

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOMEDICINA EXPERIMENTAL

PROPUESTAS DE LÍNEAS DE TFM

CURSO 2020-2021

TRABAJOS EXPERIMENTALES

-Título: **Generación y caracterización de línea transgénica de un biosensor fluorescente en el corazón del pez cebra.**

Directores: Beatriz Domingo Moreno y Juan F. Llopis Borrás.

-Título: **Respuesta cuantitativa de la formación del hipocampo en la enfermedad de Alzheimer. Evaluación estereológica neuronal.**

Tutor/es: Emilio Artacho Pérula y José Carlos Delgado González.

-Título: **Papel de las proteínas NOTCH y sus ligandos en la activación del macrófago y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria**

Tutor/es: Eva María Monsalve Argandoña y José Javier García Ramírez.

-Título: **Uso de PROTACs para revertir la resistencia intrínseca y adquirida a fármacos antitumorales en cáncer de mama y ovario**

Tutor/es: Eva M^a Galán Moya (EvaMaria.Galan@uclm.es)

Resumen: Los tumores se encuentran alojados en nichos específicos, que se denomina microambiente tumoral, que proporcionan un colchón protector contra las agresiones externas, y, por tanto, los protegen ante el tratamiento con compuestos quimioterápicos. Romper la comunicación entre las células tumorales y el microambiente que las rodea, es crucial para sensibilizar los tumores. Para ello, usaremos un modelo de microambiente tumoral generado a partir de células de pacientes de cáncer de mama y ovario.

Por otro lado, los pacientes oncológicos tienden a desarrollar resistencias a los tratamientos quimioterápicos. En este estudio se evaluarán diversos compuestos con capacidad potencial para revertir esta resistencia adquirida a los tratamientos quimioterápicos actuales. Para ello, mediante cultivo continuado se han generado líneas de cáncer de mama y ovario resistentes a varios quimioterápicos de uso habitual en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama triple negativo.

Tanto sobre el modelo de microambiente como sobre los modelos con resistencia adquirida, se testará el efecto de nuevos fármacos e inhibidores de rutas de señalización. Su efecto sobre las células tumorales se evaluará mediante ensayos de proliferación, citometría de flujo,

supervivencia, formación de colonias en 2D y 3D y el estudio de rutas de señalización mediante la técnica del Western Blot.

-Título: **Interacciones sinérgicas de inhibidores de quinasas contra proteínas de señalización en cáncer**

Tutor/es: Alberto Ocaña Fernández (Alberto.Ocana@uclm.es o EvaMaria.Galan@uclm.es) y

Resumen: Los pacientes oncológicos tienden a desarrollar resistencias a los tratamientos quimioterápicos, lo que hace necesario buscar nuevas estrategias para tratar los tumores. En este estudio se evaluarán combinaciones de diversos compuestos quimioterápicos actuales para buscar efectos sinérgicos que puedan potenciar su función. El efecto de las combinaciones sobre las células tumorales se evaluará mediante ensayos de proliferación, supervivencia, formación de colonias en 2D y 3D y el estudio de rutas de señalización mediante la técnica del Western Blot.

- Título: **Estudio de la MAPK/ERK5 en cáncer y su terapia.**

Directores: Ricardo Sánchez Prieto/ Maria José Ruiz Hidalgo.

Resumen: en este trabajo el alumno se centrará en evaluar los efectos que puede tener la ausencia o hiperactividad de la MAPK ERK5 en modelos celulares tumorales. Para ello, mediante el uso de abordajes genéticos y químicos, evaluará los efectos de ERK5 en cáncer y en la respuesta a distintos tratamientos. Durante el TFM el alumno se familiarizará con las siguientes técnicas de laboratorio: cultivo celular, transfecciones, medidas de viabilidad (MTT y cristal violeta), citometría (ciclo celular por ioduro de propidio, apoptosis), uso de vectores lentivirales, técnicas de bioquímica de proteínas (western blot e inmuno-citoquímica) y RT-PCR cuantitativa.

- Título: **Papel de los receptores NOTCH en la diferenciación osteogénica de la línea celular MC3T3-E1.**

Tutor/es: María Luisa Nueda Sanz y Victoriano Baladrón García.

Resumen: Se evaluará el papel que tiene cada uno de los cuatro receptores NOTCH en el proceso de diferenciación osteogénica de la línea celular preosteoblástica MC3T3-E1. Se analizará el efecto de la sobre-expresión y de la disminución de la expresión de estas proteínas sobre este proceso de diferenciación celular mediante una tinción específica de los cultivos y el análisis de marcadores de diferenciación osteogénica, así como el efecto sobre las rutas de señalización celular implicadas en este proceso. El alumno aprenderá a manejar: cultivo de líneas celulares, tinción celular de la actividad fosfatasa alcalina y de Alizarin Red, uso de vectores de expresión proteica y shRNAs, extracción de ácidos nucleicos y proteínas, técnica de Western blot, anticuerpos y PCR cuantitativa.

- Título: **Interacciones virus-célula en el control de la replicación viral.**

Tutor/es: Armando Arias Esteban y Antonio Mas López.

Resumen: los virus son patógenos intracelulares obligados. Para llevar a cabo una infección exitosa y producir nueva progenie viral son necesarias una serie de interacciones entre las proteínas del virus y proteínas de la célula que complementan el ciclo vital del virus. Esto ha estimulado un interés creciente en identificar estas proteínas celulares como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades causadas por virus. La enzima encargada de la replicación de los virus que tienen un genoma RNA es una RNA polimerasa dependiente de RNA. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de las polimerasas de virus RNA transmitidos por mosquitos (Zika y Usutu). Tenemos datos preliminares en los que hemos identificado al menos 10 proteínas celulares que interaccionan con la polimerasa del virus Zika. En este estudio proponemos investigar la interacción de la polimerasa de los virus Zika y Usutu con algunas de estas proteínas. El plan específico es:

- confirmar la interacción entre polimerasa viral y proteína celular (técnicas de inmunoprecipitación y Western blot)
- identificar los residuos en la polimerasa y en la proteína celular que contribuyen a dicha unión (mutagénesis dirigida e inmunoprecipitación)
- investigar si la inactivación de la proteína celular inhibe la infección viral (tratamiento con fármacos dirigidos a la proteína celular y/o técnicas de inhibición de la expresión celular mediante RNA interferente).

-Título: Estudios sobre el papel de proteínas de la pared celular en el establecimiento de infecciones causadas por hongos patógeno humano del género Candida.

Tutor/es: Dr. Piet de Groot (piet.degroot@uclm.es), Laboratorio de Micología Molecular.

Resumen: Las infecciones fúngicas son una causa frecuente de infección en humanos, especialmente las causadas por levaduras del género Candida, como C. albicans, C. glabrata y C. auris. En pacientes inmunocomprometidos, Candida puede causar infecciones sistémicas que ponen en riesgo la vida del paciente y son difíciles de diagnosticar y tratar. Por tanto, el desarrollo de antifúngicos más efectivos y de nuevas estrategias terapéuticas es necesario y urgente. El grupo de Micología Molecular pretende obtener un mayor conocimiento de los procesos moleculares que permiten el establecimiento de infecciones fúngicas en humanos. La pared celular de Candida es una diana importante en el desarrollo de nuevos antifúngicos por ser la superficie de contacto entre hongo y hospedador. En este proyecto, nos centraremos en el papel que juegan las proteínas de la pared en las interacciones entre huésped y patógeno que preceden al establecimiento de la infección. **Objetivo:** Hemos identificado proteínas de la pared celular de C. glabrata y C. auris. El objetivo en este proyecto es estudiar la función de estas proteínas en el proceso de infección mediante la creación y caracterización de mutantes de delección, y/o clonaje, expresión y purificación de dominios importantes de estas proteínas para su posterior caracterización funcional y estructural. **Metodología:** Los mutantes se obtienen mediante PCR, clonajes y transformaciones en Candida utilizando el nuevo método CRISPR-Cas9. La caracterización de los mutantes se realiza con ensayos fenotípicos, por ejemplo, pruebas de adhesividad, formación de biopelículas, sensibilidad a antifúngicos y un análisis bioquímico de la composición de la pared celular. Por otro lado, por medio de clonajes se expresarán en E. coli los dominios importantes de estas proteínas, para realizar experimentos de purificación con el objetivo de obtener suficiente proteína pura para poder realizar pruebas de caracterización funcional y estudios estructurales avanzados. Otro objetivo en nuestro estudio es la

identificación de más proteínas relevantes, clínicamente hablando, mediante estudios proteómicos. Dependiendo de los intereses del estudiante, el proyecto puede enfocarse desde el punto de vista de la biología celular, biología molecular o de la bioquímica. Las técnicas utilizadas en este proyecto incluyen PCR, técnicas de clonaje, cultivos de *Candida*, transformación de *E. coli* y *Candida* (con CRISPR-Cas9), pruebas de adhesividad, SDS-PAGE, Western e inmunoblotting, aislamiento de pared celular, técnicas de microscopía y purificación de proteínas.

-Título: Estudio funcional de variantes de significado incierto detectadas mediante secuenciación masiva en pacientes pediátricos con Enfermedades Genéticas Minoritarias

Tutor/es: M^a Pilar López Garrido (C.R.) y Francisco Sánchez Sánchez (AB)

Resumen: Las Enfermedades Raras son un grupo heterogéneo de patologías graves que tienen una baja frecuencia en la población. Sin embargo, en su conjunto, representan el 7% de la población mundial. En España están afectados 3 millones de personas, la mayoría en edad pediátrica. Normalmente se trata de enfermedades monogénicas donde en la mayor parte de los casos es necesario un laborioso estudio genético que identifique el gen causante de la enfermedad, ya que clínicamente son pacientes de difícil diagnóstico. En estos últimos años, las nuevas técnicas de secuenciación masiva (next-generation sequencing) se están implantando a nivel asistencial. La secuenciación de exomas y de paneles de genes está permitiendo resolver casos clínicos de manera rápida y eficaz. Sin embargo, el nuevo reto al que nos enfrentamos al utilizar este tipo de técnicas es el de los hallazgos accidentales, es decir, variantes genéticas potencialmente patogénicas que a priori no correlacionan con la clínica del cuadro familiar. Por tanto, es necesario averiguar el papel que desempeñan estas variantes de significado incierto para ofrecer un adecuado diagnóstico y asesoramiento genético a las familias afectadas. Para ello, se llevarán a cabo una serie de análisis (segregación familiar, análisis funcional de proteínas mutantes, relación genotipo-fenotipo...) mediante técnicas de genética y biología molecular para determinar el grado de patogenicidad de las variantes encontradas y establecer su relación con los casos familiares, y poder ofrecer un adecuado asesoramiento genético al paciente y su familia.

- Título: Caracterización funcional de genes candidatos de glaucoma congénito en un modelo de pez cebra.

Tutor/es: José Daniel Aroca Aguilar (JoseDaniel.Aroca@uclm.es)

Laboratorio: Genética Molecular Humana, IDINE (Facultad de Medicina de Albacete)

Resumen: Mutaciones en diversos genes como *CYP1B1*, *GPATCH3* y *FOXC1* participan en la aparición de glaucoma congénito primario, aunque dos tercios de la base genética de esta patología es aún desconocida. Las tecnologías de secuenciación masiva permiten la identificación de nuevos genes candidatos en las familias afectadas. El pez cebra es un modelo animal ampliamente utilizado en la caracterización funcional de genes mediante el análisis del patrón de expresión y la inhibición selectiva de expresión génica mediante el establecimiento de líneas knock-out. El alumno participará en el establecimiento de líneas knock-out y en el

análisis funcional de genes candidatos de glaucoma congénito en larvas y adultos de pez cebra mediante: i) el análisis de su expresión en peces silvestres utilizando técnicas inmunohistoquímicas y microscopía confocal; y ii) la caracterización de los fenotipos resultantes de la inhibición de su expresión utilizando las líneas *knock-out* obtenidas mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Para este último objetivo se utilizarán también líneas *reporter* fluorescentes de genes relacionados con el desarrollo ocular como *sox10*, *vsx2* y *atoh10*.

-Título: **Mecanismos que subyacen a la hiperexcitabilidad neural en la enfermedad de Alzheimer** (*hasta 2 alumnos en esta línea*)

Tutor/es: Lydia Jiménez Díaz y Juan de Dios Navarro López (Tutor: Alberto Nájera López). Laboratorio de Neurofisiología y Comportamiento, CRIB, Facultad de Medicina de Ciudad Real.

-Título: **Análisis de señales bioeléctricas en modelos murinos *in vivo* e *in vitro*** (*hasta 1 alumno en esta línea*)

Tutor/es: Alberto Nájera López, Juan de Dios Navarro López, Lydia Jiménez Díaz. Laboratorio de Neurofisiología y Comportamiento, CRIB, Facultad de Medicina de Ciudad Real.

Resumen: Nuestro laboratorio se centra en la comprensión de los procesos neuronales subyacentes a la disfunción cognitiva en la enfermedad de Alzheimer (AD). Basándonos en el hallazgo de que la hiperexcitabilidad está presente en los estadios asintomáticos de la enfermedad, pretendemos explorar manipulaciones farmacológicas para actuar sobre declive cognitivo en la AD. Para ello estudiamos el hipocampo (estructura fundamental para llevar a cabo procesos de aprendizaje y memoria, y una de las primeras regiones afectadas por las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer) y otras regiones corticales, a distintos niveles de complejidad, en concreto a nivel molecular, celular, de circuito, redes neuronales y de comportamiento. Nuestro abordaje multidisciplinar incluye manipulaciones *in vivo*, pruebas de comportamiento dependientes de aprendizaje, registros electroencefalográficos (EEG) a largo plazo, fisiología en rodajas de tejido nervioso *in vitro*, inmunohistoquímica, PCR cuantitativa y western blots.

-Título: **Implicación del colesterol en neurodegeneración y/o neuroprotección.**

Tutor/es: José Luis Albasanz y Alejandro Sánchez Melgar.

Resumen: Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de patologías caracterizadas por una importante degeneración y muerte neuronal, cuyo máximo representante es la Enfermedad de Alzheimer (EA). Todas estas enfermedades tienen en común la presencia de proteínas anormalmente acumuladas dentro y fuera de las neuronas, responsables de la neurodegeneración. Por otro lado, existen moléculas que presentan un papel neuroprotector como algunos nucleósidos endógenos, tales como la adenosina, o algunas exógenas como los polifenoles. En los procesos de neurodegeneración y neuroprotección están implicadas las vías de señalización celular, fundamentalmente las mediadas por la adenosina o el glutamato. Sin embargo, se conoce mucho menos el papel que desempeña en tales procesos el colesterol, el cual se ha estudiado mucho a nivel cardiovascular. Nuestro grupo ha descrito que los receptores

de adenosina y los metabotrópicos de glutamato se encuentran afectados en el cerebro postmortem y en modelos animales de EA. También hemos descrito que aquellos receptores de adenosina que están afectados en la EA son capaces de reconocer y unir el colesterol que se encuentra presente en las membranas celulares. Por ello, el objetivo primordial del presente trabajo es dilucidar el papel que puede desempeñar el colesterol y lípidos relacionados en los procesos de neurodegeneración y/o neuroprotección característicos de enfermedades neurodegenerativas. El estudio se llevará a cabo fundamentalmente usando cultivos celulares que serán sometidos a diferentes agentes neurotóxicos o neuroprotectores, y se analizará el papel del colesterol en los mecanismos implicados mediante técnicas de Bioquímica y Biología Molecular.

-Título: **Nuevas dianas diagnósticas y terapéuticas para el hígado graso no alcohólico (NASH).**

Tutor/es: Óscar Gómez Torres

Trabajo con hepatocitos en cultivo. El estudiante aprenderá al manejo de líneas celulares y cultivos primarios de hepatocitos de roedor, en un modelo experimental de hígado graso. Entre otras técnicas se empleará Western blot, técnicas de transfección, citometría de flujo, inmunocitoquímica, PCR.

-Título: **Aplicación de siRNA en el tratamiento de GBM**

Tutor/es: Valentín Ceña/Inmaculada Posadas.

-Título: **Determinación del potencial anticancerígeno de nuevos fármacos experimentales en tumores ginecológicos.**

Tutor/es: Francisco José Cimas Felipe

Resumen: Este proyecto consiste en la caracterización del efecto antitumoral de nuevos fármacos experimentales en tumores de mama y ovario principalmente. El alumno podrá comprobar el efecto de un nuevo fármaco en distintos fenómenos biológicos clave para el desarrollo tumoral, como la proliferación, la regulación del ciclo celular, la evaluación del mecanismo de muerte celular o la capacidad de metastatizar y formar colonias. Para ello se familiarizará con el trabajo con líneas tumorales humanas en el laboratorio de cultivos celulares y con técnicas como la evaluación de viabilidad celular por MTT, citometría de flujo o western blot; así como con el manejo de bases de datos bioinformáticas para caracterizar las líneas celulares usadas.

- Título: **Identificación de proliferación neuronal en cerebros humanos adultos.**

- Tutor/es: **Carlos de la Rosa Prieto (Carlos.delarosa@uclm.es)**

Resumen: En mamíferos inferiores, la formación de nuevas neuronas durante la vida adulta es un hecho constatado que tiene lugar en determinadas zonas del cerebro, como la **zona subventricular (que migran hacia los bulbos olfativos)** y la zona subgranular del giro dentado del **hipocampo**. Este proceso, denominado neurogénesis adulta, ayuda a mantener ciertas funciones del cerebro implicadas en la memoria y orientación espacial, así como el sentido del olfato, debido en parte a la alta tasa de generación de nuevas neuronas. No obstante, en el ser humano, el estudio de este proceso está generando cierta controversia. Los últimos estudios sugieren que hay generación de células en el **hipocampo**, implicado en procesos como la memoria, pero que decaen drásticamente durante la infancia. Otros estudios recientes apoyan la teoría de que la generación neuronal en esta zona es importante cuantitativamente y además está presente durante toda la edad adulta. Sin embargo, en relación a la **zona subventricular y el sistema olfativo** humano no existen muchos datos hasta la fecha. La presente propuesta de Trabajo Fin de Grado pretende estudiar los bulbos olfativos sus cintillas olfativas en tejido humano procedente de casos de diferentes edades, durante las diferentes etapas de la edad adulta. El material se seccionará en microtomo de congelación y se realizarán técnicas de inmunofluorescencia para marcar las diferentes poblaciones celulares (astrocitos, oligodendrocitos, neuronas jóvenes), células madre, neuroblastos en migración, envueltas de mielina así como la distribución de vasos sanguíneos en estas estructuras. Con ello se pretende realizar un estudio detallado de la región e identificar las posibles rutas migratorias de los neuroblastos generados en la zona subventricular. Los resultados serán susceptibles de constituir una comunicación a congreso y/o una publicación.

TRABAJOS QUE PUEDEN SER EXPERIMENTALES O BIBLIOGRÁFICOS

-Título: **Caracterización de la exposición personal a ondas electromagnéticas de radiofrecuencia, efectos sobre la salud, hipersensibilidad o percepción de la salud.**

Tutor/es: Alberto Nájera López (Alberto.Najera@uclm.es)

Laboratorio: CRIB (Facultad de Medicina de Albacete).

Resumen: Se proponen diferentes opciones: la realización de medidas con exposímetros personales de ondas de radiofrecuencia (de FM a WiFi Max, un total de 14 bandas de frecuencia) en zonas donde la presencia de una antena de telefonía móvil haya generado alarma social, utilizar encuestas/test de percepción de riesgo y estado de salud con el fin de determinar diferencias significativas y factores que puedan influir en cambios en la percepción de la Salud, también se ofrece la posibilidad de realizar diferentes enfoques del problema: geoestadística (análisis de patrones espaciales, estadística en 2D), hipersensibilidad electromagnética, efectos sobre la salud, etc.

TRABAJOS BIBLIOGRÁFICOS

Título: **Autofagia en enfermedades neurodegenerativas.**

Tutor/es: Joaquín Jordán y María Francisca Galindo.

Resumen: Las células responden a señales de daño celular mediante la activación de rutas de señalización que engloban desde señales protectoras a las de muerte celular. Conocer las diferentes vías de señalización de estos procesos permitiría poder diseñar fármacos moduladores que inclinen la balanza hacia un lado o a otro. Dentro de ello se encuentra la autofagia, una cascada de señalización clave en la retirada de organelas dañadas o de proteínas mal plegadas. Este trabajo fin de máster se versará sobre la realización de una revisión sistemática de la literatura científica con el fin de analizar diferentes rutas celulares dentro de los procesos de autofagia en enfermedades neurodegenerativas.

- **Título:** **Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento cerebral.**

Tutor/as: Mar Arroyo y Pilar Marcos.

Resumen: El elevado ritmo metabólico del cerebro produce la generación de gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son perjudiciales para las neuronas. Los antioxidantes ejercen un efecto neuroprotector al neutralizar las ROS, de manera que existe un equilibrio entre los procesos de oxidación y la acción de los antioxidantes. A lo largo de la edad este equilibrio se pierde y se produce una mayor acumulación de ROS que, junto con otras alteraciones, contribuye a la muerte neuronal. Existen varios estudios realizados en población anciana acerca de los efectos que puede tener la administración de diferentes compuestos antioxidantes en las funciones cerebrales. Proponemos elaborar una revisión bibliográfica acerca de este tema en la que se valore la situación actual de los estudios realizados hasta la fecha y las principales conclusiones que se derivan de los mismos.

- **Título:** **Enfermedad del Alzheimer: Papel de la glia en el desarrollo de esta patología**

Tutor/es: Dra. Verónica Fuentes Santamaría (veronica.fuentes@uclm.es) y Dr. Juan Carlos Alvarado (juancarlos.alvarado@uclm.es). Laboratorio de Histología, IDINE (Facultad de Medicina de Albacete)

Resumen: Se pretende realizar una revisión exhaustiva de la situación actual de esta enfermedad neurodegenerativa. Específicamente, nos centraremos en determinar el papel que desempeñan las células gliales en la etiopatogenia de esta enfermedad y evaluaremos las posibles estrategias terapéuticas sobre estos tipos celulares para limitar la progresión de esta patología.

-**Título:** **Tratamientos coadyuvantes para la hipoacusia asociada con la edad (presbiacusia): ¿Son realmente útiles?**

Tutor/es: Dr. Juan Carlos Alvarado (juancarlos.alvarado@uclm.es) y Dra. Verónica Fuentes Santamaría (veronica.fuentes@uclm.es). Laboratorio de Histología, IDINE (Facultad de Medicina de Albacete)

Resumen: Considerando que la presbiacusia es la discapacidad sensorial más común a nivel mundial y que no existe actualmente ningún tratamiento médico curativo, se ha implementado una serie de tratamientos coadyuvantes para tratar de retrasar su inicio o de conservar la audición residual en caso de que se haya iniciado. En esta revisión, se pretende evaluar la utilidad real de los tratamientos coadyuvantes actualmente disponibles tanto a nivel experimental como en el mercado para valorar su real utilidad para el tratamiento de la presbiacusia.