

Centro de Investigación Príncipe Felipe

PROGRAMA

Módulo:

Herramientas tecnológicas para el diagnóstico y tratamiento de patologías humanas del

Máster en Investigación Biomédica

Universitat de València

Coordinadores: Carmen Espinós y Vicente Felipo

Temas

- Tema 1 Fármacos y Biomarcadores
- Tema 2 Terapia celular, bases y aplicaciones
- Tema 3 Diagnóstico de enfermedades genéticas
- Tema 4 Autoinmunidad: Mecanismos celulares y moleculares
- Tema 5 Biología molecular del cáncer
- Tema 6 Patologías neuropsiquiátricas:
encefalopatía hepática y esquizofrenia
- Tema 7 Bioestadística
- Tema 8 Bioinformática

TEMA 1: FÁRMACOS Y BIOMARCADORES

Profesoras: Mónica Sancho, Mar Orzáez, M^aJesús Vicent, Inmaculada Conejos, Ana Armiñán, Zoraida Andreu, Viviana Bisbal, Martina Palomino.

1.1. Desarrollo pre-clínico de fármacos. Selección de dianas farmacológicas

Clase Teórica (1h). Conocer las fases del proceso de desarrollo pre-clínico de un fármaco. El cribado de alto rendimiento (*High throughput screening*) como metodología en el descubrimiento de fármacos. Criterios de selección de dianas farmacológicas.

1.2. La nanomedicina en investigación y práctica médica

Clase Teórica (2h) + Clase Práctica (2h). Conocer la nanomedicina como disciplina, su aplicación en el campo del desarrollo de fármacos desde el laboratorio a la clínica, así como aspectos concretos de su regulación. Prácticas relacionadas con técnicas para la caracterización fisicoquímica y biológica de las nanomedicinas.

1.3. Biofármacos: diseño, desarrollo y aspectos legales

Clase Teórica (1h). Definición de biofármaco. Ventajas y desventajas con respecto a otras entidades terapéuticas. Puntos de heterogeneidad en el proceso de producción. Normativa aplicable. Definición de biosimilar y su problemática.

1.4. Práctica de cribado: en busca de moduladores de la muerte celular

Clase Práctica (3h). Ejemplo práctico de puesta a punto de un ensayo de cribado para buscar moduladores tanto en positivo como en negativo de la supervivencia de una línea celular tumoral. Se medirá viabilidad y actividad caspasa-3/7 de un cultivo celular después de tratar con una quimioteca de compuestos.

1.5. Modelos celulares para la investigación biomédica

Clase Teórica (1h). La investigación biomédica necesita del desarrollo de modelos celulares adecuados de estudio que reproduzcan de la manera más fiel la biología humana. Se estudiarán los modelos empleados actualmente en investigación: modelos clásicos 2D vs 3D y modelos organoides derivados de pacientes.

1.6. Modelos de experimentación animal en desarrollo de fármacos.

Clase Teórica (2h). El estudio de nuevas terapias necesita ser estudiado en un modelo fisiológico para poder ser aplicado posteriormente en pacientes lo que implica la utilización de animales de laboratorio. Se dará una pincelada sobre ética, legislación y modelos animales aplicables en el desarrollo de nuevos fármacos.

1.7. Comunicación intercelular por exosomas y su uso como biomarcadores

Clase Teórica (1h) + Clase Práctica (5h). Los exosomas juegan un papel clave en la comunicación intercelular tanto en procesos fisiológicos como patológicos, siendo su estudio de gran interés. Se dará una visión general de las rutas de biogénesis, liberación, caracterización y su posible aplicación médica como marcadores de enfermedades. Finalmente, se hablará de las técnicas de purificación y cuantificación. En la clase práctica se purificarán exosomas por ultracentrifugación (UC) y se cuantificarán por nanosight (NTA).

1.8. La caracterización de perfiles metabolómicos como herramienta en biomedicina

Clase Práctica (3h). Conocer las bases de la metabolómica como herramienta en biomedicina. Tras una breve introducción teórica, se realizará un ejercicio práctico analizando la orina de los participantes mediante resonancia magnética nuclear, que incluirá tanto la preparación de la muestra, como la adquisición de los experimentos y el análisis de los datos resultantes.

TEMA 2: TERAPIA CELULAR

Profesoras: Mar Orzáez, Dunja Lukovic, Amparo Galán, Victoria Moreno.

2.1. La metodología CRISPR como terapia de futuro

Clase Teórica (1h). En esta clase se presentan las herramientas básicas para el uso de los sistemas CRISPR en el laboratorio de investigación. Se estudian ejemplos de sus aplicaciones en biomedicina y se presentan los avances más relevantes en el campo de ensayos clínicos.

2.2. Terapia celular, bases y aplicaciones

2.2.1. Células madre pluripotentes: fundamentos y tipos

Clase Teórica (45min). Características, origen, tipos de células pluripotentes. Métodos de reprogramación y mantenimiento de pluripotencia.

2.2.2. Células iPS como herramienta para estudiar enfermedades

Clase Teórica (45min). Modelos humanos para estudiar enfermedades basados en células pluripotentes: células de pacientes vs manipulación genética. Valoración de modelos, reproducción del fenotipo clínico, impacto del fondo genético.

2.2.3. Demostración práctica: cultivo de células pluripotentes y diferenciación hacia células específicas

Clase Práctica (2h). Cultivo de células pluripotentes (esterilidad, controles calidad, ensayos de pluripotencia). Diferenciación hacia células especializadas, estrategias (bases moleculares, factores de inducción, homogeneidad de la población, andamiaje). Edición génica mediante CRISPR/Cas, diseño de experimento, retos técnicos en obtención de las líneas clonales.

2.2.4. Aplicaciones terapéuticas de las células madre. Ensayos clínicos. Legislación y Bioética

Clase Teórico-Práctica (1h 30min). En este tema se abordará desde un punto de vista dinámico la regulación del trabajo con las células madre, los últimos avances en investigación y sus aplicaciones en la clínica. Así mismo se incluirá una aproximación práctica a la investigación de las células madre.

2.2.5. Terapia Celular en patologías del sistema nervioso

Clase Teórica (1h). Se abordará el caso particular de la aplicación de la terapia celular en el rescate de la función neuronal en lesiones traumáticas de la médula espinal, abordando desde la fisiopatología de la lesión medular los mecanismos celulares y moleculares asociados al rescate funcional tras la terapia celular.

TEMA 3. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

Profesor/a: Carmen Espinós, Vincenzo Lupo

3.1. Descubrimiento de nuevos genes asociados a enfermedades mendelianas

Clase Teórica (1h 30min). Aproximaciones para la caracterización de las bases genéticas de una enfermedad mendeliana Utilidades de la secuenciación masiva (NGS, *Next Generation Sequencing*). Aplicabilidad de la secuenciación completa de exoma (WES) en el diagnóstico genético. La heredabilidad perdida: detección de modificadores genéticos.

3.2. Taller de Genealogías

Clase Práctica (1h 30min). Casos de pacientes con enfermedades genéticas cuya herencia no se ajusta exactamente a una herencia mendeliana. Revisión de casos clínicos. Posibles modos de transmisión de una enfermedad mendeliana. Correlación genotipo-fenotipo.

3.3. Análisis bioinformático de datos de secuenciación masiva aplicado al diagnóstico genético

Clase Teórica (1h). Pipelines aplicados al procesamiento de datos de secuenciación. Tipo de variantes detectadas mediante NGS. Qué metodología de NGS emplear para el diagnóstico genético: genoma, exoma o panel de genes?

3.4. Bases de datos para la anotación e interpretación de variantes genéticas

Clase Teórico-práctica (1h 30min). Introducción y manejo de bases de datos de genes y proteínas (NCBI, Ensembl, UCSC Genome Browser) y de enfermedades genéticas (OMIM, ORPHANET, etc.). Introducción y manejo de bases de datos de variantes genéticas benignas y patológicas (dbSNP, ExAC, gnomAD, ClinVAR, HGMD). Guías prácticas para la clasificación de una variante genética: benigna-probablemente benigna-variante de significado incierto-probablemente patológica-patológica.

3.5. Ejercicios prácticos

Clase Práctica (1h 30min). Ejercicios en ordenador relacionados con el manejo de las base de datos para la anotación e interpretación de variantes genéticas: lectura y alineamiento de secuencias de ADN; búsqueda de variantes identificadas en base de datos y correlación genotipo-fenotipo. Nomenclatura de la variante identificada de forma manual empleando las recomendaciones del HGVS (<http://varnomen.hgvs.org/>).

TEMA 4. AUTOINMUNIDAD: MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES. IMPLICADOS EN PROCESOS INFLAMATORIOS

Profesor: Enric Esplugues.

Clase Teórica (1h). Conceptos básicos de la activación del sistema inmunológico. Inmunidad adaptativa y el papel de los linfocitos en la autoinmunidad. Modelos animales para el estudio de enfermedades autoinmunes.

Clase Práctica (2h 30min). Los estudiantes aprenderán a separar/aislar y analizar células pro-inflamatorias del sistema inmune en modelos animales de inflamación del sistema digestivo y del sistema nervioso central. Se detectarán diferentes marcadores de activación, señales intracelulares y producción de citocinas en células pro-inflamatorias mediante RT-PCR y FACS intracelular.

TEMA 5. BIOLOGÍA DEL CÁNCER

Profesoras: Rosa Farràs, Carolina Gandía.

5.1. Introducción

Clase Teórica (3h). Qué es cáncer. Las diez propiedades del cáncer. Oncogenes y supresores tumorales. Factores de crecimiento, receptores y cáncer.

5.2. Células madre y cáncer

Clase Teórica (1h). Células madre y cáncer. Conceptos actuales.

5.3. Células madre y cáncer: generación de oncoesferas en cultivo *in vitro*

Clase Práctica (2h). Los estudiantes podrán ver la generación de oncoesferas en la sala de cultivos celulares para el estudio de las células madre tumorales.

5.4. Análisis de marcadores de superficie mediante citometría de flujo para el estudio de las células madre tumorales

Clase Práctica (2h). Los estudiantes aprenderán a realizar marcaje de proteínas de superficie para identificar células madre tumorales y analizarán las células positivas para estos marcadores mediante citometría de flujo

TEMA 6. PATOLOGÍAS NEUROPSIQUIÁTRICAS: ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA Y ESQUIZOFRENIA

Profesores/as: Marta Llansola, Andrea Cabrera Pastor, Tiziano Balzano, Pietro Fazzari.

6.1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

6.1.1. Encefalopatía Hepática: Introducción

Clase Teórica. (30 min). Qué es la encefalopatía hepática. Modelos animales para estudiar las bases moleculares de enfermedades neurológicas: encefalopatía hepática como ejemplo. Neuroinflamación y alteraciones en la neurotransmisión en Encefalopatía Hepática. Implicaciones terapéuticas.

6.1.2. Estudios *in vivo* en modelos animales: estudios de comportamiento (memoria y aprendizaje; actividad y coordinación motoras)

Clase Teórica (30 min). Cómo se evalúa el comportamiento en modelos animales con déficits cognitivos y/o motores. Test de memoria y aprendizaje (laberinto acuático de Morris, laberinto radial, memoria de localización y reconocimiento de objeto, laberinto en Y). Test de coordinación motora (beam walking, rotarod). Actividad motora (actímetro).

Clase Práctica (2h). Visitarán las salas de comportamiento y podrán ver como estudiamos en ratas la actividad y la coordinación motoras, la memoria y el aprendizaje con los diferentes test explicados en la clase teórica.

6.1.3. Análisis de neurotransmisión por microdiálisis cerebral *in vivo*

Clase Teórica (30 min). Fundamento de la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo* y sus aplicaciones.

Clase Práctica (1h). Aprender a manejar un estereotáxico y el funcionamiento de sistemas de microdiálisis.

6.1.4. Estudio *ex vivo* en cortes de cerebro: modulación de la neurotransmisión.

Clase Teórica (30 min). Cómo podemos estudiar en cortes de cerebro *ex vivo* vías de señalización implicadas en la neurotransmisión. Obtención de cortes de diferentes áreas cerebrales. Sistema de perfusión. Análisis de la expresión de receptores y transportadores. Estudio de circuitos eléctricos cerebrales con *multielectrode array*.

Clase Práctica (1h). Los estudiantes podrán ver el funcionamiento del vibrátomo para la obtención de cortes y el sistema de perfusión, así como un experimento en el *Multielectrode array* con cortes de hipocampo para estudiar actividad eléctrica.

6.1.5. Análisis de factores inflamatorios por inmunohistoquímica. Cuantificación de la neuroinflamación

Clase Teórica (15min). Procesamiento de las muestras para su análisis histológico y herramientas para el análisis de factores inflamatorios por técnicas inmunohistoquímicas.

Clase Práctica (1h 15min). Los estudiantes aprenderán a usar los programas de análisis de imagen. Panoramic viewer: realizar fotos en distintas regiones de cerebro de ratas para el análisis y cuantificación de células gliales (astrocitos y microglía). ImageJ: Detección y cuantificación de células gliales; Uso de macros para automatizar y agilizar el proceso; revisión de resultados.

6.1.6. Aplicaciones de la cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS) para estudiar alteraciones de la neurotransmisión y búsqueda de biomarcadores por metabolómica

Clase Práctica. (1h 30 min). Que es un sistema de LC-MS, de qué partes consta y cómo funciona. Ejemplo de cómo analizamos y cuantificamos niveles de metabolitos en muestras biológicas.

6.2. ESQUIZOFRENIA

6.2.1. Psiquiatría molecular: fisiopatología de los circuitos corticales. La corteza, la región más compleja del cerebro

Clase Teórica (40 min). Introducción a la estructura y función de los circuitos corticales. Desarrollo cortical. Primero, diferenciación y proliferación. Segundo, migración; diferentes modalidades, un objetivo. Tercero, conexión. Cuarto, revisar y refinar (base para la plasticidad sináptica).

6.2.2. Patologías del desarrollo neurológico de circuitos corticales. ¿Qué pasa si algo sale mal?

Clase Teórica (40 min). Desequilibrio homeostático de los circuitos corticales como base de los trastornos del desarrollo neurológico: un concepto general. La esquizofrenia: un trastorno prototípico del desarrollo neurológico. Regeneración tras lesión: ¿joven de nuevo?

6.2.3. La edad de oro de la neurobiología: nuevas herramientas para investigar los circuitos corticales

Clase Teórica (40 min). Revolución molecular: modelos animales en la era post-genómica. Marcaje sináptico. Trazado del circuito. Haz lo que te digo ahora: opto-genética y chemo-genética.

6.2.4. Ejemplos prácticos y enfoques experimentales

Clase Práctica (1h). Cultivos neuronales. Secciones flotantes, imagen de circuitos neuronales locales. Rastreo de conexiones entre hemisferios corticales. Imagen cuantitativa.

TEMA 7. BIOESTADÍSTICA

Profesores: Francisco García García y Marta Hidalgo.

Clases Teórico-Prácticas (6h). Introducción al software libre R y Rstudio. Estadística descriptiva univariante y multivariante. Conceptos básicos de inferencia estadística. Contrastes de hipótesis paramétricos y no paramétricos. Análisis de la varianza. Modelos de regresión: lineal y lineal generalizado. Análisis de un caso real: En esta sesión, los alumnos podrán trabajar con sus propios datos para hacer las consultas que consideren oportunas y resolver sus dudas. Si no disponen de datos, se les proporcionará una base de datos real y una batería de cuestiones a resolver.

Nota: Todos los temas combinan teoría y práctica informática con R y Rstudio.

TEMA 8. BIOINFORMÁTICA

Profesora: Marta Hidalgo y Francisco García García.

Clases Teórico-Prácticas (3h). Introducción a la transcriptómica y a las tecnologías de alto rendimiento. Exploración y pre-proceso de datos de expresión génica. Análisis de expresión diferencial. Enriquecimiento funcional.

Nota: Todos los temas combinan teoría y práctica informática con R y Rstudio y aplicaciones web.

CALENDARIO PREVISTO

	Fechas
Tema 1	26, 27 y 28 marzo; 2, 3, 4 y 9 abril
Tema 2	10 y 11 abril
Tema 3	16 y 17 abril
Tema 4	18 abril
Tema 5	7 y 8 mayo
Tema 6	9, 14, 15 y 16 mayo
Tema 7	21 y 22 mayo
Tema 8	23 mayo