

**PROCESO SELECTIVO PARA INGRESO LIBRE EN LA ESCALA DE
TÉCNICOS ESPECIALIZADOS ORGANISMOS PÚBLICOS DE
INVESTIGACIÓN
PROGRAMA:
« Centros de Referencia en Biomedicina y Salud Humana. Enfermedades Raras »
Tribunal 23**

Tercer Ejercicio – 12 de julio de 2021

Tercer ejercicio: Consistirá en la resolución por escrito, en un tiempo máximo de dos horas, de un supuesto práctico, elegido por el opositor, de entre dos propuestos por el Tribunal relacionados con la parte específica del temario del programa correspondiente.

Este ejercicio será posteriormente expuesto por el opositor ante el Tribunal en sesión pública. Los miembros del Tribunal podrán realizar, una vez expuesto el ejercicio, cuantas preguntas estimen oportunas para aclarar, incidir o ampliar aspectos de la exposición del candidato por un tiempo no superior a diez minutos.

Supuesto práctico 1

Una de las líneas de investigación del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER) al que usted puede incorporarse, es el estudio de determinados cánceres raros, entre los que se encuentran los sarcomas infantiles. En un estudio internacional se ha descubierto que un determinado tipo de sarcoma presenta mutaciones frecuentes (20% de los casos) en el gen *TW1* (el nombre del gen es ficticio), que codifica para un receptor de membrana con actividad tirosina-quinasa, activable mediante unión a su ligando (ligando-*TW1*) y cuya activación promueve la proliferación celular. Aunque la actividad de este gen es conocida en otros tipos de cánceres, se desconoce en gran medida el papel que éste puede desempeñar en la biología del tipo de sarcoma en estudio. Por ello, se decide iniciar un proyecto de investigación para determinar el impacto funcional de las mutaciones observadas en este gen para profundizar en los mecanismos moleculares de la enfermedad y eventualmente diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

A continuación se describen varias situaciones prácticas que se van desarrollando a medida que se avanza en la investigación, y **debe usted responder a las preguntas planteadas en cada situación, justificando sus respuestas:**

1. En el laboratorio se dispone de 10 líneas celulares derivadas de pacientes con sarcoma y 10 líneas celulares derivadas de otros tumores no relacionados. Uno de los primeros pasos que se ha planteado el equipo de investigación es la caracterización de dichas líneas celulares con respecto al gen *TW1*.

Responda a estas preguntas y justifique sus respuestas:

- **Pregunta 1a:** ¿Qué técnicas moleculares utilizaría para caracterizar las posibles mutaciones presentes en el gen *TW1*?
- **Pregunta 1b:** ¿Qué técnicas utilizaría para evaluar cómo afectan las mutaciones encontradas a los niveles de expresión, tanto a nivel de ARNm como de proteína?

2. Para avanzar en el estudio funcional de la proteína se decide establecer un modelo celular de expresión ectópica en células HEK293. En concreto, se decide estudiar una de las mutaciones más frecuentes y que consiste en la sustitución del aminoácido aspártico por un aminoácido valina en la posición 842 de la proteína (D842V).

Responda a estas preguntas y justifique sus respuestas:

- **Pregunta 2a:** Dado que habitualmente las mutaciones funcionalmente relevantes ocurren en aminoácidos que están conservados a lo largo de la escala evolutiva. ¿Conoce alguna base de datos

o herramienta bioinformática que podría usted utilizar para determinar si el aminoácido D842 está conservado a lo largo de la evolución?

- **Pregunta 2b:** Describa paso a paso el procedimiento que utilizaría para obtener una línea celular que exprese la proteína mutada en las células HEK293.

3. El equipo de investigación tiene la sospecha de que las mutaciones encontradas son capaces de activar constitutivamente la proteína TW1. Además, otros grupos de investigación han descrito que la activación de la proteína TW1 activa a su vez la fosforilación en cascada de una serie de proteínas, regulando en último término la expresión de genes que controlan el ciclo celular (como por ejemplo determinadas ciclinas).

Responda a estas preguntas y justifique sus respuestas:

- **Pregunta 3a:** ¿Qué técnica(s) propondría para caracterizar la mencionada activación en cascada?
- **Pregunta 3b:** De los modelos descritos en las situaciones 1 y 2, más arriba, ¿qué modelo celular y por qué consideraría usted *a priori* como el más adecuado para realizar estos estudios?
- **Pregunta 3c:** En dicho modelo, ¿qué tipo de controles positivos y negativos incluiría?
- **Pregunta 3d:** ¿Cómo estudiaría el efecto de la activación de la proteína TW1 sobre el ciclo celular y la proliferación celular? Describa brevemente al menos dos técnicas diferentes.

4. De los resultados obtenidos a lo largo del proyecto se deduce que la activación del gen *TW1* desempeña un papel principal en el desarrollo del sarcoma al promover la proliferación celular. Uno de los grupos de investigación ha desarrollado cuatro moléculas diferentes derivadas de compuestos naturales que son capaces de inhibir la actividad de *TW1* y por lo tanto desean valorar la utilidad de estos compuestos como posibles nuevos fármacos estudiando su efecto sobre la proliferación celular.

Responda a estas preguntas y justifique sus respuestas:

- **Pregunta 4a:** En la siguiente tabla se muestran los valores de IC50 (concentración del compuesto en la que se obtiene una respuesta inhibitoria del 50%) obtenidos en seis líneas celulares de sarcoma diferente (se indica la presencia o ausencia de mutaciones en el gen *TW1*). ¿Qué conclusiones, con respecto a la acción de los compuestos valorados, se pueden deducir de estos resultados?

	Línea celular 1	Línea celular 2	Línea celular 3	Línea celular 4	Línea celular 5	Línea celular 6
Mutación <i>TW1</i>	SI	SI	SI	NO	NO	NO
Compuesto 1	5,2 nM	2,3 nM	1,5 nM	1,2 mM	0,9 mM	1,1 mM
Compuesto 2	10,2 nM	0,1 μM	59,7 nM	0,8 mM	1,3 mM	1,0 mM
Compuesto 3	0,4 mM	0,9 mM	0,7 mM	1,0 mM	1,2 mM	1,6 mM

- **Pregunta 4b:** En función de los resultados de la tabla anterior. ¿Qué compuesto elegiría usted para la realización de estudios en animales modelo?

5. Finalmente, el equipo de investigación decide realizar estudios preclínicos *in vivo* en animales modelo, en concreto en ratones, para evaluar la eficacia antitumoral del compuesto.

Responda a estas preguntas y justifique sus respuestas:

- **Pregunta 5a:** ¿Qué tipo de permisos y autorizaciones necesitan los investigadores para poder realizar experimentos con animales según la legislación vigente?
- **Pregunta 5b:** ¿Qué vía de administración sería la más adecuada para generar los tumores en ratones con las líneas celulares tumorales humanas disponibles?
- **Pregunta 5c:** ¿Conoce usted alguna cepa de ratón utilizada habitualmente para realizar este tipo de experimentos?

**PROCESO SELECTIVO PARA INGRESO LIBRE EN LA ESCALA DE
TÉCNICOS ESPECIALIZADOS ORGANISMOS PÚBLICOS DE
INVESTIGACIÓN
PROGRAMA:
« Centros de Referencia en Biomedicina y Salud Humana. Enfermedades Raras »
Tribunal 23**

Tercer Ejercicio – 12 de julio de 2021

Tercer ejercicio: Consistirá en la resolución por escrito, en un tiempo máximo de dos horas, de un supuesto práctico, elegido por el opositor, de entre dos propuestos por el Tribunal relacionados con la parte específica del temario del programa correspondiente.

Este ejercicio será posteriormente expuesto por el opositor ante el Tribunal en sesión pública. Los miembros del Tribunal podrán realizar, una vez expuesto el ejercicio, cuantas preguntas estimen oportunas para aclarar, incidir o ampliar aspectos de la exposición del candidato por un tiempo no superior a diez minutos.

Supuesto práctico 2

Al Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER) llega un caso de un niño de año y medio de edad que muestra hipotonía muscular progresiva, ausencia de capacidad locomotora independiente y arritmias esporádicas. Distintos equipos médicos no han conseguido dar con un diagnóstico y tampoco han podido revertir los síntomas con los tratamientos aplicados.

Tras analizar todos los datos clínicos y estudios complementarios realizados al paciente, los investigadores del IIER deciden estudiar el caso bajo la hipótesis de que padece una enfermedad rara no diagnosticada y de base genética. Los objetivos marcados son: determinar la causa de la enfermedad y encontrar estrategias terapéuticas para tratarla.

A continuación, se describen varias situaciones prácticas que se van desarrollando según avanza el proceso de estudio, y **debe usted responder a las preguntas planteadas en cada situación, justificando sus respuestas**:

1. Para conocer la base genética de la enfermedad de este paciente se lanza en primer lugar un estudio de su genoma utilizando para ello muestras del niño y de sus padres.

Responda a la siguiente pregunta y justifique su respuesta:

¿Qué consideraciones y requisitos deberán de tenerse en cuenta a la hora de dar entrada a las muestras en el laboratorio, almacenarlas, manipularlas y prepararlas para su estudio?

2. Terminada la primera fase, los investigadores han conseguido identificar variantes en cinco genes que podrían asociarse con la enfermedad y deciden estudiar en líneas celulares si estas posibles asociaciones son de tipo causa-efecto, es decir, si alguna de dichas variantes puede ser responsable de la enfermedad de este paciente. Entre las aproximaciones seleccionadas, se pretende expresar cada una de las variantes en una línea celular de mioblastos humanos y estudiar el efecto causado por esas variantes en la proliferación y viabilidad celular.

Responda a la siguiente pregunta y justifique su respuesta:

-  Describa todos los pasos que seguiría para poder llevar a cabo este estudio.

3. Los estudios han permitido concluir que una mutación en el gen *TRCNC* (nombre ficticio), que se relaciona con el transporte entre citoplasma y núcleo celular a través de poros nucleares, puede ser la responsable de la enfermedad del paciente. Para comprobarlo, los investigadores del IIER se plantean la hipótesis de que esta mutación dificulta el transporte citoplasma-núcleo.

Responda a la siguiente pregunta y justifique su respuesta:

Teniendo en cuenta que se dispone de anticuerpos específicos para la detección de proteínas que son transportadas desde el citoplasma al núcleo a través de los poros, y se dispone además de vectores para la expresión de la variante bajo estudio en células de mamífero, ¿qué experimentos desarrollaría para poner a prueba la hipótesis planteada?

4. Los investigadores deciden crear un modelo animal en el que confirmar los resultados obtenidos en células en cultivo.

Responda a estas preguntas y justifique sus respuestas:

- **Pregunta 4a:** ¿Qué animal(es) elegiría para dicho modelo?
- **Pregunta 4b:** ¿Qué consideraciones y trámites debería de considerar desde el punto de vista ético?
- **Pregunta 4c:** ¿Cómo realizaría el genotipado de los animales obtenidos?
- **Pregunta 4d:** ¿Cómo realizaría un estudio histopatológico básico del modelo generado?
- **Pregunta 4e:** ¿Cómo analizaría la expresión de los 10 genes que podrían verse afectados por esta mutación?

5. Los estudios en células han permitido encontrar dianas terapéuticas para las que existen fármacos que están siendo estudiados por otros equipos de investigación.

Responda a estas preguntas y justifique sus respuestas:

- **Pregunta 5a:** ¿De qué forma estudiaría el efecto que dichos fármacos causan sobre la proliferación y viabilidad celular?
- **Pregunta 5b:** ¿Qué vías de administración usaría para poder estudiarlos en un modelo de ratón *knock-in* para la variante?