

MÁSTER EN BIOMEDICINA EXPERIMENTAL  
PROPUESTA DE LÍNEAS DE TFM-CURSO 2021-2022

**-Trabajos experimentales:**

**.TÍTULO: Estudio de la función de los receptores Notch en los macrófagos asociados a tumores.**

Tutores: Susana López López y M<sup>a</sup> José Martínez Díaz-Guerra

Breve resumen del trabajo a realizar: Los macrófagos son células del sistema inmune innato capaces de infiltrarse en los tumores con el fin de eliminarlos, se les denomina entonces macrófagos asociados a tumores (TAMs). Los tumores en crecimiento contienen muchas células que mueren y emiten señales de daño celular que favorecen el reclutamiento de macrófagos proinflamatorios y citotóxicos. Sin embargo, la célula tumoral consigue en muchas ocasiones cambiar el fenotipo de estos macrófagos disminuyendo su actividad citotóxica y favoreciendo un fenotipo regenerador y pro-angiogénico que favorece el crecimiento tumoral y la resistencia a la quimioterapia, de forma que la presencia de macrófagos en los tumores se asocia con alto grado de malignidad del tumor. Los mecanismos que conducen a los TAMs a ejercer una actividad protumoral no están todavía completamente establecidos. La familia de receptores Notch es importante en la diferenciación proinflamatoria y citotóxica de los macrófagos, queremos analizar si alguno de sus miembros puede estar implicado en la transformación de los macrófagos asociados a tumores o si tiene un papel determinante en el dialogo que se establece entre las células cancerosas y los TAMs.

Para analizar este proceso se realizarán cultivos de macrófagos murinos y cocultivos de macrófagos con células tumorales de ratón y se analizará la expresión de los receptores Notch utilizando técnicas de RT-PCR y Western blot, posteriormente se utilizarán RNAs de interferencia (siRNAs) específicos para bloquear la expresión selectiva de los receptores Notch inducidos con el fin de analizar los cambios en la expresión génica que dependen de la señalización de estos receptores.

TÉCNICAS UTILIZADAS: Cultivos celulares; Aislamiento de RNA, síntesis de cDNA y PCR; Western blot; Transfecciones de células con siRNAs

**.TÍTULO: Estudio funcional de variantes de significado incierto detectadas mediante secuenciación masiva en pacientes con Enfermedades Genéticas Minoritarias.**

Tutores: M<sup>a</sup> Pilar López Garrido/Francisco Sánchez Sánchez

Breve resumen del trabajo a realizar: 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, NGS) 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, así como la detección de variantes de significado incierto (VUS) no descritas previamente en la bibliografía. Por tanto, es necesario averiguar el papel que desempeñan estas variantes genéticas 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 (mutagénesis dirigida, PCR, secuenciación, análisis de secuencias microsatélite, ADN recombinante, cultivos celulares, transfección, western blot, citometría de flujo, actividad luciferasa, etc.) para determinar el grado de patogenicidad de las variantes encontradas y establecer su relación con los casos familiares, para poder ofrecer un diagnóstico de precisión.

#### . TÍTULO: Bases morfológicas de las enfermedades neurodegenerativas.

Tutoras: M<sup>a</sup> del Mar Arroyo ([Marimar.Arroyo@uclm.es](mailto:Marimar.Arroyo@uclm.es)) y Pilar Marcos ([Pilar.Marcos@uclm.es](mailto:Pilar.Marcos@uclm.es))

Breve resumen del trabajo a realizar: El aumento de la esperanza de vida está haciendo posible que la población mundial esté cada vez más envejecida, lo que incrementa la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas. A pesar de los numerosos estudios que se llevan a cabo, aún quedan muchas incógnitas y una de ellas está relacionada con las bases morfológicas que subyacen a estas enfermedades. Por tanto, el objetivo de este trabajo es contribuir a conocer mejor dichas bases, realizando un estudio inmunohistoquímico de las diferentes poblaciones neuronales que pueden estar afectadas por los procesos de envejecimiento. Para ello se estudiarán las zonas cerebrales principalmente implicadas en esta degeneración, como la formación del hipocampo, en modelos animales de envejecimiento acelerado de diferentes edades, y los cambios que se puedan observar a nivel morfológico en las poblaciones diana a lo largo de la edad.

#### . TÍTULO: Uso de PROTACs y combinaciones farmacológicas para revertir la resistencia en tumores cerebrales.

Tutores: Eva M<sup>a</sup> Galán Moya ([EvaMaria.Galan@uclm.es](mailto:EvaMaria.Galan@uclm.es)) y Miguel Burgos Lozano ([Miguel.Burgos@uclm.es](mailto:Miguel.Burgos@uclm.es))

Breve resumen del trabajo a realizar: 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 la resistencia a los tratamientos quimioterápicos actuales.

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: Análisis bioinformático y bioquímico del control de la transcripción de los genes *Notch* durante la inflamación.**

Tutores: Elena de la Casa Esperón y José Javier García Ramírez.

Breve resumen del trabajo a realizar: La familia de receptores Notch desempeña un papel importante en el sistema inmune porque contribuye a la diferenciación y activación de los macrófagos a través de rutas complejas. La caracterización de estas rutas es de gran interés para comprender la participación de los receptores Notch en patologías inflamatorias y procesos tumorales. Este proyecto de fin de máster estará dirigido al descubrimiento de dianas moleculares potenciales de estas rutas mediante análisis bioinformáticos, que serán confirmadas mediante ensayos *in vitro* en cultivos de macrófagos expuestos a estímulos proinflamatorios y antiinflamatorios”.

Mediante la realización de este TFM, el alumno adquirirá un buen conocimiento de las siguientes técnicas: análisis bioinformáticos de secuencias, ensayos *in vitro* (cultivos celulares y transfección) y técnicas de estudio de ARN y proteínas (purificación, retrotranscripción, PCR, Western Blot, etc.)

**. TÍTULO: Efecto de la guanosina en la replicación del virus Zika.**

Tutores: Rosario Sabariegos y Armando Arias.

Breve resumen del trabajo a realizar: El virus zika (ZIKV) es un virus RNA de cadena sencilla de polaridad positiva con alta tasa de replicación y de mutación, y que pertenece al género de los flavivirus. La polimerasa viral es un dominio dentro de la proteína viral NS5. En nuestro laboratorio hemos purificado tanto la proteína NS5 como el dominio polimerasa. Se trata de una proteína interesante tanto desde el punto de vista funcional (es una polimerasa con alta tasa de error) como evolutivo (es la proteína más conservada dentro de los flavivirus). Algunos flavivirus son responsables de varias de las más importantes epidemias actuales (Zika y dengue).

En un trabajo anterior del laboratorio (actualmente en revisión), con el virus de la hepatitis C (HCV), se describió que el nucleótido guanosina inhibía la replicación viral a unas concentraciones que no eran citotóxicas. Este resultado no se reproducía con otros virus que se llevaron de control. Ninguno de ellos tenía actividad *de novo* que sí tienen HCV y ZIKV. Asimismo, vimos que la actividad polimerasa *in vitro* no se modificaba en presencia de este nucleósido. Haremos ensayos *in vitro* de actividad polimerasa para ver el efecto tanto de la guanosina como de los diferentes NTPs y NDPs, tal y como hicimos con HCV.

El proyecto trata de determinar si el mecanismo descrito anteriormente es específico de HCV o se podría extrapolar a otros virus de RNA con actividad *de novo*.

**Desarrollo y técnicas:**

1. Medida de la citotoxicidad de la guanosina. Cultivos celulares, diluciones de fármacos y determinación de la CC50.
2. Infección de ZIKV en presencia de diferentes concentraciones de guanosina. Trabajo en un laboratorio de seguridad nivel BSL2.
3. Purificación de NS5/dominio polimerasa de ZIKV. Cultivos bacterianos, columnas de afinidad, electroforesis de agarosa.
4. Ensayos de actividad de polimerasa *de novo* y primer extensión. Trabajo con fluorescencia y radioactividad.

*IMPORTANTE: Para poder hacer este trabajo el estudiante deberá hacer el curso de radioisótopos.*

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

Tutores: Emilio Artacho Pérula y José Carlos Delgado González.

**. TÍTULO: Caracterización funcional de genes candidatos de glaucoma mediante edición genómica CRISPR/Cas9 en un modelo de pez cebra.**

Tutor: José Daniel Aroca Aguilar ([JoseDaniel.Aroca@uclm.es](mailto:JoseDaniel.Aroca@uclm.es))

Breve resumen del trabajo a realizar: 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 de genes candidatos de glaucoma congénito mediante edición genómica basada en el sistema CRISPR/Cas9 y en el análisis funcional de estos genes 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 su inhibición. Para este último objetivo se utilizarán también líneas *reporter* fluorescentes de genes relacionados con el desarrollo ocular como *sox10*, *vsx2* y *atoh10*.

**.TÍTULO: Papel de SLAMF1 en el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica.**

Tutor: Oscar Gómez Torres.

Breve resumen del trabajo a realizar: La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la forma más común de patología hepática crónica. Se caracteriza por la acumulación de lípidos en el hepatocito y diferentes grados de hepatomegalia, sin embargo, puede progresar rápidamente a esteatohepatitis (EHNA), en la que se

produce inflamación. A continuación, aumenta la fibrosis, seguido de cirrosis o hepatocarcinoma, siendo la segunda causa de trasplante hepático. No se dispone de un marcador bioquímico específico que permita su diagnóstico, ni un tratamiento específico.

Está descrito que la proteína de activación linfocítica de señalización 1 (SLAMF1), expresada en células del sistema inmune. Nuestros resultados preliminares han demostrado que los hepatocitos también expresan esta proteína, tanto en pacientes con EHNA, como en animales sometidos a dieta grasa y en un modelo de EHNA in vitro, usando células HepG2 tratadas con ácido palmítico. En este último caso, las células también secretan una forma soluble de SLAMF1 al medio extracelular. Además, hemos demostrado que al neutralizar la expresión de SLAMF1 mediante la transfección de las células con ARN de interferencia dirigido contra su ARN mensajero, se reduce la apoptosis. Por lo tanto, estos resultados demuestran que SLAMF1 es sintetizado y liberado por los hepatocitos y está mediando el efecto lipotóxico del ácido palmítico, a través de un mecanismo independiente del sistema inmune y, al menos en parte, es debido a una acción paracrina o autocrina, dada la capacidad que tienen estos hepatocitos de liberar SLAMF1. Estos hallazgos nos permitieron iniciar hace un año los trámites para la aprobación de la patente de SLAMF1 como sistema de diagnóstico y tratamiento con pacientes de EHNA. El objetivo del presente proyecto es confirmar todos estos hallazgos en cultivos primarios de hepatocitos de ratón, en un modelo de ratón y en muestras de pacientes (que se realizará por licenciados en medicina en el Hospital Universitario de Toledo). Técnicas empleadas. Cultivos celulares, Western blot, qPCR, Inmunocitoquímica, Transfección con siRNA, actividad LDH y citotoxicidad, viabilidad celular y MTT, apoptosis por citometría.

#### **.TÍTULO: Bases Moleculares de la radiorresistencia**

Tutor/es: Ricardo Sánchez Prieto/María José Ruiz Hidalgo

Breve resumen del trabajo a realizar: Nuestro grupo tiene una amplia experiencia en el estudio de los mecanismos de resistencia a radiación ionizante. Mediante abordajes genéticos y químicos el alumno estudiará el papel de distintos genes en la respuesta a radioterapia, así como su posible relación con fármacos antitumorales, tanto en modelos radiosensibles como radiorresistentes. Para ello, el alumno se familiarizará con las siguientes técnicas de laboratorio: cultivo celular, transfecciones, medidas de viabilidad celular (MTT y cristal violeta), citometría (ciclo celular por yoduro de propidio, apoptosis) uso de vectores lentivirales, técnicas de bioquímica de proteínas (western blot e inmunocitoquímica) y RT-PCR cuantitativa.

#### **.TÍTULO: Estudio del estrés oxidativo en un modelo animal de convulsiones febriles**

Tutores: David Agustín León Navarro y Mairena Martín

Breve resumen del trabajo a realizar: Las convulsiones febriles representan el trastorno convulsivo más frecuente en la población infantil. Los estudios epidemiológicos retrospectivos han encontrado un vínculo entre este tipo de convulsiones y un mayor riesgo de desarrollar epilepsia en la etapa adulta. El modelo animal de convulsiones inducidas por hipertermia empleado en este trabajo, ha corroborado que un porcentaje de los animales expuestos a convulsiones durante la etapa neonatal experimentaban durante la edad adulta trastornos convulsivos compatibles con la presencia de epilepsia del lóbulo temporal. El estrés oxidativo es un trastorno presente frecuentemente durante la epileptogénesis. En el presente trabajo se propone que el

estudiante analice la actividad de diferentes enzimas implicadas en el control del equilibrio redox en diferentes regiones cerebrales obtenidas a partir de ratas control y ratas expuestas a convulsiones febriles durante su etapa neonatal utilizando para ello fracciones celulares obtenidas a partir de distintas regiones cerebrales a diferentes tiempos después de las convulsiones inducidas por hipertermia.

### **.TÍTULO: Identificación de variantes de SARS-Cov-2**

Tutor: Francisco Cimas

Breve resumen del trabajo a realizar: La pandemia causada por el coronavirus SARS-Cov-2 ha causado un enorme impacto en la salud y economía del mundo entero. A pesar de que la vacunación promete controlar el impacto de la enfermedad, las nuevas variantes del virus pueden acelerar su transmisión o incluso evadir la respuesta inmune generada por las vacunas. Por tanto, es imprescindible desarrollar un método que permita identificar de manera rápida y sistemática las nuevas variantes conforme vayan apareciendo en la población.

El alumno se servirá de la plataforma de pipeteo automático Biomek i5 para desarrollar metodos de identificación rápida y segura de las variantes más importantes del virus que han aparecido o puedan ir apareciendo durante el desarrollo de su Trabajo Fin de Máster.

Se familiarizará con distintas técnicas y procedimientos de biología molecular y plataformas robóticas de pipeteo:

- o Diseño de primers y sondas TaqMan.
- o qRT-PCR
- o Trabajo en entornos de bioseguridad
- o Extracción de material genético viral
- o Plataformas automatizadas de extracción y pipeteo.

### **.TÍTULO: Impacto de la expresión de proteínas virales en modelos celulares humanos.**

Tutor: Francisco Cimas

Breve resumen del trabajo a realizar: Para su replicación, los virus han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten tomar control de la maquinaria de la célula hospedadora. Estos mecanismos son cruciales, pues alteran la maquinaria celular y se ha demostrado que incluyen en procesos como la transformación celular. En este trabajo, el alumno aprenderá a desarrollar sistemas de expresión de proteínas virales en células humanas (transducción viral), así como aislar RNA y proteína de células humanas y a analizar e interpretar sistemas de secuenciación y análisis masivos (RNASeq) y su análisis en bases de datos y plataformas públicas.

Se familiarizará con distintas técnicas y procedimientos de biología molecular y bioinformáticas:

- o Sistemas lentovirales de transducción.
- o Técnicas moleculares de extracción y análisis: qRT-PCR y Western Blot.

- o Análisis de RNASeq.
- o Análisis bioinformáticos: Gene Ontology, enrichment analysis...

**.TÍTULO: Desarrollo de una vacuna contra el hongo patógeno multirresistente Candida auris**

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

Breve resumen del trabajo a realizar: Las infecciones fúngicas son una causa frecuente de infección en humanos, especialmente las causadas por levaduras del género Candida. En pacientes inmunocomprometidos, algunas especies de Candida pueden causar infecciones sistémicas (en sangre) que ponen en riesgo la vida del paciente y son difíciles de diagnosticar y tratar. Por tanto, el desarrollo de nuevas estrategias antifúngicas es necesario y urgente. Candida auris es un patógeno emergente que se está convirtiendo en un problema sanitario mundial debido a su gran resistencia a los compuestos antifúngicos, su persistencia en el entorno hospitalario y su transmisión entre pacientes. El grupo de Micología Molecular pretende obtener un mayor conocimiento de los procesos moleculares que permiten el establecimiento de infecciones causados por este hongo y, al mismo tiempo, trabajar hacia aplicaciones terapéuticas. La pared celular del hongo es una diana ideal porque es el primer contacto entre el patógeno y el huésped. En los estudios en curso, estamos identificando las proteínas de la pared celular (CWPs) de C. auris. En este proyecto, utilizaremos partes específicas de estas CWPs para construir una proteína de fusión híbrida como candidata a una vacuna.

Objetivo: Hemos identificado proteínas de la pared celular de C. auris. El objetivo en este proyecto es estudiar la posibilidad de usar (partes de) estas proteínas como vacuna mediante la construcción y purificación de una proteína de fusión híbrida.

Metodología: Los fragmentos de los genes de interés se obtienen mediante PCR. El constructo se genera mediante clonajes y transformaciones en E. coli. Se comprobará la expresión y la estabilidad de la construcción generada, seguido de la purificación de la proteína con el objetivo final de usarlo en modelos de virulencia para probar su efectividad como vacuna. Las técnicas utilizadas en este proyecto incluyen PCR, técnicas de clonaje, transformación de E. coli, SDS-PAGE, inmunoblotting, y purificación de proteínas. Dependiendo de los intereses del estudiante, el proyecto también puede enfocarse desde el punto de vista de la biología celular o genética del hongo, incluyendo técnicas de cultivos de Candida, aislamiento de pared celular, microscopía, transformación en Candida (CRISPR) y/o pruebas bioquímicas.

**-Trabajos 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: Alberto Nájera López ([Alberto.Najera@uclm.es](mailto:Alberto.Najera@uclm.es))

Breve resumen del trabajo a realizar: Se proponen diferentes opciones: la realización de medidas con exposímetros personales de ondas de radiofrecuencia (de 88 MHz a 6 GHz, un total de 20 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: Farmacología y autofagia.**

Tutores: Joaquín Jordán y M. F. Galindo Anaya.

Breve resumen del trabajo a realizar: el alumno se familiarizará con los diferentes tipos de revisiones sobre la literatura científica. El objetivo será conocer los avances e hitos y tendencias que han ocurrido en los últimos años en un tema de investigación concreto del campo de la Farmacología dentro de los procesos que participan en la autofagia.

**.TÍTULO: Las convulsiones neonatales y la señalización adenosinérgica y glutamatérgica.**

Tutores: David Agustín León Navarro y Mairena Martín

Breve resumen del trabajo a realizar: Las convulsiones neonatales son el trastorno neurológico más común encontrado en la población infantil pudiendo contribuir al desarrollo de secuelas a largo plazo que incluyen epilepsia, parálisis cerebral o retraso en el desarrollo y déficits psicomotores. Las estrategias terapéuticas actuales están dirigidas a reducir la hiperexcitabilidad cerebral utilizando fármacos anticonvulsivos. No obstante, estas estrategias no son efectivas en el 100% de los casos. Dos de las principales rutas alteradas durante los procesos convulsivos son la señalización purinérgica y la glutamatérgica. Así, los receptores de adenosina, principalmente  $A_1$  y  $A_{2A}$ , desempeñan un papel clave como neuromoduladores en la liberación de diferentes neurotransmisores entre los que se encuentra el L-glutamato, principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central y cuyos niveles se elevan durante las crisis convulsivas. En el presente trabajo se propone, por lo tanto, que el alumno realice una búsqueda bibliográfica sistemática en el que analice los efectos que las convulsiones febriles provocan sobre las vías de señalización adenosinérgica y glutamatérgica.