

TERCER EJERCICIO de las pruebas selectivas para el acceso a la Escala de Ayudantes de Investigación de los Organismos Públicos de Investigación, por el sistema de acceso libre, convocadas mediante Resolución de 14 de diciembre de 2020, de la Subsecretaría de Ciencia e Innovación (BOE 9 de enero de 2021)

Programa: “CENTROS DE REFERENCIA EN BIOMEDICINA Y SALUD HUMANA. ENFERMEDADES RARAS”

TRIBUNAL Nº: 9

Formato: Desarrollo por escrito de un SUPUESTO PRÁCTICO relacionado con las materias específicas del programa “CENTROS DE REFERENCIA EN BIOMEDICINA Y SALUD HUMANA. ENFERMEDADES RARAS”

Advertencias:

1. Para el desarrollo de las mismas, usted dispone de un “cuadernillo” debiendo escribir por ambas caras de cada hoja.
2. Recuerde que el examen lo corregirá directamente el tribunal, en revisión ciega, por lo que es necesario escribir con letra clara y legible, en color azul o negro, indicando en cada hoja la concreta pregunta que se está contestando, de modo que no haya confusión en las respuestas. No escriba su nombre ni apellidos en el interior del cuadernillo, ni se identifique de ningún otro modo.
3. No existe límite de espacio por pregunta.
4. El tiempo de realización de este ejercicio es de **120 MINUTOS (2 horas)**.
5. Compruebe en el “cuadernillo” los datos relativos a sus apellidos, nombre y DNI; no olvide firmar en el recuadro habilitado.
6. No podrá ausentarse del aula durante los primeros 15 minutos de examen ni cuando falten 15 minutos para finalizar el mismo. En caso de ausentarse antes de la finalización del tiempo del examen no podrá llevarse las preguntas.
7. Está permitido el uso de calculadora. No está permitido el uso de dispositivos móviles ni relojes inteligentes u otros dispositivos similares durante la realización del ejercicio, los cuales serán retirados.

TEXTO DEL SUPUESTO

En un laboratorio de investigación de enfermedades raras se está estudiando una enfermedad caracterizada por mutaciones en el gen TNPO3. A continuación se plantean varias situaciones prácticas que se van abordando a medida que se avanza en la investigación.

CONTESTE A LAS SIGUIENTES 10 PREGUNTAS

Valor máximo de las preguntas:
Preguntas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 y 10: 3,5 PUNTOS
Preguntas 5 y 8: 1 PUNTO

- 1) Se recibe una muestra de fibroblastos primarios de un enfermo portador de una mutación en heterocigosis en el exón 3 del gen TNPO3. Teniendo en cuenta que estas células se van a emplear en estudios celulares y moleculares, explique cuáles son las condiciones ideales en las que se debería recibir la muestra de fibroblastos. Explique también como se deben procesar las células para expandirlas en cultivo.
- 2) Se desea confirmar que las células del paciente contienen la mutación descrita en el gen TNPO3.
 - a. Enumere y describa brevemente los pasos necesarios para confirmar esta mutación.
 - b. Se ha aislado ADN de las células y se ha analizado por espectrofotometría, obteniéndose una concentración de 24 ng/ μ L y una ratio A260/A280=1,3. ¿cree que el ADN obtenido es de buena calidad? Razone la respuesta.
- 3) Para estudiar el efecto de la mutación en la localización subcelular de TNPO3, se decide realizar la técnica de inmunofluorescencia sobre los fibroblastos en cultivo. En la siguiente tabla se indican algunos de los reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica y las cantidades necesarias.
 - a. Describa para qué se utiliza cada uno de ellos.
 - b. Describa cómo prepararía las soluciones indicadas. ¿necesita alguno de los reactivos ser manipulado en condiciones especiales? ¿Explique por qué?
 - c. Ordénelos de acuerdo al orden en el que serán utilizados en la técnica.

Reactivos a preparar (concentración o dilución final)	Volumen final de solución a preparar
BSA (0,25%), Tween-20 (0,1%) en PBS	20 mL
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-TNPO3 (dilución 1/100)	0,2 mL
Tritón X-100 (0,25% en PBS)	10 mL
Paraformaldeído (4% en PBS)	10 mL
Anticuerpo anti ratón-488 (dilución 1/5000)	10 mL

- 4) Se quiere investigar si los niveles de expresión del gen TNPO3 están alterados en las células del paciente con respecto a unas células de un individuo sano. Para ello se ha realizado un experimento de RT-PCR cuantitativa con sondas “Taqman” específicas para el ARNm de TNPO3 y GAPDH (utilizado como gen control constitutivo), obteniéndose los siguientes valores de Ct (*Cycle threshold*) (NOTA: Se asume que la eficiencia de la reacción en cada ciclo de PCR es del 100%).

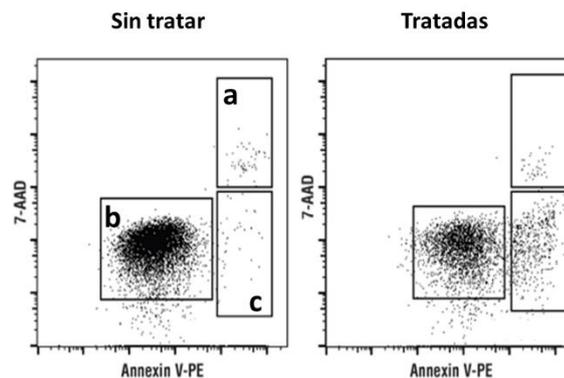
	Ct gen TNPO3	Ct gen GAPDH
Células individuo sano	19,5	24,5
Células paciente	24,3	25,3

Responda a las siguientes cuestiones:

- Indique si el gen TNPO3 se expresa más o menos en comparación con las células del individuo sano y si es posible cuantifique dicho efecto con los datos disponibles. Explique y justifique el método empleado en los cálculos.
 - Este experimento de RT-PCR cuantitativa se ha llevado a cabo con sondas Taqman específicas para cada uno de los genes. Indique que consideraciones particulares se tienen que tener en cuenta si el experimento se hubiera realizado con la técnica de SYBR Green.
- 5) Se quiere evaluar el potencial antiproliferativo del compuesto *Reversina* en la línea celular humana. Para ello se incubarán las células con distintas cantidades de *Reversina*, y se necesita preparar una solución concentrada de 0,5 M. Teniendo en cuenta que el peso molecular de la *Reversina* es 400 gr/mol ¿cuántos gramos de *Reversina* son necesarios para preparar 0,5 mL de la solución 0,5 M?
- 6) Para continuar con la investigación, se desea sobre-expresar el gen mutado TPNO3 en otra línea celular humana (HEK-293). Describa en detalle un protocolo para obtener la sobre-expresión de dicho gen de forma transitoria. Se dispone de un plásmido de expresión en el que la secuencia del gen TPNO3 se encuentra clonado bajo el control de un promotor constitutivo.
- 7) Dado que la sobre-expresión transitoria del gen mencionado en la pregunta anterior ha dado los resultados esperados, se desea obtener una línea celular humana que sobre-exprese dicho gen de forma estable. Describa con detalle un protocolo para obtener dicha línea celular.
- 8) Se desea comparar la tasa de crecimiento de la línea celular obtenida en la pregunta anterior con la línea celular parental. Para ello se han sembrado 10.000 células de cada línea celular en una placa de cultivo y al cabo de cinco días se han tripsinizado las células y se han contado con la ayuda de una cámara Neubauer, obteniéndose los siguientes valores correspondientes a una cuadrícula de 16 cuadrados:
- Línea celular parental: 64 células en un cuadrante. Volumen suspensión celular: 500 μ L.
 - Línea celular que sobreexpresa TPNO3 mutado: 81 células en un cuadrante. Volumen suspensión celular: 3.000 μ L.

Calcula la tasa de crecimiento (número de duplicaciones cada 24 horas) para cada línea celular.

- 9) Se desea comparar la citotoxicidad de un compuesto sobre la línea celular que sobreexpresa de manera constitutiva el gen TPNO3 mediante un análisis por citometría de flujo usando células marcadas con annexina-V y 7-AAD.
- Describa con detalle el protocolo que seguiría para realizar el experimento.
 - En la figura adjunta se muestran los resultados obtenidos en el experimento. Indique a que células (células vivas, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía) correspondería cada uno de los recuadros (a, b y c) mostrados en la figura. Indique si el compuesto incrementa o no el número de células apoptóticas. Justifique la respuesta.



- 10) Con el objeto de almacenar en un biobanco muestras de estos pacientes, se reciben muestras de sangre periférica en un tubo con el anticoagulante heparina para proceder al aislamiento de células mononucleares y su posterior almacenamiento en el biobanco.
- Describa el proceso para la separación de células mononucleares mediante Ficoll-Paque como medio en gradiente de densidad y el procedimiento de centrifugación que aplicaría. Indique la composición de las capas que se forman tras la centrifugación.
 - Para analizar la viabilidad celular, se resuspenden todas las células mononucleares obtenidas en 10 mL, se cogen 50 μL de esta suspensión de células y se les añade 50 μL de una solución de Azul Tripán. La suspensión celular se aplica a una cámara Neubauer, obteniéndose los siguientes resultados tras contar los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer:
 - Células totales: 20, 19, 25 y 24.
 - Células viables: 13, 16, 14 y 17.
- Calcula el número de células viables y el de células totales por mL y el porcentaje de viabilidad en esta muestra.
- Explica en que se distinguen las células viables de las no viables utilizando el método de Azul Tripán.
 - Si queremos preparar alícuotas de $1,5 \times 10^6$ células viables, ¿Cuántas alícuotas podremos preparar de esta muestra? ¿Cómo procesarías estas células para almacenarlas en nitrógeno líquido?