

MÁSTER EN BIOMEDICINA EXPERIMENTAL

PROPUESTA DE LÍNEAS DE TFM-CURSO 2022-2023

-Trabajos experimentales:

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

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.

Tutores: Dra. M^a Pilar López Garrido (mariap.lopez@uclm.es) y Dr. Francisco Sánchez Sánchez (francisco.ssasanchez@uclm.es)

-Título: Desarrollo de una proteína quimérica como vacuna contra el hongo patógeno *C. auris*.

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 Laboratorio 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 (PPCs) de *C. auris*. En este proyecto, utilizaremos partes específicas de estas PPCs para

construir una proteína de fusión híbrida como candidata a una vacuna. Objetivo: Hemos diseñado una estrategia novedosa para generar una vacuna multi-epitópica contra *C. auris* que consiste en una proteína quimérica compuesta por péptidos antigénicos de diferentes PPCs. El objetivo en este proyecto es generar dicha proteína quimérica y purificarla y analizarla para su posterior uso como vacuna en estudios con modelos de ratón. Metodología: 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-Cas9) y/o pruebas bioquímicas.

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

-Título: Estudio del papel del sistema endocannabinoide sobre la proliferación, migración y diferenciación de glioblastoma humano.

Datos preliminares de nuestro laboratorio indican que el sistema cannabinoide tiene un papel importante en algunas de las funciones celulares más importantes de glioblastoma de rata. El bloqueo del sistema endocannabinoide reduce la capacidad proliferativa de estas células, así como su capacidad migradora y quimiotáctica (que sería un indicador de su capacidad para realizar metástasis). Además, estas células son capaces de sintetizar sus propios endocannabinoides, que a través de una acción autocrina/paracrina, ejercerían estos efectos. El objetivo del trabajo es estudiar si esto sucede de una forma equiparable en células de glioblastoma humanas. Unos resultados positivos indicarían que, en esta fase tumoral, la utilización de antagonistas cannabinoides o inhibidores de la síntesis endógena de los mismos, podría ser una futura estrategia terapéutica óptima para el tratamiento de estos pacientes.

Tutores: Dra. Cristina Pintado Losa (Cristina.Pintado@uclm.es) y Dr. Oscar Gómez Torres (Oscar.Gomez@uclm.es)

-Título: Bases moleculares de la transformación y la respuesta a tratamiento del cáncer.

Nuestro grupo tiene una amplia experiencia en el estudio de los mecanismos que provoca la transformación maligna, así como de resistencia a radiación ionizante y quimioterapia. Mediante abordajes genéticos y químicos el alumno estudiará el papel de distintos genes implicados en el proceso de transformación maligna, así como en la respuesta a radioterapia y fármacos antitumorales. 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.

Tutores: Dra. M^a José Ruiz Hidalgo (Maria.RHidalgo@uclm.es) y Dr. Ricardo Sánchez Prieto (Ricardo.Sanchez@uclm.es)

-Título: Volumen hipocampal y memoria en COVID persistente.

El objetivo principal de este estudio es la caracterización en términos de integridad cerebral y neuropsicológica de pacientes que habiendo sufrido la infección de COVID en la primera ola (2020) y presentan COVID Persistente y controles. Este trabajo es de carácter experimental y los datos ya han sido recogidos. El TFM contribuirá al análisis de datos en el que se utilizarán técnicas cuantitativas de análisis de imagen procedentes de Resonancia Magnético Nuclear (RMN) y pruebas neuropsicológicas para determinar el posible daño hipocampal y extrahipocampal en pacientes con COVID Persistente. Además, se evaluará la integridad de la sustancia blanca.

Tutora: Dra. Mónica Muñoz López (Monica.MunozLopez@uclm.es)

-Título: Búsqueda de nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de procesos inflamatorios mediante análisis moleculares y computacionales de los genes Notch.

La familia de receptores Notch desempeña un papel muy importante en el sistema inmune porque contribuye a la diferenciación y activación de los macrófagos a través de diversas rutas. La caracterización de estas rutas es de gran interés para comprender la participación de los receptores Notch en patologías inflamatorias, como el asma alérgica, y en procesos tumorales. Este proyecto de trabajo fin de máster estará dirigido al uso de herramientas bioinformáticas para el análisis de respuesta de los receptores NOTCH a estímulos proinflamatorios y antiinflamatorios, y la confirmación de los resultados obtenidos mediante ensayos *in vitro* en cultivos de macrófagos expuestos a distintos estímulos. Mediante la realización de este TFM, el alumno adquirirá una formación muy completa en un proceso experimental con muchas aplicaciones en campos muy diversos de la biología molecular y que abarca desde los análisis bioinformáticos de secuencias hasta las técnicas más habituales en bioquímica y biología molecular, tales como ensayos *in vitro* (cultivos celulares y transfección) y técnicas de estudio de ARN y proteínas (purificación, retrotranscripción, PCR, Western Blot, etc.)

Tutores: Dra. Elena de la Casa Esperón (elena.casaesperon@uclm.es) y Dr. José Javier García Ramírez (josejavier.gramirez@uclm.es)

-Título: Neuroanatomía del envejecimiento cerebral.

Nuestro grupo de investigación pretende contribuir a dar respuesta a uno de los grandes retos de la sociedad: el envejecimiento saludable. Por tanto, se engloba dentro de las ciencias de la salud. Nos centramos en la evaluación morfológica del encéfalo mediante la determinación y análisis cartográfico y neuroquímico de sustancias neuroactivas de interés y sus variaciones a lo largo del envejecimiento. El estudiante, si lo desea, podrá participar en el procesamiento del tejido procedente bien de modelos murinos de envejecimiento, bien de donantes humanos para posteriormente realizar la cartografía y el análisis de los resultados obtenidos. Cabe la opción de realizar también un TFM bibliográfico.

Tutoras: Dra. M^a del Mar Arroyo Jiménez ([Mariamar.Arroyo@uclm.es](mailto:Mariammar.Arroyo@uclm.es)) y Dra. M^a del Pilar Marcos Rabal (Pilar.Marcos@uclm.es)

-Título: Expresión y distribución de subunidades del receptor de GABAA en el hipocampo de ratón en condiciones normales y patológicas.

El neurotransmisor GABA activa tanto a receptores ionotrópicos (GABA_A) como a receptores metabotrópicos (GABA_B). Los receptores de GABA_A son canales iónicos permeables al Cl⁻ que median la neurotransmisión inhibitoria rápida. Su amplia expresión en el cerebro los hace indispensables en importantes funciones del SNC. Además, los receptores de GABA_A son también dianas de diversas clases de fármacos, empleados tanto a nivel clínico como experimental. Se han clonado hasta 19 subunidades diferentes de estos receptores, los cuales se encuentran formando complejos heteropentaméricos. Estudios previos de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* pusieron de manifiesto la presencia de diferentes subunidades en las diferentes regiones del cerebro, pero poco se conoce acerca de la existencia de variaciones en la expresión y distribución de subunidades en condiciones de envejecimiento o patológicas. Por ello, en el presente Trabajo Fin de Master nos centraremos en el estudio de los patrones de expresión y localización celular de subunidades de los receptores de GABA_A específicas tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas, como en la Enfermedad de Alzheimer (modelo animal 5xFAD). Para llevar a cabo este objetivo, en el presente Trabajo Fin de Master emplearemos la técnica de histoblot y las técnicas de inmunohistoquímica a nivel de microscopía óptica, aplicadas al cerebro de ratón, concretamente al hipocampo, región especialmente afectada en la patología de Alzheimer.

Tutores: Dra. Carolina Aguado (carolina.aguado@uclm.es) y Dr. Rafael Luján (Rafael.lujan@uclm.es)

-Título: Impacto de la expresión de proteínas virales en modelos tumorales humanos.

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 influyen 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:

- Sistemas lentivirales de transducción.
- Técnicas moleculares de extracción y análisis: qRT-PCR y Western Blot.
- Análisis de RNASeq.
- Análisis bioinformáticos: Gene Ontology, enrichment analysis...

Tutor: Dr. Francisco Cimas Felipe (FranciscoJose.Cimas@uclm.es)

-Título: Identificación de dianas moleculares en medicina personalizada.

El desarrollo reciente de la medicina personalizada está permitiendo generar nuevas terapias, más efectivas y con menos efectos secundarios, frente a enfermedades infecciosas o el cáncer. Para ello, es clave identificar las características moleculares de la enfermedad, tales como mutaciones o niveles de expresión génica y sus relaciones para identificar vulnerabilidades terapéuticas. El alumno llevará a cabo un estudio bioinformático que permita identificar este tipo de vulnerabilidades y testearlas mediante experimentos in vitro. Se familiarizará con distintas técnicas y procedimientos de biología molecular y bioinformáticas:

- o Sistemas lentivirales 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...

Tutor: Dr. Francisco Cimas Felipe (FranciscoJose.Cimas@uclm.es)

-Título: Uso de PROTACs y/o nanopartículas de sílice mesoporosas como sistema de administración de fármacos contra el cáncer de mama y el glioblastoma multiforme.

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 nuevos sistemas de “delivery” para compuestos antitumorales que puedan potenciar su función y revertir posibles resistencias a los tratamientos actuales. El efecto de los compuestos 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.

Tutora: Dra. Eva M^a Galán Moya (EvaMaria.Galan@uclm.es)

-Título: Análisis de la función del receptor Notch4 en la activación alternativa de los macrófagos: implicación en la respuesta alérgica y el desarrollo tumoral.

Los macrófagos son células con gran plasticidad y heterogeneidad de funciones, que participan tanto en la inmunidad innata como adaptativa. El macrófago tiene la capacidad de diferenciarse hacia un fenotipo M1 proinflamatorio o hacia un fenotipo M2 que participa en procesos de reparación de tejidos y en respuestas antiinflamatorias. Una activación excesiva del fenotipo M2 puede dar lugar a patologías graves, como la inflamación alérgica de las vías respiratorias que conduce al asma o colaborar con el desarrollo tumoral. La diferenciación M2 es muy compleja y puede dar lugar a diferentes fenotipos según el estímulo que se utilice como inductor, entre los que se encuentran las citocinas IL10 o IL13.

Trabajos de nuestro grupo y de otros investigadores han mostrado que la familia de receptores Notch, especialmente Notch1 y Notch3, son importantes en la diferenciación proinflamatoria y citotóxica de los macrófagos, además hemos observado que el receptor Notch4 inhibe la activación proinflamatoria de los macrófagos potenciando la señalización de las citoquinas que inducen la vía alternativa como la IL10 y la IL13.

Queremos realizar estudios con macrófagos aislados de ratones control o de ratones que carecen del receptor Notch4, Notch4^{-/-}, para analizar si en este modelo seguimos observando una potenciación de la diferenciación M2. Si este modelo se observa una potenciación de la vía M2 se tratará de ver su influencia en el crecimiento tumoral y en el desarrollo de procesos alérgicos.

TÉCNICAS UTILIZADAS:

Cultivos celulares de macrófagos de animales Notch4^{-/-} y WT

Aislamiento de RNA, síntesis de cDNA y PCR

Western blot

Transfecciones con siRNAs

Tutoras: Dra. Susana López López (Susana.Lopez@uclm.es) y Dra. Eva María Monsalve Argandoña (EvaMaria.Monsalve@uclm.es)

-Título: Estudio de fisiología y fisiopatología cardíaca en el modelo de pez cebra con biosensores fluorescentes.

En los últimos años hemos puesto a punto un modelo para el estudio de efectos de fármacos y de mutaciones en el corazón en el modelo vertebrado del pez cebra. El TFM consistirá en la generación de líneas transgénicas que expresen un biosensor(es) fluorescentes para el estudio de la señalización adrenérgica en el corazón in vivo. Se utilizarán técnicas moleculares, modificación génica (CRISPR/Cas9), manejo de peces en el animalario, y técnicas avanzadas de microscopía óptica.

Referencia:

[Simultaneous imaging of calcium and contraction in the beating heart of zebrafish larvae.](#)

Salgado-Almario J, Vicente M, Molina Y, Martinez-Sielva A, Vincent P, Domingo B, Llopis J. Theranostics. 2022 Jan 1;12(3):1012-1029. doi: 10.7150/thno.64734.

Tutores: Dra. Beatriz Domingo Moreno (Beatriz.domingo@uclm.es) y Dr. Juan F. Llopis Borrás (juan.llopis@uclm.es)

-Título: Estudio de genes candidato en enfermedades oculares utilizando el pez cebra como modelo genético.

El alumno interesado en este tema participará en el estudio de genes candidato de enfermedades oculares identificados mediante secuenciación masiva. El alumno tendrá oportunidad de realizar técnicas moleculares (PCR, secuenciación automática de ADN, Western blot, etc.), histológicas (incluyendo tinciones clásicas como hematoxilina-eosina e inmunohistoquímicas) y de edición genómica mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Además, podrá iniciarse en el manejo del pez cebra como modelo animal para el estudio de enfermedades genéticas.

Tutor: Dr. Julio Escribano Martínez (julio.escribano@uclm.es)

-Título: Edición genómica CRISPR/Cas9 en pez cebra (*Danio rerio*) aplicada a la caracterización funcional de genes candidatos de glaucoma.

El pez cebra es un modelo animal ampliamente utilizado y de creciente implantación como modelo experimental. Una de sus aplicaciones más relevantes es la caracterización funcional de genes mediante el análisis de patrones de expresión y la inhibición selectiva de expresión génica mediante el establecimiento de líneas knock-out, gracias al reciente desarrollo de la tecnología de edición del genoma CRISPR/Cas9. 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. El alumno participará en la generación y el establecimiento de líneas knock-out de pez cebra para genes candidatos de glaucoma congénito mediante edición genómica basada en el sistema CRISPR/Cas9. Estas líneas serán empleadas para el análisis funcional de estos genes en larvas y adultos de pez cebra mediante: i) el análisis de su expresión utilizando técnicas inmunohistoquímicas y microscopía confocal; ii) la caracterización de las alteraciones morfológicas e histológicas resultantes de su inhibición; y iii) el estudio de las vías genéticas afectadas mediante análisis transcriptómicos RNAseq. Durante la realización del TFM, el alumno adquirirá competencias tanto en técnicas comunes de un laboratorio de genética molecular como PCR, electroforesis, secuenciación de ADN, como en técnicas específicas del modelo animal empleado: Mantenimiento de peces cebra, obtención y desarrollo de embriones, edición genómica mediante CRISPR/Cas9, microinyección de embriones tempranos, genotipado de peces adultos, anestesia y eutanasia de larvas y adultos. La caracterización fenotípica implicará la formación en técnicas microscópicas de análisis morfológico, histológico e inmunohistoquímico y análisis de expresión génica mediante técnicas de RNAseq.

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

-Título: Identificación de células madre progenitoras y neuroblastos en migración el cerebro adulto humano.

En mamíferos inferiores como los roedores, la neurogénesis adulta es un hecho constatado que tiene lugar en determinadas zonas del cerebro, como la zona subventricular/bulbo olfativo y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Se trata de un proceso que ayuda a mantener ciertas funciones del cerebro implicadas en la memoria y en 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, incrementándose incluso en algunas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, los estudios en la zona subventricular son escasos y no disponemos de muchos datos en nuestra especie. La presente propuesta de Trabajo Fin de Grado pretende estudiar la zona cercana a los ventrículos cerebrales laterales procedentes de casos de diferentes edades, durante diferentes etapas tanto de primates como de humanos. El material se seccionará en microtomo de congelación y se realizarán técnicas de inmunofluorescencia para identificar las diferentes poblaciones neuronales, células madre neurales, neuroblastos en migración, glía...etc. Para poder detectarlas se utilizará microscopía confocal. Con ello se pretende identificar, y en su caso, estimar, el número de células proliferativas y de neuroblastos generados en la zona subventricular mediante el uso de estereoinvestigador. Los resultados serán susceptibles de constituir una comunicación a congreso y/o una publicación.

Tutor: Dr. Carlos de la Rosa Prieto (Carlos.delarosa@uclm.es)

-Título: Nanoquimioterapia dirigida para el tratamiento de cáncer.

Actualmente se están explorando terapias de combinación para el tratamiento de aquellos cánceres que se caracterizan por presentar resistencias a agentes quimioterapéuticos. Estas combinaciones pueden estar basadas en quimioterapéuticos que están diseñados para distintas vías de actuación, quimioterapéuticos con inmunoterapéuticos, e incluso la combinación de terapias dirigidas. En este TFM, se pretende explorar terapias de combinación usando la nanotecnología para aquellos cánceres que no tienen terapias exitosas, como es el caso del cáncer de mama triple negativo o el glioblastoma.

El alumno podrá formarse en técnicas de formulación farmacéutica para la generación de nanomedicinas y su posterior caracterización mediante técnicas espectroscópicas. La terapia de combinación será evaluada sobre células tumorales mediante ensayos de proliferación y viabilidad celular.

Tutor/es: Dra. Inmaculada Posadas Mayo (Inmaculada.Posadas@uclm.es) y Dr. Carlos Alonso Moreno (Carlos.AMoreno@uclm.es)

-Trabajos bibliográficos:

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

Se proponen diferentes opciones: la realización de una revisión sistemática y/o metaanálisis sobre temas relacionados con radiaciones de radiofrecuencia (de FM a WiFi o 5G), tanto de exposición personal como de posibles efectos sobre la salud. También se ofrece la posibilidad de realizar diferentes enfoques del problema: geoestadística (análisis de patrones espaciales, estadística en 2D), hipersensibilidad electromagnética, percepción de riesgo, etc.

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