

**DECLARACIÓN DE INTERÉS
PROGRAMA FORMATIVO BANKIA PARA TÉCNICOS FP-II**

Grupo Acreditado/ Unidad Mixta Integrada/ Plataforma: Cardiopatías Familiares, Muerte Súbita y Mecanismos de Enfermedad (CaFaMuSMe)

Responsable: Esther Zorio Grima

ESPECIALIDAD/ES SOLICITADAS ACORDE CON LA NATURALEZA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL CUAL SE ADSCRIBIRÍA Y COLABORARÍA EL CONTRATADO

Otros, especificar (TÉCNICO DE LABORATORIO)

Identificación del perfil epigenético como predictor del potencial metastásico, respuesta terapéutica y recidiva en el cáncer de ovario y la endometriosis. IP: J. Gilabert-Estellés. Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III, PI17/01945.

El cáncer de ovario (CO) y la endometriosis (END) son dos patologías ginecológicas que comparten muchos aspectos biológicos como capacidad de implantarse a distancia, proliferar e invadir el tejido circundante, inflamación, reducción de la apoptosis y desregulación de la angiogénesis. La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un evento clave para la invasión y metástasis en cáncer de ovario y se ha indicado como un pre-requisito para el establecimiento inicial de las lesiones endometrióticas. Se ha descrito que la desregulación epigenética (miRNAs y metilación del DNA) podrían mediar este proceso. Nuestro objetivo es desarrollar modelos bioestadísticos que permitan predecir la respuesta al tratamiento y el riesgo de recidiva que mejoren la especificidad de las técnicas actuales (marcadores tumorales, técnicas de imagen). Estos modelos se desarrollarán a partir de una cohorte retrospectiva de cáncer de ovario (CO) estadios IIIc (n=60) y endometriosis (END) en estadios III-IV (n=80), en las que se mediarán marcadores tisulares y plasmáticos relacionados con la TEM a T₀ (pre-cirugía). Los marcadores seleccionados se validarán en una cohorte prospectiva de pacientes con cáncer de ovario estadios IIIc (n=60) y endometriosis en estadios III-IV (n=60), incluyendo muestras a T₀ (pre-cirugía) (plasma y tejido) y a T₁ (plasma post-cirugía) y T₂ (plasma post-tratamiento). Adicionalmente, se desarrollarán modelos terapéuticos in vitro a través de la modulación del estado de metilación de los genes de interés (determinados a partir de la cohorte retrospectiva) mediante la técnica dCas9.

Arythmies dépendantes du calcium intracellulaire: mécanismes de la tachycardie ventriculaire catécholaminergique (ANR-13-BSV1-0023-03). IP global: Ana M^a Gómez. IP local. E. Zorio. Entidad financiadora: Agence Nationale de la Recherche.

La taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica (TVCP) es una cardiopatía potencialmente letal muy infrecuente muy frecuentemente debida a mutaciones en el gen RyR2, responsable en gran medida del metabolismo del calcio intracelular. La colaboración en este proyecto con el grupo de Ana M^a Gómez nos ha permitido obtener cultivos de cardiomiocitos derivados de células iPS de varios miembros (afectados y no afectados) de una familia amplia de nuestra serie con mutación RyR2 R420Q y bien caracterizada fenotípicamente por nuestro grupo (Domingo et al, Rev Esp Cardiol 2015;68(5):398-407). Además de la caracterización basal de los cultivos a nivel de electrofisiología celular nos proponemos realizar estudios similares tras haber modificado exógenamente el perfil de metilación del gen RyR2. En caso de observar diferencias en el comportamiento proarrítmico de los cultivos se demostraría por primera vez la modulación epigenética en las enfermedades genéticas del corazón. Este hito permitiría explicar algunos interrogantes acerca de la penetrancia incompleta y la expresividad variable en este contexto y diseñar nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en la modulación dirigida de la metilación de los genes diana.

PROGRAMA FORMATIVO A REALIZAR POR EL CONTRATADO

Describir el proyecto de investigación, haciendo especial énfasis en los aspectos formativos y las tareas a realizar por el contratado FP-II

La temática y la tecnología para trabajar en los dos proyectos expuestos (PI17 y ANR) en curso es común, lo cual reportará importantes ventajas al técnico que se podrá beneficiar de participar en publicaciones en una y otra vía de investigación. Tareas concretas:

1.- **Actualización de bases de datos.** La base de datos del proyecto PI17 necesita ser alimentada con los resultados que se va obteniendo con datos epidemiológicos, analíticos y ginecológicos de interés en pacientes con END, pacientes con CO y controles. Estas bases de datos serán imprescindibles para el posterior análisis dentro del modelo bioestadístico a construir para predecir el riesgo de recidiva.

2.- **Procesado de las muestras de tejido** (END, CO): limpieza, extracción de RNA, DNA y proteína, almacenamiento hasta su estudio en nitrógeno líquido, parte del tejido se fijará en formol y se embeberá en parafina.

3.- **Procesado de las muestras de plasma:** se centrifugará la sangre para obtener el plasma que será alícuotado y congelado a -80°C.

4.- **Control de calidad.** Se monitorizará la homogeneidad de las extracciones de plasma (añadiendo spike-in-cell-miR-39-3p al principio de la extracción y se medirá con RT-PCR en todas las muestras). Asimismo, se cuantificará la pureza e integridad del RNA (mediante NanoDrop ND-1000 y RNA integrity number, respectivamente).

2.- **Identificación de los perfiles de expresión de miRNAs característicos de determinados tejidos como en endometriomas ováricos y cáncer de ovario.** Para ello se realizarán **arrays de expresión** de miRNAs empleando la Plataforma de Arrays del IIS La Fe (NEBNext Small, Illumina). Se seleccionarán miRNAs con expresión significativamente diferente entre los grupos a estudio y con potenciales dianas en las rutas de interés (identificadas con distintas bases de datos reconocidas a tal efecto). Estos miRNAs serán **validados** mediante qRT-PCR en un número mayor de muestras.

3.- **Cuantificación de las moléculas seleccionadas como potenciales biomarcadores plasmáticos: niveles plasmáticos de los miRNAs distintamente expresados en tejido, de citocinas plasmáticas de la TEM y concentración de DNA libre plasmático.** La cuantificación de proteínas plasmáticas y tisulares se llevará a cabo con técnicas de ELISA.

4.- **Estudio de metilación del promotor** de los miRNAs diferentemente expresados en tejidos en la Plataforma de Epigenómica del IIS La Fe en DNA de tejido de END y CO con conversión con sulfito, amplificación y pirosecuenciación.

5.- **Modulación del estado de metilación de promotor** de los miRNAs de interés en líneas celulares comerciales y cultivos primarios de endometriomas con la técnica CRISPR/Cas9. De igual manera, en el proyecto ANR se modulará exógenamente el nivel de metilación del promotor del gen RyR2 en cultivos ya disponibles de cardiomiocitos derivados de iP de dos sujetos afectados y dos familiares sanos de la familia con TVCP por la mutación RyR2 R420Q.

6.- En el PI17 el **estudio del efecto de la modulación de la metilación** se analizará observando la viabilidad (con el test azul tripan), la proliferación celular (con la técnica de incorporación BrdU) y la respuesta al tratamiento quimioterápico (CO) u hormonal (END) en los cultivos primarios y líneas celulares. Por otra parte, en el proyecto ANR se analizará el efecto de la metilación sobre el potencial proarrítmico mediante el estudio de las corrientes de calcio, la facilidad para la generación de postdespolarizaciones tardías, actividad desencadenada, sparks y waves de calcio en situación basal y con cafeína.

Aunque no será una tarea directa del contratado, la generación de un modelo bioinformático que permita predecir el riesgo de recidiva en END y CO se habrá nutrido de su trabajo como técnico por haber participado en los puntos anteriores.