenciación del genoma de los revertientes del mutante $\Delta\rho1$ ha revelado la presencia de grandes delecciones y/o duplicaciones segmentales (CVNs). Varias CVNs han sido confirmadas experimentalmente. Recientemente, hemos identificado distintas condiciones de crecimiento en las que la cepa silvestre también produce sectores de crecimiento rápido de forma espontánea, lo que sugiere que el mecanismo genético implicado es independiente de la mutación $\Delta\rho1$.

REFERENCIAS

Bravo-Ruiz, G., Ruiz-Roldan, C., Roncero, M. I., 2013. Lipolytic system of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mol Plant Microbe Interact.* 26, 1054-67.

Di Pietro, A., Garcia-MacEira, F. I., Meglecz, E., Roncero, M. I., 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol.* 39, 1140-52.

Lopez-Berges, M. S., Rispail, N., Prados-Rosales, R. C., Di Pietro, A., 2010. A nitrogen response pathway regulates virulence in plant pathogenic fungi: role of TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Signal Behav.* 5, 1623-5.

Miguel-Rojas, C., Hera, C., 2013. Proteomic identification of potential target proteins regulated by the SCF(F) (bp1) -mediated proteolysis pathway in *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol.* 14, 934-45.

Navarro-Velasco, G. Y., Prados-Rosales, R. C., Ortiz-Urquiza, A., Quesada-Moraga, E., Di Pietro, A., 2011. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol.* 48, 1124-9.

Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, M. I., Mayayo, E., Di Pietro, A., 2004. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect Immun.* 72, 1760-6.

Perez-Nadales, E., Di Pietro, A., 2011. The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell.* 23, 1171-85.

Prados Rosales, R. C., Di Pietro, A., 2008. Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell.* 7, 162-71.

Rispail, N., Di Pietro, A., 2009. *Fusarium oxysporum* Ste12 controls invasive growth and virulence downstream of the Fmk1 MAPK cascade. *Mol Plant Microbe Interact.* 22, 830-9.

Schafer, K., Di Pietro, A., Gow, N. A., MacCallum, D., 2014. Murine model for *Fusarium oxysporum* invasive fusariosis reveals organ-specific structures for dissemination and long-term persistence. *PLoS One.* 9, e89920.

BIO301

MECANISMOS MOLECULARES DE MUTAGÉNESIS Y REPARACIÓN DE ADN

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Rodríguez Ariza, Rafael.....ge1roarr@uco.es

Roldán Arjona, M^a Teresage2roarm@uco.es

Córdoba Cañero, Dolores b72cocad@uco.es

García-Ortiz, M^a Victoria b42gaorm@uco.es

Morales Ruiz, Teresab52morum@uco.es

Parrilla Doblas, Jara Teresa..... b52padoj@uco.es

Ramiro Merina, Ángel..... b22ramea@uco.es

Devesa Guerra, Ivánb82deguei@uco.es

Barbado García-Gil, Casimiro b72bagac@uco.es

Villaecija Aguilar, Jose Antonioz32viagj @uco.es

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Departamento de Genética, Universidad de Córdoba.

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. Identificar y caracterizar mecanismos de reparación de ADN y su papel en el proceso de mutagénesis.
2. Analizar el papel de la reparación por escisión de bases en fenómenos de control epigenético.
3. Aplicabilidad de las desmetilasas de ADN en reprogramación epigenética.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Martínez-Macías, M.I., Córdoba-Cañero, D., Ariza, R.R., and Roldán-Arjona, T. (2013). The DNA repair protein XRCC1 functions in the plant DNA demethylation pathway by stimulating cytosine methylation (5-meC) excision, gap tailoring, and DNA ligation. *J Biol Chem* 288, 5496-5505.

Parrilla-Doblas, J.T., Ponferrada-Marín, M.I., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2013). Early steps of active DNA demethylation initiated by ROS1 glycosylase require three putative helix-invading residues. *Nucleic Acids Res* 41, 8654-8664.

Martínez-Macías, M.I., Qian, W., Miki, D., Pontes, O., Liu, Y., Tang, K., Liu, R., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T., *et al.* (2012). A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Mol Cell*. 45:357-370.

Ponferrada-Marín, M.I., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2012). Demethylation initiated by ROS1 glycosylase involves random sliding along DNA. *Nucleic Acids Res* 40, 11554-11562.

Córdoba-Cañero, D., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R.R. (2011). *Arabidopsis* ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1. *Plant J*. 68: 693-702.

PONENCIA

EPIGENÉTICA Y REPARACIÓN DE ADN

INTRODUCCIÓN

La ruta de Reparación por Escisión de Bases (Base Excision Repair, BER) es esencial para eliminar lesiones frecuentes en el ADN y se ha estudiado con bastante detalle en modelos animales y microbianos, pero no en plantas. Este mecanismo de reparación consta de varias etapas y se inicia por la acción de enzimas denominadas ADN glicosilasas, que eliminan bases dañadas. La reparación se completa con enzimas adicionales que restauran la estructura original del ADN. Durante nuestro estudio de la ruta BER en el organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, hemos identificado varias ADN glicosilasas que eliminan lesiones comunes del genoma de la planta. Además, hemos identificado proteínas que participan en pasos posteriores y son esenciales para completar el proceso de reparación. Por otra parte, también hemos descubierto una familia de ADN glicosilasas específicas de plantas que eliminan 5-meticitosina (5-meC), una marca epigenética que suprime la expresión génica y desempeña un papel clave en el desarrollo y la diferenciación celular. Estas enzimas, que actúan como

desmetilasas, inician una ruta de escisión para borrar la metilación del ADN y no tienen equivalentes en células animales. Nuestros resultados demuestran que las plantas usan la ruta de escisión de bases para proteger su genoma y reprogramar su epigenoma.

OBJETIVOS

- Diseccionar la ruta de reparación por escisión de bases en plantas.
- Caracterizar una familia de desmetilasas que eliminan del ADN una marca epigenética.
- Usar las desmetilasas de plantas para reprogramar el epigenoma de células humanas.

RESULTADOS

La ruta de reparación por escisión de bases en plantas

Para nuestro estudio de la ruta BER en plantas hemos combinado aproximaciones bioquímicas y genéticas. Hemos desarrollado un sistema de reparación *in vitro* para identificar las enzimas que participan en la reparación por escisión de bases en plantas {Córdoba-Cañero, 2009}. En nuestro análisis inicial hemos elegido como lesión modelo el uracilo, que surge en el ADN por desaminación espontánea de la citosina y genera mutaciones. En primer lugar hemos identificado la ADN glicosilasa (AtUNG) que elimina el uracilo del ADN en la planta {Córdoba-Cañero, 2010}. Hemos purificado la proteína recombinante y hemos identificado una línea mutante de *Arabidopsis* portadora de una inserción de T-DNA en el gen *AtUNG*. Las plantas mutantes son morfológicamente normales, pero han perdido la capacidad de reparar uracilo y lo acumulan en su ADN {Córdoba-Cañero, 2010}. Además de AtUNG, hemos identificado y caracterizado una segunda enzima (AtMBD4) con actividad reparadora sobre uracilo y sobre timina incorrectamente apareada con guanina {Ramiro-Merina, 2013}. Por otra parte hemos demostrado que, tras la escisión del uracilo, el sitio abásico resultante es procesado por la endonucleasa ARP {Córdoba-Cañero, 2011 #4014}. Las plantas mutantes en el gen ARP son incapaces de completar la reparación de uracilo, y son sensibles a su derivado 5-fluoruracilo {Córdoba-Cañero, 2011}. Además, hemos descubierto que la ADN ligasa I es la enzima encargada de finalizar el proceso de reparación {Córdoba-Cañero, 2011}.

ADN glicosilasas que borran una marca epigenética

Una de las modificaciones más frecuentes en los genomas de animales y plantas es la metilación del carbono 5 de la citosina, que genera 5-metilcitosina (5-meC). La 5-meC es una marca epigenética reversible que promueve el silenciamiento génico transcripcional y desempeña un papel importante en el control de la diferenciación y la proliferación celular. El trabajo llevado a cabo en *Arabidopsis* por nuestro grupo y por otros laboratorios ha establecido que las células vegetales usan la ruta de reparación por escisión de bases para borrar la metilación de citosinas, en un proceso iniciado por 5-meC ADN glicosilasas de la familia ROS1/DME {Gong, 2002; Morales-Ruiz, 2006; Ortega-Galisteo, 2008}.

Para profundizar en el estudio de la desmetilación activa del ADN, nuestro grupo se ha concentrado en la proteína ROS1 como prototipo de 5-meC ADN glicosilasa. Mediante el análisis bioquímico de su actividad enzimática hemos demostrado es una enzima muy poco procesiva {Ponferrada-Marin, 2009} y que se une de forma no específica al ADN mediante su extremo amino-terminal {Ponferrada-Marin, 2010}. ROS1 y sus homólogos poseen un dominio catalítico discontinuo sin precedentes en otras ADN glicosilasas. Hemos generado un modelo estructural de este dominio catalítico y lo hemos usado para predecir con éxito la localización de aminoácidos implicados en el reconocimiento específico de la 5-meC y la catálisis {Ponferrada-Marín, 2011}. También hemos demostrado que ROS1 se desliza sobre el ADN y que este deslizamiento facilita el reconocimiento y la escisión de la 5-meC {Ponferrada-Marín, 2012}. Hemos demostrado que durante este deslizamiento ROS1 interroga activamente el ADN, y hemos identificado tres residuos de la proteína que se intercalan en la doble hélice y son esenciales para este proceso {Parrilla-Doblas, 2013}.

Tras la escisión de la base, las proteínas de la familia ROS1/DME rompen el sitio abásico resultante, generando un hueco flanqueado por extremos 3'-P y 5'-P. Hemos demostrado que la ADN fosfatasa ZDP actúa a continuación de ROS1, eliminando el grupo 3'-P y permitiendo que una ADN polimerasa inserte una citosina no metilada {Martínez-Macías, 2012}. También hemos demostrado que la proteína XRCC1 participa en varias etapas del proceso de desmetilación: estimulando la actividad de ROS1 y ZDP y facilitando la etapa final de ligación

{Martínez-Macías, 2013}. En la actualidad, estamos analizando el papel de otras proteínas esenciales en la ruta de desmetilación.

Un sistema para la desmetilación del ADN en células humanas

La información disponible sobre los mecanismos de desmetilación en células animales es muy limitada. Nuestro conocimiento cada vez más detallado sobre las 5-meC ADN glicosilasas de plantas plantea la posibilidad de utilizarlas como desmetilasas para revertir el estado de metilación de secuencias diana en células animales. Esta reversión puede tener utilidad en al menos dos aplicaciones concretas: (A) contrarrestar la hipermetilación aberrante de genes supresores de tumor característica de células cancerosas), y (B) superar el obstáculo de una desmetilación insuficiente durante la reprogramación nuclear para generar células pluripotentes. En la actualidad, nuestro grupo está expresando en células normales y tumorales distintas versiones de desmetilasas de *Arabidopsis*, y estamos analizando su efecto sobre el metiloma humano.

REFERENCIAS

1. Córdoba-Cañero, D., Morales-Ruiz, T., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R. R. (2009) *Plant J* 60, 716-728
2. Córdoba-Cañero, D., Dubois, E., Ariza, R. R., Doutriaux, M. P., and Roldan-Arjona, T. (2010) *J Biol Chem* 285, 7475-7483
3. Ramiro-Merina, A., Ariza, R. R., and Roldan-Arjona, T. (2013) *DNA Repair (Amst)* 12, 890-898
4. Córdoba-Cañero, D., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R. R. (2011) *Plant J* 68, 693-702
5. Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldan-Arjona, T., David, L., and Zhu, J. K. (2002) *Cell* 111, 803-814
6. Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A. P., Ponferrada-Marin, M. I., Martínez-Macias, M. I., Ariza, R. R., and Roldan-Arjona, T. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 6853-6858
7. Ortega-Galisteo, A. P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., and Roldan-Arjona, T. (2008) *Plant Mol Biol* 67, 671-681
8. Ponferrada-Marín, M. I., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R. R. (2009) *Nucleic Acids Res* 37, 4264-4274
9. Ponferrada-Marín, M. I., Martínez-Macías, M. I., Morales-Ruiz, T., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R. R. (2010) *J Biol Chem* 285, 23032-23039

10. Ponferrada-Marín, M. I., Parrilla-Doblas, J. T., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R. R. (2011) *Nucleic Acids Res* 39, 1473-1484
11. Ponferrada-Marín, M. I., Roldán-Arjona, T., and Ariza, R. R. (2012) *Nucleic Acids Res* 40, 11554-11562
12. Parrilla-Doblas, J. T., Ponferrada-Marin, M. I., Roldan-Arjona, T., and Ariza, R. R. (2013) *Nucleic Acids Res* 41, 8654-8664
13. Martínez-Macías, M. I., Qian, W., Miki, D., Pontes, O., Liu, Y., Tang, K., Liu, R., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., and Zhu, J. K. (2012) *Mol Cell* 45, 357-370
14. Martinez-Macías, M. I., Cordoba-Cañero, D., Ariza, R. R., and Roldan-Arjona, T. (2013) *J Biol Chem* 288, 5496-5505

Ponencia investigador egresado

TRANSPORTE DE MOLIBDENO EN EUCARIOTAS

Tejada Jiménez, Manuel; Proksch, Lucie; Galván Cejudo, Aurora; Fernández Reyes, Emilio; Schwarz, Guenter; Imperial Ródenas, Juan; González Guerrero, Manuel.

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Universidad Politécnica de Madrid. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid (Spain)

Institute of Biochemistry, Department of Chemistry & Center for Molecular Medicine. Cologne University, Zulpicher Str. 47, 50674 Cologne (Germany)

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, 14071 Córdoba (Spain)

RESUMEN

Prácticamente todos los organismos conocidos necesitan molibdeno para llevar a cabo funciones metabólicas esenciales. El molibdeno es biológicamente activo en forma de cofactor que encuentra como grupo prostético en más de 50 enzimas. Mientras que casi todas las Mo-enzimas contienen molibdeno en forma de un cofactor derivado de pterina, la nitrogenasa tiene un cofactor más complejo que además de molibdeno contiene hierro. La deficiencia de molibdeno conlleva la pérdida de la actividad de todas las Mo-enzimas, que en mamíferos da lugar a un daño cerebral progresivo que lleva a la muerte a las pocas semanas después de nacer. Recientemente se han descrito dos familias de transportadores (MOT1 y MOT2) involucrados en el transporte de molibdeno, en forma de molibdato, en células eucariotas. Mientras que miembros de la familia MOT1 están presentes en algas, hongos y plantas; proteínas pertenecientes a la familia MOT2 se han encontrado también en animales, incluyendo humanos, aunque su funcionalidad como transportadores de molibdato no se ha comprobado en dichos organismos. En este estudio se ha abordado la caracterización de MOT2 como transportador de molibdato en humanos usando como modelo células HEK293 (Human Embryonic Kidney cells), así como la

identificación de nuevas proteínas humanas involucradas en el transporte de molibdeno.

INTRODUCCIÓN

El molibdeno (Mo) es el único metal de transición de la quinta fila de la tabla periódica que ha sido confirmado como un elemento esencial. En seres vivos está presente en bajas concentraciones. Su contenido es de unos 10^5 átomos por célula en microalgas y de alrededor de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ en plantas superiores, mientras que en humanos de unos $0,6 \mu\text{g ml}^{-1}$ en suero, aunque depende de la ingesta diaria.

La importancia de Mo para la vida fue reconocida como tal en 1939 por Arnon y Stout. El descubrimiento de Mo en enzimas como la nitrogenasa, nitrato reductasa o sulfito oxidasa remarcó su papel catalítico. Desde entonces, se han identificado, en todos los reinos de la vida, más de 50 enzimas cuya actividad depende de la presencia de Mo en su centro activo. La mayoría de estas enzimas contienen Mo en forma de un cofactor derivado de pterina llamado cofactor de molibdeno. Sin embargo, en la nitrogenasa Mo está quelado por uno de los centros metálicos más complejos de la naturaleza, el cofactor de hierro-molibdeno.

En todos los organismos estudiados hasta la ahora, la biosíntesis del cofactor de molibdeno es una ruta conservada que se puede dividir en cuatro pasos de acuerdo con los intermediarios biosintéticos formados (Figura 1), i) conversión de GTP en piranopterina cíclica monofosfato (cPMP), ii) síntesis de molibdopterina (MPT), iii) adenilación de MPT, iv) inserción de molibdeno. En eucariotas se han descrito 6 genes involucrados en la ruta de biosíntesis de cofactor de molibdeno, tanto en plantas, hongos como en animales.

El oxoanión molibdato es la única forma conocida de Mo que las células pueden tomar del medio ambiente. El transporte de molibdato es uno de los procesos del metabolismo de molibdeno que más ampliamente se han estudiado y mejor se conocen en bacterias. Sin embargo, en eucariotas el transporte de molibdato al interior celular es un proceso poco conocido ya que los primeros transportadores de molibdato eucariotas (MOT1 y MOT2) se identificaron recientemente.

El transportador MOT1 (Molybdate Transporter, tipo 1) se identificó de manera simultánea en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y en

Arabidopsis. MOT1 tiene especificidad y alta afinidad por molibdato con valores de K_m en el rango nanomolar. Proteínas similares a MOT1 se encuentran, además de en algas y plantas, en hongos y bacterias, pero no en animales.

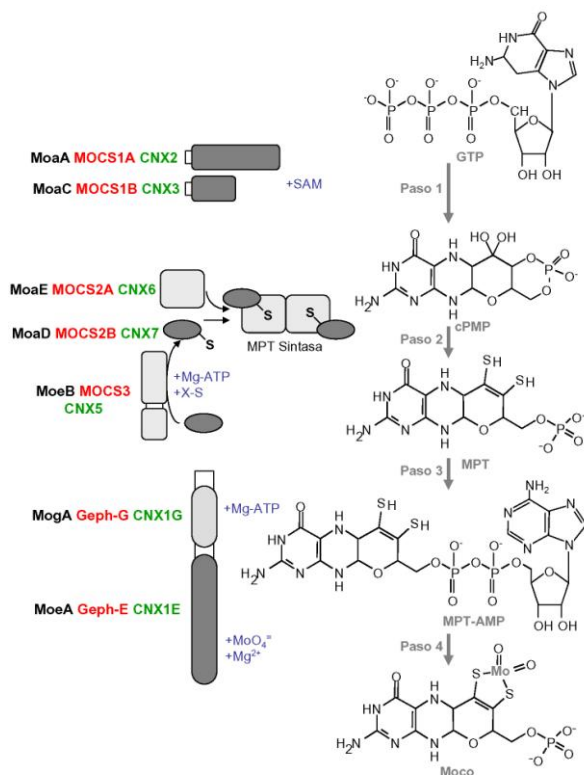


Figura1. Esquema de la ruta de biosíntesis del cofactor de molibdeno en eucariotas. Las proteínas que participan en cada paso están representadas de forma esquemática junto con su nombre en negro para *E. coli*, en rojo para humanos y en verde para plantas. SAM, S-adenosil metionina; X-S, donador de azufre a la MPT-sintasa sulfurilasa.

MOT2 se identificó en *C. reinhardtii* y es también específico de molibdato y de alta afinidad, aunque la constante de Michaelis encontrada para este transportador es más alta que para MOT1 (550 nM vs. 7 nM). Proteínas similares a MOT2 se encuentran en algas, plantas y animales incluidos humanos. Además mediante expresión

heteróloga en levaduras la proteína MOT2 de humanos mostró capacidad de transportar molibdato de manera específica y con alta afinidad presentando un valor de K_m muy similar a MOT2 de *C. reinhardtii*; siendo la primera proteína humana que se relaciona con el transporte de molibdeno.

OBJETIVOS

1. Estudio de la actividad de transporte de molibdato de la proteína humana MOT2.
2. Identificación de MOT3 como nuevo transportador de molibdato en humanos

RESULTADOS

Dos variantes de splicing de MOT2 en humanos están involucrados en transporte de molibdato hacia el interior celular:

- La sobreexpresión de ambas variantes de splicing en células HEK293 llevan a un mayor transporte de molibdato junto con un incremento intracelular de cofactor de molibdeno.
- La transcripción de las dos variantes de splicing de MOT2 está regulada por la disponibilidad de molibdato aunque de maneras distintas.
- Ambas variantes de splicing se localizan en la membrana plasmática.

MOT3 es un transportador de molibdato en células humanas

- La expresión heteróloga de MOT3 en *Saccharomyces cerevisiae* conlleva toxicidad por molibdato.
- La sobreexpresión de MOT3 en células HEK293 lleva a un incremento del transporte de molibdato y, por tanto, a un aumento de la cantidad de cofactor de molibdeno.
- MOT3 está regulado por la disponibilidad de molibdato.
- MOT3 se localiza en la membrana plasmática de células humanas.

REFERENCIAS

Arnon D, Stout P (1939) Molybdenum as an essential element for higher plants. *Plant physiology*. 14:599-602

Tejada-Jiménez M, Llamas A, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E (2007) A high affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:20126-20130

Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E. (2011) Algae and humans share a molybdate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:6420-6425

Tejada-Jiménez M, Chamizo-Ampudia A, Galván A, Fernández E, Llamas Á (2013) Molybdenum metabolism in plants. *Metallomics*. 5:1191-1203

Tomatsu H, Takano J, Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Shibagaki N, Fujiwara T. An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:18807-18812

Ponencia empresa

Cambrix Genomic Institute

COMPONENTES:

PONENTE: José Redondo Nevado

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN

Laboratorio de Biología Molecular.

PONENCIA

ISOGENES Y VARIABILIDAD ALÉLICA EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO HUMANO

RESUMEN

CAMBRIX Genomic Institute S.A. es una joven compañía dedicada a la aplicación de las técnicas de Biología Molecular al diagnóstico médico en humanos.

En ciertos casos, el análisis genético se basa en la secuenciación de regiones de interés (exones, zonas reguladoras) de genes candidatos a presentar variaciones que den cuenta de la sintomatología clínica y sirvan para concretar el diagnóstico.

En otros casos el objetivo es la identificación de variedades alélicas en genes relacionados con el metabolismo de los fármacos o con la capacidad para identificar moléculas como alérgenos. El conocimiento de la presencia de determinadas variantes alélicas puede ser de utilidad a la hora de tomar decisiones en cuanto a la prescripción de la dosis de un determinado fármaco. Así mismo, este conocimiento permite descartar la predisposición a sufrir algunas intolerancias alimentarias.

La presencia de isogenes y el análisis de genes con alta variabilidad alélica suponen una dificultad añadida a la hora de realizar este tipo de análisis.

En la presente ponencia se trata de ilustrar, mediante algunos ejemplos prácticos, la metodología a utilizar para solventar dichas dificultades.

REFERENCIAS

Takashi Matsukawa, Muriel Asheuer, Yuji Takahashi, Jun Goto, Yasuyuki Suzuki, Nobuyuki Shimosawa, Hiroki Takano, Osamu Onodera, Masatoyo Nishizawa, Patrick Aubourg, Shoji Tsuji. (2011) Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics*. 12:41–50

Y.W.A. Jeske, I.N. McGown, M. Harris, KG. Bowling. C.S.Y. Choong, D.M. Copley, A.M. Cotterill. (2009) 21-Hydroxylase Genotyping in Australasian Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*. 22: 127-141

Audrey Sabbagh, Pierre Darlu (2006) Data-Mining Methods as Useful Tools for Predicting Individual Drug Response: Application to CYP2D6 Data. *Hum Heredity*. 62:119–134

Alienke J. Monsuur, Paul I. W. de Bakker, Alexandra Zhernakova, Dalila Pinto, Willem Verduijn, Jihane Romanos, Renata Auricchio, Ana Lopez, David A. van Heel, J. Bart A. Crusius, Cisca Wijmenga (2008) Effective Detection of Human Leukocyte Antigen Risk Alleles in Celiac Disease Using Tag Single Nucleotide Polymorphisms. *PLoS ONE*. 10.1371/journal.pone.0002270

SERVICIO DE PROTECCIÓN AMBIENTAL-SEPA

SERVICIO DE PROTECCIÓN AMBIENTAL (SEPA). UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

COMPONENTES:

RESPONSABLE: Vaquero Abellán, Manuel mvaquero@uco.es

Gomera Martínez, Antonio agomera@uco.es
 De Toro Jordano, Ana atoro@uco.es
 Aguilar Moreno, José Emilio emilio.aguilar@uco.es
 Guijarro Jiménez, Clara cguijarro@uco.es
 Antúnez López, Miguel malabbadon@hotmail.com

DEPARTAMENTO E INSTITUCIÓN:

Servicio de Protección Ambiental – SEPA. Universidad de Córdoba.
 Campus de Rabanales. Colonia San José, Casa nº 4. 14014-Córdoba.

FUNCIONES Y SERVICIOS PRESTADOS:

1. AMBITO DE ASESORAMIENTO AMBIENTAL

- Participación o intervención en las actuaciones, actividades y proyectos desarrollados en el ámbito de la Universidad que puedan afectar a sus condiciones, recursos y componentes ambientales con objeto de prevenir o minimizar el posible impacto negativo de tales actuaciones.
- Identificación de requisitos legales de la Universidad de Córdoba e información de ellos a las funciones responsables de su cumplimiento.
- Seguimiento de los aspectos ambientales asociados a las actividades e instalaciones de la Universidad, detección de los más significativos y propuesta de actuaciones dirigidas a minimizar su impacto ambiental.
- Asesoramiento a la comunidad universitaria, y especialmente a los órganos, Instituciones y servicios universitarios, en las cuestiones relacionadas con el medio ambiente.

- Realización de estudios e informes ambientales en el marco de la comunidad universitaria o fuera de ella.
- Apoyo y coordinación en la implantación de sistemas de gestión ambiental en Centros, Departamentos, Áreas y Servicios de la Universidad.
- Introducción de criterios ambientales en la contratación por parte de la Universidad de proveedores de bienes, obras y servicios así como el seguimiento ambiental de los mismos.

2. AMBITO DE FORMACIÓN, INFORMACIÓN Y SENSIBILIZACIÓN AMBIENTAL

- Planificación, organización y promoción de actividades y eventos que tengan como objetivo la formación, información y sensibilización ambiental de la comunidad universitaria.
- Promoción y coordinación de actividades encaminadas a la preservación de los recursos naturales en la Universidad.
- Desarrollo de acciones que potencien el proceso de sostenibilización curricular, el voluntariado ambiental universitario y la investigación ambiental en la Universidad.
- Recepción de sugerencias de la comunidad universitaria en temas relacionados con el medio ambiente universitario.
- Establecimiento de cauces de comunicación y colaboración con administraciones y entidades a través de sus órganos ambientales competentes.

3. AMBITO DE GESTIÓN DE RESIDUOS

- Promoción de estrategias de recogida selectiva de residuos.
- Gestión de los residuos peligrosos producidos en la Universidad.

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES:

De Toro Jordano, A., Gomera Martínez A., Aguilar Moreno, J. E., Guijarro Jiménez, C., Vaquero Abellán, M. (2011). *Una Década de Protección Ambiental en la Universidad de Córdoba*. Córdoba: Servicio de Protección Ambiental, Universidad de Córdoba.

Gomera Martínez A., Vaquero Abellán M., de Toro Jordano A., Aguilar Moreno J. E., Guijarro Jiménez C (2011). Environmental Management and Education at the University of Cordoba. *Ecology and Noospherology*. 22: 127-131.

Gomera Martínez A. (Coord.), Vaquero Abellán, M., Galán Soldevilla, C., Gaju Ricart, M., Herrera Machuca, M.A., Fernández Haeger, J. (2007). *101 especies en el Campus de Rabanales: Inventario fungi/flora/fauna*. Córdoba: Zumaya Ambiente Creativo.

De Toro Jordano, A., Gomera Martínez A., Castaño Fuentes, J. P. (2003). *Guía de Buenas Prácticas Ambientales para PYMES cordobesas: sector papelería, copistería, fotografía e informática*. Córdoba: Fundación Biodiversidad, Universidad de Córdoba.

Gomera Martínez, A., Castaño Fuentes, J. P., Vaquero Abellán, M. (2003). *Manual de prevención de riesgos y salud laboral en los laboratorios universitarios*. Córdoba: SEPA.

PONENCIA:

GESTIÓN Y MINIMIZACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS EN LOS LABORATORIOS UNIVERSITARIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR, GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA.

RESUMEN

En el laboratorio universitario se manejan gran cantidad de productos y se efectúan diversas operaciones que conllevan la generación de residuos, en la mayoría de los casos peligrosos para la salud y el medio ambiente. Se debe garantizar su correcta gestión, tanto por la obligatoriedad legal y la especial peligrosidad de algunos de ellos, como por el entorno educativo y de excelencia en el que se enmarca la Universidad.

La Universidad de Córdoba, a través de su Servicio de Protección Ambiental (SEPA), ha desarrollado un procedimiento específico y normalizado de gestión de los residuos peligrosos en los laboratorios universitarios, que incluye un estudio detallado de las actividades para seleccionar los envases más adecuados, una clasificación, etiquetado y llenado de los mismos, así como un almacenamiento temporal en

condiciones de seguridad hasta su retirada definitiva por parte de una empresa gestora de este tipo de residuos.

Es asimismo necesario, tanto por razones de medioambientales como económicas, que se contemplen las posibilidades de minimización de los residuos, procurando sustituir, reutilizar o reciclar productos cuando sea posible, así como optimizando la gestión de compras, la utilización de envases y la identificación y segregación de residuos.

Los laboratorios universitarios de las áreas de Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología suponen en torno al 30% de las unidades productoras de residuos peligrosos en la Universidad de Córdoba y producen aproximadamente el 40% del total de residuos. Este hecho hace especialmente relevante la necesidad de una óptima gestión de los mismos. Los principales tipos son:

- Residuos biosanitarios (restos y cultivos celulares, sangre y hemoderivados, material cortante o punzante): suponen un 29% de los residuos originados.
- Reactivos de laboratorio (mezclas de residuos de distintos grupos o residuos desconocidos) y material contaminado con productos químicos (papel, guantes, puntas, etc.): 21%.
- Residuos sólidos y líquidos de bromuro de etidio: 20%.
- Disolventes orgánicos (halogenados y no halogenados): 10%.
- Envases vacíos de vidrio y plástico: 8%.
- Sales y soluciones (amonio, cianuro, cromo, de revelado, etc.): 8%.
- Otros: ácidos, bases, aceites minerales, etc.: 2%.

Estos residuos ofrecen unas enormes posibilidades de minimización. De este modo, desde 2011 se están realizando visitas personalizadas a todos los laboratorios, así como acciones formativas e informativas que están posibilitando una reducción en la magnitud y peligrosidad de los diferentes tipos de residuos. En especial se están logrando excelentes resultados minimizando los residuos biosanitarios, los reactivos de laboratorio y los envases vacíos. La disminución de producción de bromuro de etidio es uno de los grandes retos pendientes, aunque progresivamente se están incorporando alternativas a través de su sustitución por otros compuestos inocuos y con su misma función.

REFERENCIAS

Bultó Nubiola, M., Guardino Solá, X., Heras Cobo, C. (1992). *Seguridad y Condiciones de Trabajo en el Laboratorio*. Barcelona: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

De Toro Jordano, A., Gomera Martínez A., Aguilar Moreno, J. E., Guijarro Jiménez, C., Vaquero Abellán, M. (2011). *Una Década de Protección Ambiental en la Universidad de Córdoba*. Córdoba: Servicio de Protección Ambiental, Universidad de Córdoba.

Gomera Martínez, A., Castaño Fuentes, J. P., Vaquero Abellán, M. (2003). *Manual de prevención de riesgos y salud laboral en los laboratorios universitarios*. Córdoba: SEPA.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. *Nota Técnica de Prevención 838: Gestión de residuos sanitarios*. Madrid: INSHT.

Universidad de Córdoba. Servicio de Protección Ambiental (2010). *Procedimiento de gestión de residuos*. Córdoba.

Universidad de Córdoba. Servicio de Protección Ambiental (2010). *Instrucción Técnica de gestión de residuos de laboratorio*. Córdoba.

Universidad de Córdoba. Servicio de Protección Ambiental (2013). *Informe de producción y minimización de residuos*. Córdoba.

Conferencia de Clausura

EL PAPEL DE LOS TELÓMEROS EN LA ENFERMEDAD

María Blasco Marhuenda

Directora del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas – CNIO

Jefa del grupo de Telómeros y Telomerasa del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas - CNIO

Durante los últimos diez años nuestro laboratorio ha contribuido a analizar minuciosamente el papel de la telomerasa y de la longitud de los telómeros como vías moleculares subyacentes al cáncer y al envejecimiento, así como ha liderado el uso potencial de la activación de la telomerasa como una estrategia terapéutica para síndromes de telómeros y enfermedades relacionadas con la edad (Blasco et al., *Cell*, 1997; Tomás-Loba, *Cell*, 2008). Más recientemente hemos desarrollado una terapia génica basada en telomerasa que permite la activación de la telomerasa en organismos adultos y que ha mostrado efectos beneficiosos en ratones en una variedad de patologías relacionadas con la edad (Bernardes de Jesus et al., *EMBO Molecular Medicine*, 2012). Presentaré hallazgos recientes que muestran la eficacia de esta terapia génica de telomerasa en diferentes modelos de enfermedad en ratones.

