



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

TERCER EJERCICIO DE LAS PRUEBAS SELECTIVAS DE ACCESO AL GRUPO A (SUBGRUPO A1), TURNO LIBRE, SECTOR ADMINISTRACIÓN ESPECIAL, ESCALA TÉCNICA SUPERIOR DE INVESTIGACIÓN, SUBESCALA DE MICROSCOPIA DE ESTA UNIVERSITAT. (DOGV 23.07.2024)

11 de abril de 2025

SUPUESTO A

Un investigador acude al servicio de microscopía para solicitar asesoramiento sobre el diseño de un experimento. Su estudio se centra en una enfermedad causada por una enzima defectuosa que induce un cambio conformacional en la proteína A, lo que resulta en su acumulación en las mitocondrias y afecta negativamente la viabilidad celular. En células sanas, la proteína A no sufre modificaciones y se distribuye de manera homogénea en el citoplasma. El servicio cuenta con un microscopio confocal de barrido láser equipado con dos fotomultiplicadores, un detector híbrido y capacidad de detección espectral. Las líneas de excitación disponibles en este equipo son: 405 nm, 488 nm, 515 nm, 561 nm y 639 nm. Además, se dispone de una variedad de objetivos, cuya información se detalla en la tabla proporcionada

	Medio	NA	WD (mm)
EC PLAN-Neofluar 10x/0.3 M27-Air	seco	0.3	5.20
PLAN-Apochromat 20x/0.8 M27-Air	seco	0.75	0.55
LD LCI PLAN-Apochromat 25x/1.3 1mm Korr DIC M27-Oil	aceite	1.30	0.57
C-Apochromat 40x/1.2 Korr M27-Water	agua	1.2	0.28
PLAN-Apochromat 63x/1.4 DIC M27-Oil	aceite	1.4	0.19

Teniendo en cuenta esta información responda a las siguientes preguntas (2,5 puntos por cada pregunta):

1.- Un colega le ha proporcionado un vector de expresión que codifica la proteína A fusionada con CFP (excitación: 433 nm, emisión: 476 nm) y YFP (excitación: 514 nm, emisión: 527 nm) con el objetivo de detectar cambios conformacionales. Sin embargo, no le ha especificado cómo hacerlo. Explíquelo brevemente qué técnica sería la más adecuada para detectar dicho cambio y justifique su respuesta.

2.- Teniendo en cuenta el equipo disponible en el servicio de microscopía, ¿cuál sería la configuración óptima, controles necesarios y secuencia de adquisición de imágenes para detectar el cambio conformacional de la proteína A mediante la técnica descrita en la pregunta anterior?

3.- Gracias a su ayuda, el investigador ha conseguido visualizar cambios conformacionales en la proteína A. Ahora le gustaría estudiar *in vivo* la tasa de acumulación de la proteína en las mitocondrias. ¿Qué otro marcaje sería necesario y qué técnica emplearía para este estudio? ¿Sería necesario o recomendable algún accesorio adicional en el equipo que no se menciona en la descripción inicial?

4.- Tras las primeras pruebas para estudiar la dinámica de acumulación de la proteína en las mitocondrias han detectado que se produce una elevada mortalidad celular antes de finalizar el experimento. Piensa que es debido a un efecto de fototoxicidad. ¿Qué medidas tomaría para minimizarlo al máximo? Si pudiera emplear otro tipo de láser para reducir este efecto, ¿cuál sería y por qué?

SUPUESTO B

Un investigador del centro está desarrollando un nuevo fármaco contra el cáncer. Un colaborador le ha sugerido incluir en su estudio el análisis de las variaciones de calcio intracelular en una línea celular modelo utilizando el indicador Fura2. Fura-2 es un indicador fluorescente ratiométrico de calcio que cambia su espectro de excitación dependiendo de si se encuentra unido a Ca^{2+} . Tiene dos longitudes de excitación: ~ 340 nm cuando está unido a Ca^{2+} , ~ 380 nm cuando no se encuentra unido a Ca^{2+} . En ambos casos, la emisión se mantiene constante alrededor de 510 nm.

Para realizar este experimento, se cuenta con los siguientes equipos:

1. Microscopio invertido con lámpara de xenón, rueda de filtros de excitación rápida (340/380 nm), filtro de emisión 510 ± 20 nm, cámara CCD monocromática y software para adquisición ratiométrica.
2. Sistema de microscopía confocal con láser de argón (488 nm), láser HeNe (543 nm), detección multicanal con PMT espectral y óptica para emisión entre 500 - 700 nm.
3. Microscopio de fluorescencia con LED de excitación fijo a 470 nm, filtro de emisión de 520 nm y cámara a color RGB.

1. Entre las configuraciones A, B y C, ¿cuál es la más adecuada para llevar a cabo este experimento con Fura-2? Justifique su elección. (3 puntos)

2. Una de las hipótesis sobre el mecanismo de acción del fármaco plantea que podría alterar la organización subcelular de los microtúbulos y filamentos de actina. Para evaluar esta organización con suficiente detalle, se requiere una resolución espacial cercana a los 50 nm. Si se desea utilizar sondas fluorescentes, ¿qué tipo de microscopía sería la más adecuada para este análisis? Justifique su respuesta. (3 puntos)

3. Finalmente, se necesita obtener una imagen en alta resolución de un corte histológico completo para analizar la distribución de una señal fluorescente. Para ello, se capturan múltiples imágenes con un microscopio confocal de barrido láser usando un objetivo de 20X, cubriendo todo el corte. Posteriormente, las imágenes se ensamblan mediante software de mosaico, generando una imagen compuesta de buena calidad. Sin embargo, debido a la lentitud del proceso en el confocal, se intenta repetir la adquisición en un microscopio de campo amplio (widefield). Aunque se sigue el mismo procedimiento de captura y ensamblaje, el resultado final muestra un efecto de cuadriculado, correspondiente a los límites de cada campo visual con el objetivo 20X, algo que no ocurriría con el confocal. ¿Por qué se presenta este efecto en el sistema de campo amplio y no en el confocal? ¿Cómo podría eliminarse este artefacto? Justifique su respuesta. (4 puntos)

SUPUESTO C

Dentro del proyecto en el que estás trabajando actualmente te corresponde poner a punto la generación de organoides. Entre los ensayos de caracterización está prevista una inmunofluorescencia multiplex para verificar la diferenciación celular. Por el momento has de usar los anticuerpos que se encuentran actualmente en el laboratorio y que se detallan en la tabla. ¿Cómo los combinarías para obtener el mayor número de marcajes posibles? ¿En qué se basa su elección? Justifique su respuesta. (10 puntos)

Anticuerpos primarios

Antígeno	Especie
Anti-SOX2	Ratón
Anti-TUJ1 (β III-tubulina)	Conejo
Anti-CK19	Cabra
Anti-Nestin	Pollo
Anti-GFAP	Ratón
Anti-OCT4	Conejo
Anti-CD44	Cabra
Anti-MAP2	Conejo

Secundario	Fluoróforo	Anti-Especie	Especie del secundario
Goat anti-Mouse IgG	Alexa 488	Ratón	Cabra
Donkey anti-Mouse IgG	Alexa488	Ratón	Burro
Donkey anti-Rabbit IgG	Alexa 568	Conejo	Burro
Goat anti-Rabbit IgG	Alexa 568	Conejo	Cabra
Goat anti-Rabbit IgG	Alexa 594	Conejo	Cabra
Donkey anti-Goat IgG	Alexa647	Cabra	Burro
Chicken anti-Goat IgG	Alexa647	Cabra	Pollo
Donkey anti-Chicken IgY	Alexa 405	Pollo	Burro

