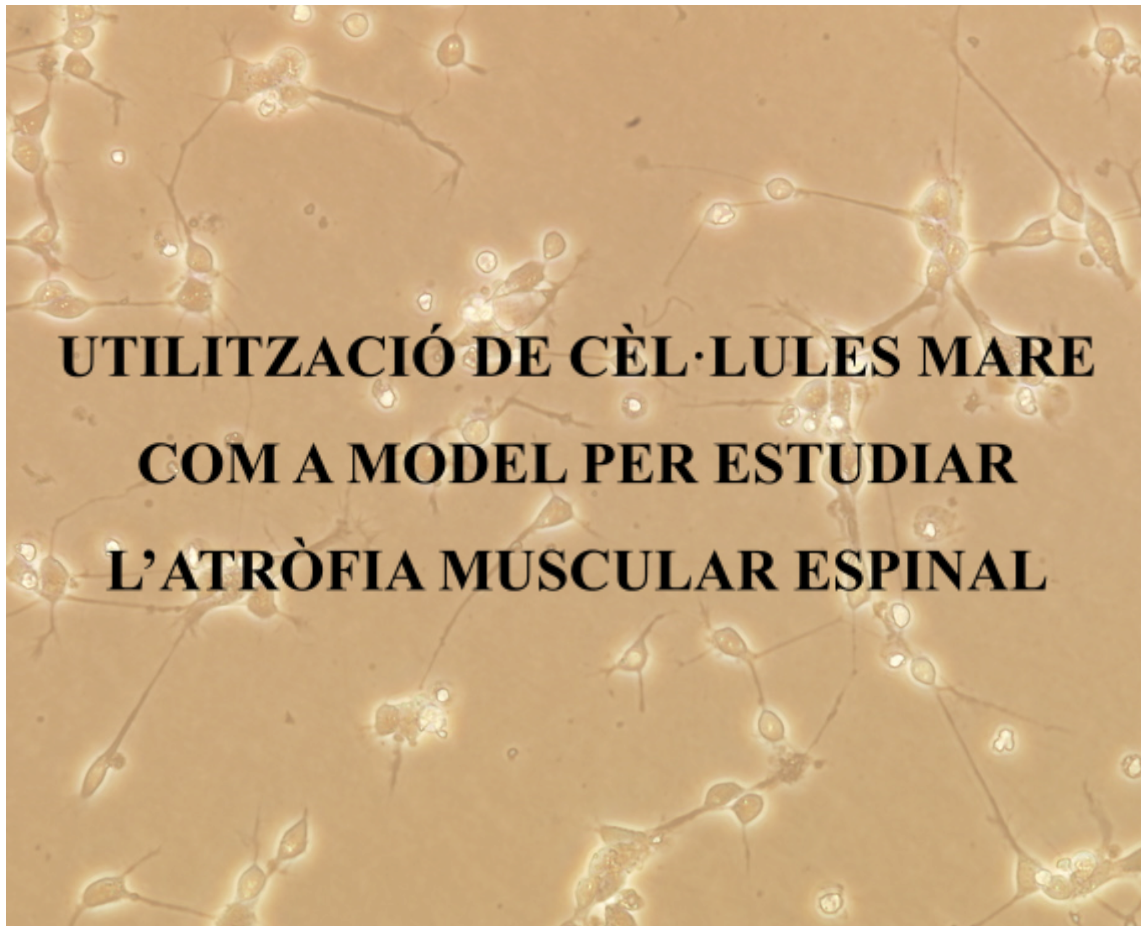


CURS 2020 / 2022



**UTILITZACIÓ DE CÈL·LULES MARE
COM A MODEL PER ESTUDIAR
L'ATRÒFIA MUSCULAR ESPINAL**

AUTORA: Poma

Curs: 2020/22

Grup: 2n BATX

Branca: Ciències de la Salut

En primer lloc, voldria agrair a la meva tutora per estar-me ajudant de manera contínua en l'elaboració del meu treball. Així mateix, agraeixo als professionals de l'IRB Lleida per haver tingut paciència i explicar-me amb detall tots els procediments realitzats al laboratori. Ha sigut una experiència inoblidable i molt útil per la meva recerca i experimentació.

També voldria destacar l'ajuda que m'han donat els companys universitaris amb qui vaig poder compartir les pràctiques a l'IRB.

Finalment, m'agradaria reconèixer el suport i empatia que m'ha transmès la meva família durant la realització del treball.

Moltes gràcies!

<<La medicina és una ciència de la incertesa i un art de la probabilitat. >>

William Osler (1849-1919) Metge canadenc.

<<Allà on s'estima l'art de la medicina s'estima també a la humanitat. >>

Plató (427aC-347aC) Filòsof grec.

ABSTRACT

L'Atròfia Muscular Espinal (AME) és una malaltia minoritària que es caracteritza per ser neurodegenerativa. Aquest desordre genètic afecta majoritàriament als infants provocant-los debilitat muscular. La causa principal d'aquesta malaltia és la mutació del gen Survival Motor Neuron 1 (SMN1) que desencadena una disminució de la proteïna SMN, fet que impedeix que les motoneurons de la medulla espinal funcionin correctament. L'objectiu del meu treball consisteix en utilitzar cèl·lules mare per tal de buscar models per estudiar l'AME. Aquest tipus de cèl·lules tenen una alta capacitat de diferenciació i són un punt clau per descobrir nous tractaments. A partir de cèl·lules mare pluripotents induïdes obtindrem neurones motores, les quals ens permetran comparar els nivells de la proteïna SMN i Gemin3 en la condició AME respecte el control.

La Atrofia Muscular Espinal (AME) es una enfermedad minoritaria que se caracteriza por ser neurodegenerativa. Este desorden genético afecta mayoritariamente a los niños y niñas provocandoles debilidad muscular. La causa principal de esta enfermedad es la mutación del gen Survival Motor Neuron 1 (SMN1) que desencadena una disminución de la proteína SMN, cosa que impide que la motoneuronas de la médula espinal funcionen correctamente. El objetivo de mi trabajo consiste en utilizar células madre con la finalidad de buscar modelos para estudiar la AME. Este tipo de células tienen una alta capacidad de diferenciación y son un punto clave para descubrir nuevos tratamientos. A partir de células madre pluripotentes inducidas obtendremos neuronas motoras, las cuales nos permitirán comparar los niveles de la proteína SMN y Gemin3 en la condición AME respecto al control.

The Spinal Muscular Atrophy (SMA) is a minority disease which is characterised because it is neurodegenerative. This genetic disorder affects mostly infants causing muscle weakness. The main cause of this illness is the mutation of the gene Survival Motor Neuron 1 (SMN1) that triggers a reduction of the protein SMN, an action that prevents the motor neurons of the spinal cord from working properly. The objective of my project consists in using stem cells in order to search models to study the SMA. This type of cells have a high capacity of differentiation and they are a key point so as to discover new treatments. Thanks to induced pluripotent stem cells we will obtain motor neurons which will let us compare the levels of the protein SMN and Gemin3 from the SMA conditions in contrast to the control.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
--------------------	---

MARC TEÒRIC

1. El sistema nerviós	3
1.1. Les neurones	5
1.2. Les motoneurones	7
2. Les cèl·lules mare	9
2.1. Classificació de les cèl·lules mare	10
2.2. Cèl·lules hiPSC	12
3. L'atròfia muscular espinal	13
3.1. Genètica i gens implicats	14
3.2. Tipus d'AME	16
3.3. Diagnòstic	17
3.4. L'autofàgia	18
3.5. L'apoptosi	19
4. Teràpies de cura per l'AME	20
4.1. Zolgensma	21
4.2. Spinraza	21
4.3. Evrysdi	22
4.4. Teràpia cel·lular	22
4.5. Estratègia terapèutica: la calpaina	24
4.6. Problemes ètics	25

MARC PRÀCTIC

HIPÒTESI I OBJECTIUS	26
-----------------------------	----

MATERIALS I MÈTODES	27
----------------------------	----

1. Western blot	27
2. Immunoflorescència	35
RESULTATS	37
1. Diferenciació dels progenitors AME	37
2. Anàlisi dels nivells de SMN i Gemin3	40
2.1. Cèl·lules en cultiu de ratolins	40
2.2. Neurones motores	41
DISCUSSIÓ	44
1. Medicina personalitzada	44
2. Biomarcadors	45
CONCLUSIONS	47
BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA	49
GLOSSARI	52
ABREVIATURES	57
ANNEXOS	58
Annex 1: Galeria fotogràfica	58
Annex 2: Índex d'imatges, taules i figures	65



INTRODUCCIÓ

El món de la medicina està evolucionant dia rere dia, i els avenços tecnològics estan contribuint en aquest gran canvi. Des del meu punt de vista, tots els temes relacionats amb el cos humà són de gran interès i tenen una gran importància. Tot organisme està format per cèl·lules, i aquestes desenvolupen una funció fonamental en el transcurs de l'estudi de malalties que patim els humans. Ser capaços d'extreure cèl·lules de fibroblasts i diferenciar-les en el tipus de cèl·lula que necessitem és un fet extraordinari i molt útil pel present i per un futur proper. Experimentar amb cèl·lules mare és un procés llarg i que requereix molta cura.

A l'inici de la meva adolescència em vaig encaminar cap al món de la ciència, i cada vegada em fascina més el treball realitzat per metges i biomèdics. La meva idea principal a l'hora de dur a terme el treball de recerca és informar-me sobre la utilitat que tenen les cèl·lules mare i de la gran complexitat d'aquestes. Un altre aspecte que em motiva és estudiar les conseqüències que comporten les malalties neurodegeneratives. La neurologia és una branca molt àmplia de la medicina, en la qual encara hi ha molts processos per investigar.

L'objectiu del meu treball és donar a conèixer una malaltia minoritària anomenada Atròfia Muscular Espinal i demostrar com, per mitjà d'una cèl·lula, es poden estudiar models de la malaltia per intentar cercar una cura o tractament viable. A més a més, tinc el propòsit d'aprendre i familiaritzar-me amb les tasques realitzades al laboratori. Com més coneixement adquireixi, més profitosa serà la recerca realitzada i més mèrit haurà tingut la dedicació i esforços emprats.

Un punt essencial és seguir el mètode científic per elaborar el projecte. La ciència requereix innovació i és important saber buscar els recursos pertinents per cercar allò que es vol aconseguir. Tanmateix, la formulació d'hipòtesis i objectius abans d'iniciar la recerca és crucial.



Globalment, la distribució del treball està basada en una part teòrica i una part pràctica. Afortunadament, vaig poder participar en el **Projecte Itinera** de la Universitat de Lleida (UdL). Va ser vital tenir l'oportunitat d'anar a la Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida) per realitzar les tècniques instrumentals al laboratori. Allí també he tingut una tutora assignada que m'ha permès introduir-me en el món universitari i en tots els aspectes implicats amb les cèl·lules mare i les neurones. Els conceptes relacionats amb l'Atròfia Muscular Espinal i el coneixement requerit per elaborar aquest treball no són senzills, però amb esforç sabia que podia aconseguir-ho. Tal i com diu David Odena, ciclista que pateix una miocardiopatia dilatada: "si vols, pots!".

Així doncs, prèviament a la investigació duta a terme al laboratori calia plantejar una organització de la base teòrica del treball. Seguint el consell de la meva tutora, vam acordar enfocar-nos en primer lloc amb el sistema nerviós. A partir d'aquí, la intenció ha estat endinsar-nos cap al paper que juguen les neurones en el nostre organisme i esmentar les múltiples utilitats i funcions de les cèl·lules hiPSC (cèl·lules humanes pluripotents induïdes). Tot seguit, vam decidir centrar-nos en la genètica implicada en l'AME i els tractaments que existeixen actualment per aquesta malaltia.

L'últim pas ja es basava en realitzar la investigació pertinent per tal d'obtenir neurones motores a partir de les cèl·lules hiPSC. La idea era descobrir quines proteïnes es veuen implicades en el desordre genètic estudiat; no només amb les motoneurones, sinó també amb cèl·lules de teixits de ratolins en condició AME.

En definitiva, l'objecte d'aquest treball és demostrar la varietat de biomarcadors i processos implicats en l'Atròfia Muscular Espinal. Així mateix, obtenint motoneurones a partir de cèl·lules mare de pacients amb AME s'aconseguirà el propòsit de buscar models per realitzar un estudi més profund sobre aquesta malaltia neurodegenerativa.



1. EL SISTEMA NERVIÓS

El sistema nerviós és un conjunt complet de nervis i d'unes cèl·lules especialitzades anomenades neurones. La seva funció és generar, modular i transmetre senyals per totes les diferents parts del cos humà. Aquesta propietat ens permet regular les funcions del nostre organisme, com ara la respiració o la digestió, les sensacions que experimentem i els moviments que duem a terme.

En els éssers humans el sistema nerviós es divideix en dos subsistemes en funció de certs criteris anatòmics: el sistema nerviós central i el sistema nerviós perifèric.

Classificació seguint els criteris anatòmics:	Sistema nerviós central (SNC)	Sistema nerviós perifèric (SNP)
Funció:	Rebre, integrar i correlacionar diferents tipus d'informacions sensorials. Per tant, és la font dels nostres pensaments, records i emocions.	Connectar les parts del SNC amb la resta de parts del cos humà. Aquest fet és possible gràcies als milers de nervis que en formen part.
Composició:	Està format per l' encèfal i la medul·la espinal . L'encèfal està situat a la part del crani i consta del cervell, el cerebel i el bulb raquidi .	Inclou els teixits nerviosos situats fora del SNC. També s'hi troben ganglis , que són acumulacions de teixit nerviós que contenen cossos neuronals i estan associats a nervis cranials o espinals.

Taula 1: Classificació del sistema nerviós en funció dels criteris anatòmics.

Autora: Poma.



Tenint en compte els aspectes funcionals del sistema nerviós, també és comú classificar-lo en dos grups: el sistema nerviós somàtic i el sistema nerviós autònom o vegetatiu.

Classificació seguint els criteris funcionals:	Sistema nerviós somàtic	Sistema nerviós autònom o vegetatiu
Funció:	Controlar totalment o parcialment les accions voluntàries del nostre cos.	Controlar les funcions que realitzen les nostres vísceres, glàndules i vasos sanguinis, independentment de la nostra voluntat. És a dir, és responsable dels actes involuntaris i inconscients.
Moviments que duen a terme:	<ul style="list-style-type: none"> - Acte reflex: quan la resposta s'elabora a la medul·la espinal. - Acte voluntari: la resposta s'elabora al cervell. 	<ul style="list-style-type: none"> - Moviment intestinal - Sensibilitat visceral - Batec cardíac - L'excreció - Pressió arterial
Subsistemes:	No presenta cap subdivisió.	Es divideix en dos subsistemes: <ul style="list-style-type: none"> - El simpàtic - El parasimpàtic

Taula 2: Classificació del sistema nerviós en funció dels criteris funcionals.

Autora: Poma.



1.1. LES NEURONES

Les neurones són cèl·lules que activen el nostre sistema nerviós i l'activitat elèctrica per tal d'enviar i rebre **estímuls** externs. Gràcies a les neurones tenim l'habilitat de pensar, raonar i controlar l'activitat muscular entre altres. Són la unitat bàsica funcional i estructural del sistema nerviós, i consten de 3 parts: el cos neuronal, les dendrites i els axons. S'ha estudiat que al nostre cervell hi ha uns 86 bilions de neurones aproximadament. Al moment de naixement és quan tots els individus tenen una quantitat superior de neurones, però a mesura que passen els anys aquest nombre va decreixent.

Parts principals d'una neurona :	Funció:
Cos neuronal	És el lloc on es du a terme l'activitat metabòlica.
Dendrites	Reben estímuls provinents d'altres cèl·lules.
Axons	Són responsables de transportar els potencials d'acció d'una cèl·lula de l'organisme cap a una altra neurona.

Taula 3: Parts principals d'una neurona. Autora: Poma.

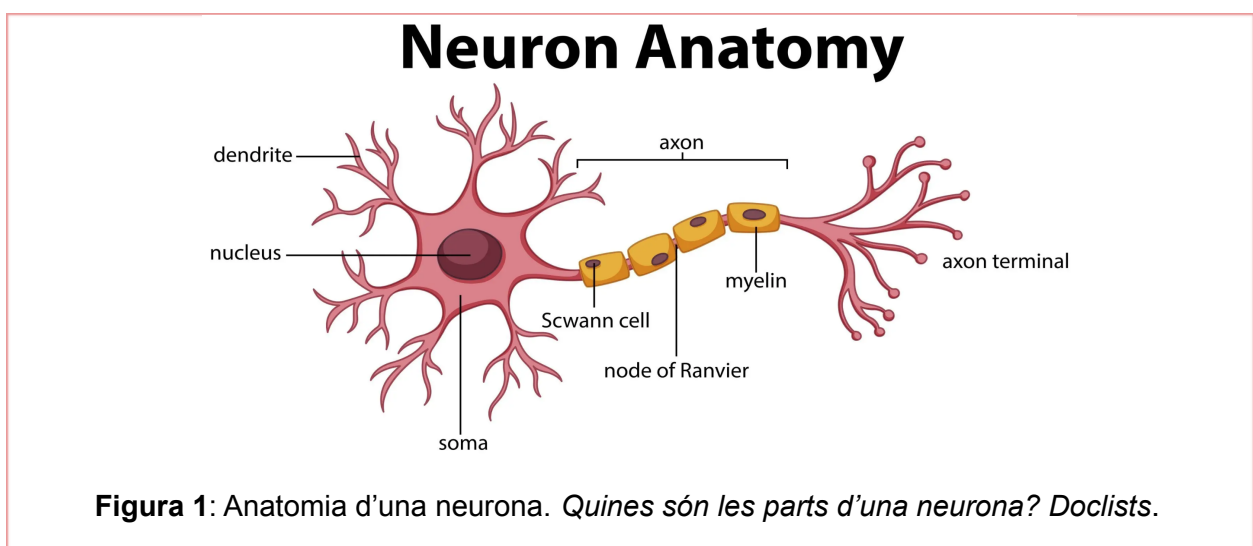


Figura 1: Anatomia d'una neurona. *Quines són les parts d'una neurona? Doclists.*

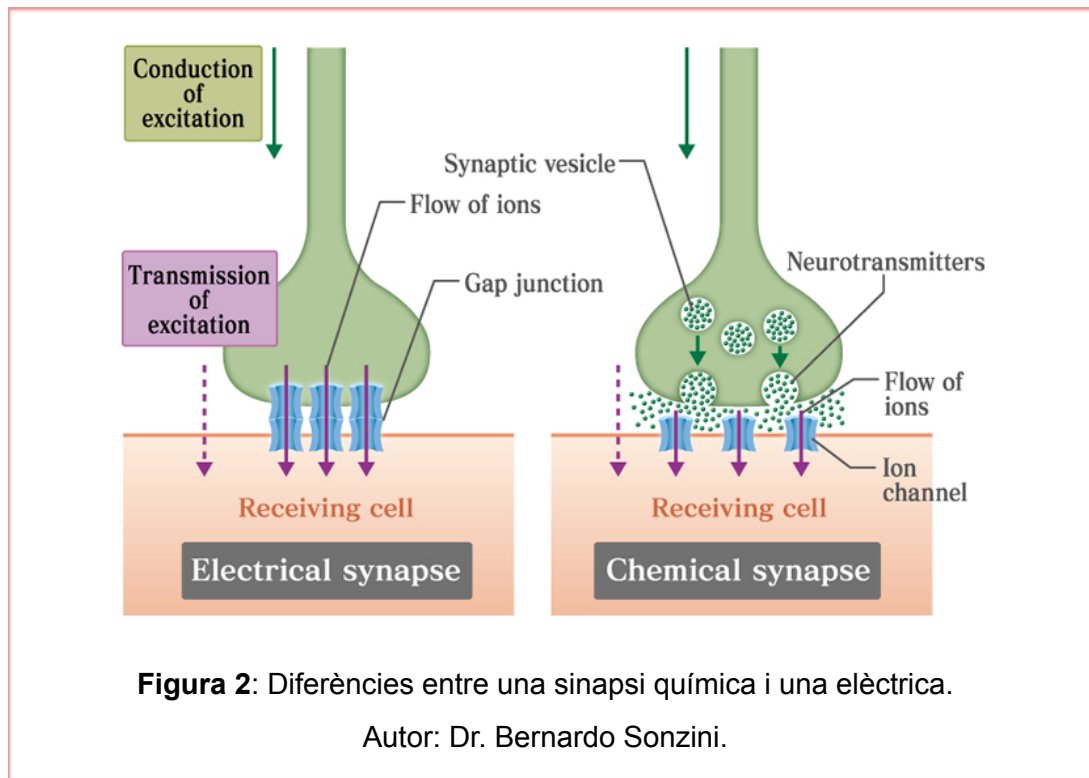


A part de les neurones, el teixit nerviós també està format per un conjunt de cèl·lules més petites i abundants anomenat neuroglia. En contrast amb les neurones, la neuroglia conserva la capacitat de dividir-se durant tota la vida, fet que provoca que sigui l'origen freqüent de tumors benignes i malignes. La neuroglia s'encarrega de mantenir les neurones al seu lloc indicat i les ajuda a funcionar correctament. Aquestes cèl·lules diminutes ocupen la meitat del volum del sistema nerviós i no tenen axons ni estableixen sinapsis.

La sinapsi és el lloc de contacte entre dues neurones o entre una neurona i un òrgan. Per tal de formar les sinapsis, els axons de les neurones creixen formant bulbs terminals, els quals contenen **vesícules sinàptiques** que emmagatzemen **neurotransmissors** químics.

Tipus de sinapsis :	Forma de transmissió de l'impuls nerviós:
Sinapsi química	A través d'unes substàncies anomenades neurotransmissors. És el tipus de sinapsi més abundant al nostre cos.
Sinapsi elèctrica	A través d'ions. En aquest tipus de sinapsi les neurones estan molt properes i l'espai sinàptic és molt petit.

Taula 4: Tipus de sinapsis. Autora: Poma.



1.2. LES MOTONEURONES

Les motoneurones són un tipus especialitzat de cèl·lules cerebrals situades dins de la medul·la espinal i el cervell, les quals formen part del sistema nerviós central (SNC). La seva activitat recau en transmetre impulsos des de la medul·la espinal fins als músculs del nostre organisme; controlant els moviments musculars. Per tant, la seva funció principal és el control muscular i locomotor. Quan el funcionament d'aquestes neurones no és eficient, pot donar-se el cas que s'hagi manifestat una malaltia neurodegenerativa com és el cas de l'Esclerosi Lateral Amiotròfica (ELA) o l'Atròfia Muscular Espinal (AME).

Segons la posició en el sistema nerviós central es diferencien dos tipus de neurones motores: les superiors i les inferiors.



Tipus de motoneurons en funció de la seva posició al sistema nerviós central:	Localització:	Neurotransmissors utilitzats per transmetre els seus senyals:
Neurona motora superior (també anomenada primera motoneurona)	Al tronc de l'encèfal i al còrtex cerebral .	Glutamat
Neurona motora inferior (també anomenada segona motoneurona)	A la medul·la espinal. Les seves terminacions s'expandeixen cap a les fibres musculars.	Acetilcolina

Taula 5: Tipus de motoneurons en funció de la seva posició al SNC.

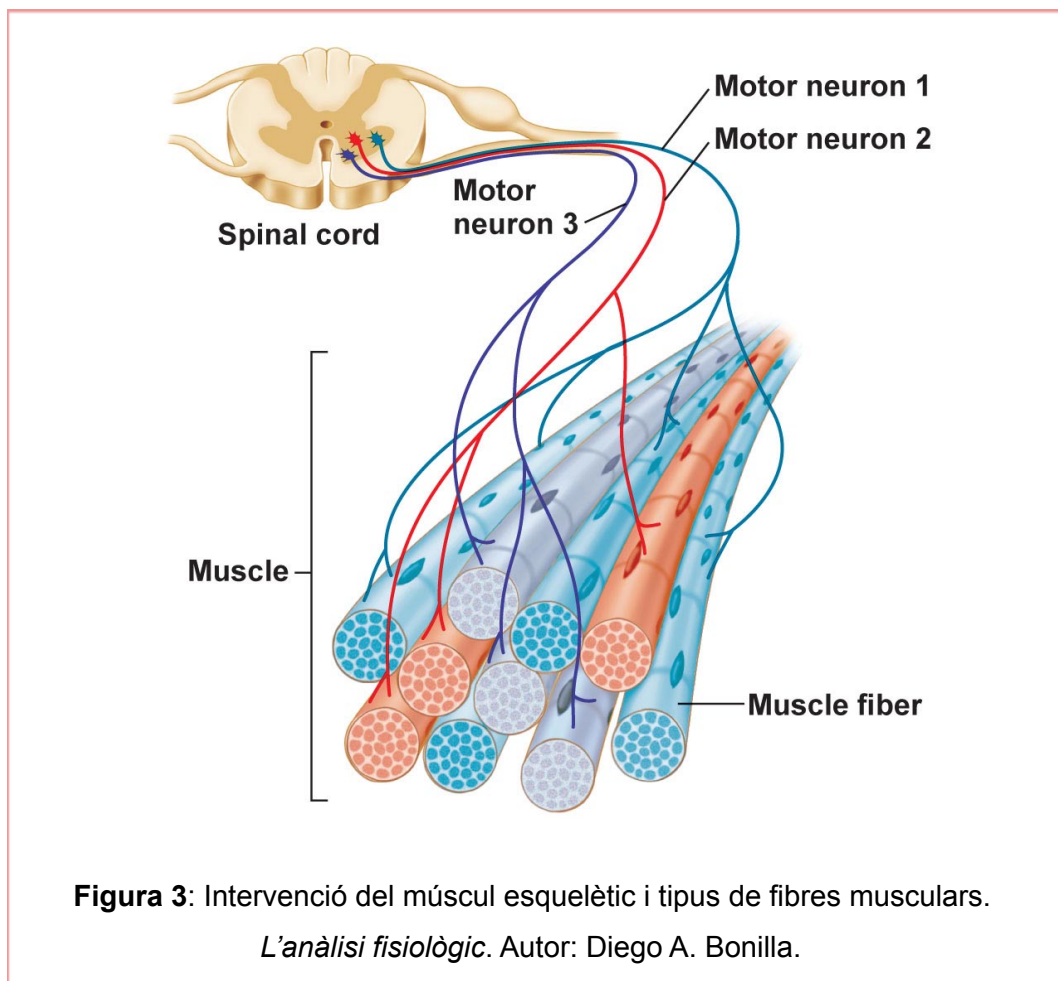
Autora: Poma.

Depenent de les fibres muscular que innerven, les motoneurons es classifiquen en: alfa, beta i gamma.

Tipus de motoneurons en funció de les fibres musculars que innerven:	Mida:	Fibres musculars que innerven:
Neurona motora alfa	Gran	Les fibres extrafusals localitzades per tot el múscul esquelètic.
Neurona motora beta	Intermèdia	Fibres intrafusals i extrafusals.
Neurona motora gamma	Petita	Fibres intrafusals que regulen la sensibilitat de la contracció muscular.

Taula 6: Tipus de motoneurons en funció de les fibres musculars que innerven.

Autora: Poma.



2. LES CÈL·LULES MARE

Les cèl·lules mare són les cèl·lules que poden donar lloc a qualsevol estirp cel·lular. Són la reserva natural del nostre cos, i cal generar-n'hi de manera constant per a què el nostre organisme segueixi funcionant de la millor manera possible. Aquestes cèl·lules es caracteritzen pel fet que no estan especialitzades. Són part del sistema de reparació del nostre cos ja que generen noves cèl·lules per reemplaçar aquelles danyades o que han mort. Són capaces de produir còpies tant de si mateixes (auto-renovació) com d'altres tipus de cèl·lules més especialitzades (diferenciació), cada vegada que es divideixen.



2.1. CLASSIFICACIÓ DE LES CÈL·LULES MARE

En funció de la capacitat de diferenciar-se en més o menys tipus cel·lulars, diferenciem quatre tipus de cèl·lules mare: les totipotents, les pluripotents, les multipotents i les unipotents.

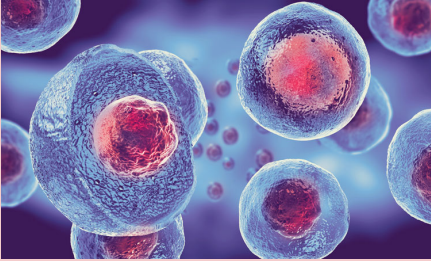

Tipus de cèl·lules mare en funció de la <u>capacitat de diferenciació</u> :	Característiques:
Totipotents	Poden donar lloc a un individu completament organitzat i estructurat. Els bessons idèntics es desenvolupen quan cèl·lules totipotents es separen per convertir-se en dos individus; els quals seran éssers humans genèticament iguals.
Pluripotents	Donen lloc a qualsevol tipus de cèl·lula, però no a un individu.
Multipotents	Només poden generar un nombre reduït de cèl·lules de l'organisme.
Unipotents	Poden diferenciar-se únicament en el tipus de cèl·lula del teixit en què es troben.

Taula 7: Tipus de cèl·lules mare en funció de la capacitat de diferenciació.

Autora: Poma.



D'altra banda, en funció del seu origen distingim dos tipus de cèl·lules mare: les adultes i les embrionàries.

Tipus de cèl·lules mare en funció del seu <u>origen</u> :	Característiques:
<p style="text-align: center;">Cèl·lules mare adultes</p>  <p>Imatge 1: Cèl·lules mare adultes. <i>Stem cell therapy.</i> Autor: Daniel González Nieto.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - No estan diferenciades. - Són multipotents, és a dir, només poden generar un nombre reduït de cèl·lules de l'organisme. - Es troben a la medul·la òssia, al teixit adipós, a la placenta i al cordó umbilical entre altres. - S'extreuen a partir d'una simple punció, la qual rep el nom de biopsia.
<p style="text-align: center;">Cèl·lules mare embrionàries</p>  <p>Imatge 2: Cèl·lules mare embrionàries. <i>Medicina regenerativa.</i> Autora: Anna Veiga</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Són presents als embrions de 5 dies després de la fecundació. - Segons els gens que s'expressen poden donar lloc a cèl·lules d'un teixit o d'un altre. - En la medicina regenerativa s'utilitzen en la reparació i regeneració de teixits danyats.

Taula 8: Tipus de cèl·lules mare en funció del seu origen.

Autora: Poma.

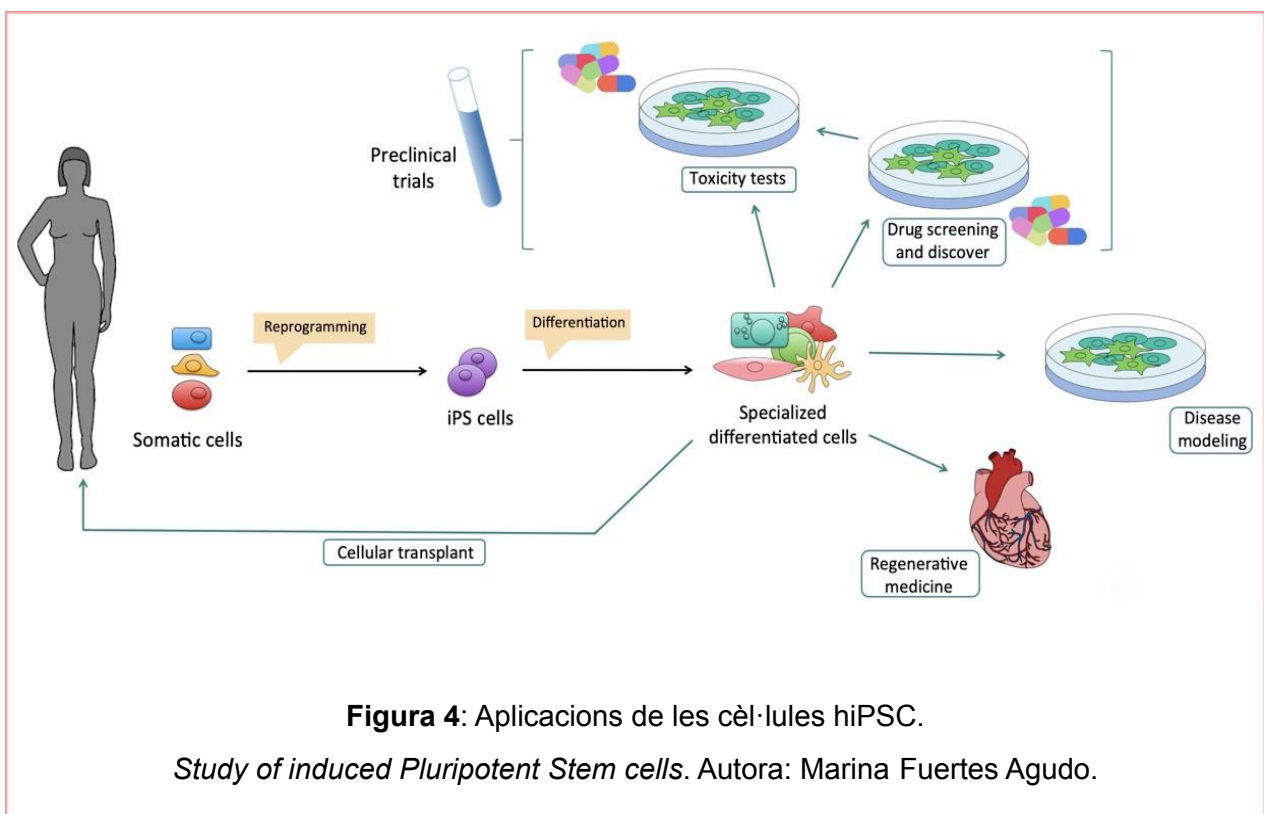


2.2. CÈL·LULES hiPSC

Les cèl·lules mare humanes pluripotents induïdes, també anomenades cèl·lules hiPSC, van ser descobertes pels doctors S. Yamanaka i J. Thomson, els quals van aconseguir transformar les cèl·lules de la pell utilitzant un **retrovirus** per inserir-hi quatre gens diferents. D'aquesta manera van obtenir cèl·lules mare pluripotents induïdes.

Les hiPSC tenen la capacitat d'originar tots els teixits del nostre cos. Presenten l'avantatge que es poden generar al laboratori a partir de cèl·lules adultes. L'inconvenient que comporten és que el virus que s'utilitza per reprogramar les cèl·lules adultes les predisposa a originar càncer i, per tant, encara no poden ser utilitzades clínicament en pacients. La seva utilitat radica en estudiar al laboratori com apareixen i es desenvolupen les malalties. Reprogramant cèl·lules adultes i fent-les pluripotents es poden aconseguir **fibroblasts** i **queratinòcits**.

Les cèl·lules hiPSC són un instrument essencial en estudis moleculars de diferents patologies genètiques. Per tant, ofereixen un model cel·lular excel·lent per estudiar malalties com l'Atròfia Muscular Espinal i possibles tractaments. A més a més, no presenten problemes ètics.





3. L'ATRÒFIA MUSCULAR ESPINAL

L'Atròfia Muscular Espinal (AME) és una malaltia neuromuscular rara que es diagnostica en uns 1.000 nens i nenes a Europa cada any. És de caràcter genètic i es manifesta per una pèrdua progressiva de la força muscular. És un desordre causat per la mutació del gen SMN1 (Survival Motor Neuron 1) i la disminució de la proteïna SMN. Les neurones motores de la medul·la espinal no tenen suficients nivells d'aquesta proteïna, i això impedeix que funcionin correctament. Aquest fet provoca que l'impuls nerviós no es pugui transmetre de manera eficient als músculs i que aquests s'atrofiïn. Les persones afectades per AME tenen dificultat per realitzar tasques bàsiques del dia a dia, com ara menjar o respirar; però aquesta malaltia no afecta l'habilitat d'una persona de pensar, aprendre i crear relacions personals. S'ha vist que les motoneurons inferiors es veuen greument afectades, fet que provoca la debilitat muscular del pacient.

Aquesta malaltia neurodegenerativa es considera la segona causa principal de malalties neuromusculars. Afecta 1:10.000 naixements i 1:50 humans en són portadors; i es dona en tots dos sexes per igual.

Les primeres observacions de la malaltia van ser realitzades per Guido Werdnig l'any 1891. Des de llavors, la malaltia es coneix com a Atròfia Muscular Espinal Infantil tipus I o Malaltia de Werdnig-Hoffmann. Més tard, l'any 1990 es va determinar la posició del locus AME en el genoma humà.



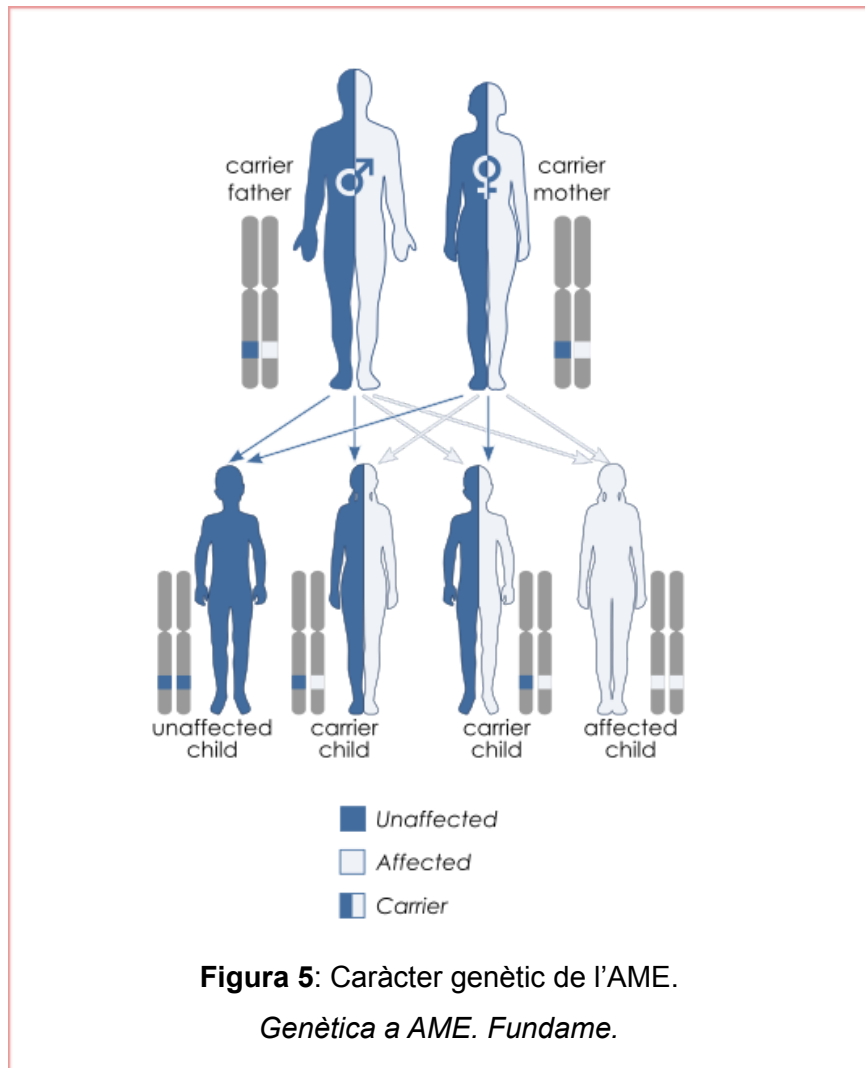
Imatge 3: Dues nenes afectades d'Atròfia Muscular Espinal.

ConSalud. FundAME



3.1. GENÈTICA I GENS IMPLICATS

L'AME és una malaltia hereditària autosòmica recessiva; ja que el gen en qüestió està localitzat en un cromosoma no sexual i perquè els dos pares han de ser portadors del gen responsable de la malaltia. Tot i que ambdós pares siguin portadors, la probabilitat de transmetre el gen defectuós radica en el 25%.



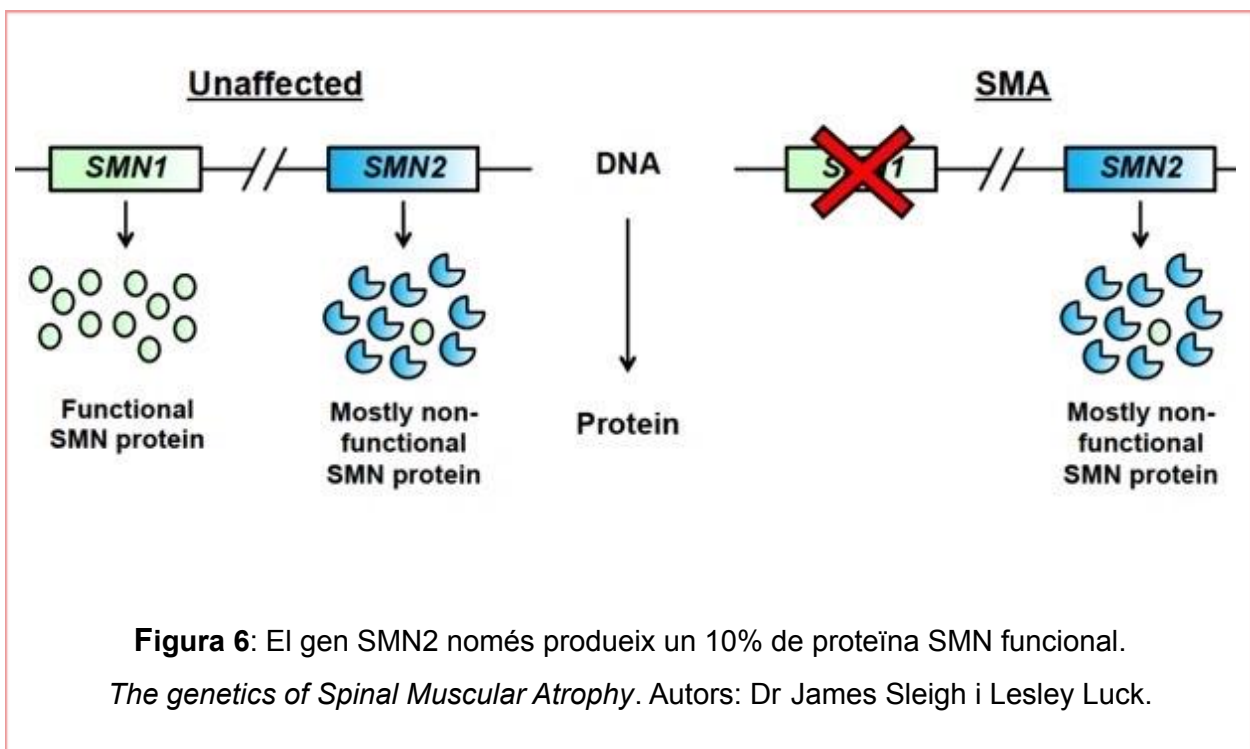
La patologia de l'AME es manifesta a causa de la deleció o mutació de pèrdua de funció del gen SMN1 (Survival Motor Neuron). Aquest gen està localitzat al braç llarg del **cromosoma 5**, concretament a la **regió telomèrica 5q13**. El SMN1 és el responsable de la producció de la proteïna SMN. Teòricament, les persones sanes tenen dues còpies del gen SMN1.



La SMN és una proteïna de supervivència de les motoneurons, la qual és essencial per al funcionament dels nervis que controlen els nostres músculs. L'any 1995 es va descobrir que els éssers humans tenim un homòleg del gen SMN1 en la zona centrònica del cromosoma, anomenat SMN2 (Survival Motor Neuron 2). El gen SMN2 només produeix un 10% de proteïna funcional SMN i, en canvi, el gen SMN1 n'hi produeix el 100%.

La diferència entre aquests dos gens és un canvi de **nucleòtid** en l'exó 7, ja que en el gen SMN2 hi ha un canvi d'una citosina per una timina. Aquest canvi provoca una alteració en l'**enhancer d'splicing exònic**, fet que provoca que el 90% dels transcrits tinguin l'exclusió de l'exó 7 en el RNAm i això desencadena la producció d'una proteïna més curta, inestable i amb poca funcionalitat. Tot i així, el 10% dels transcrits restants fabriquen un adequat splicing en què el RNAm inclou l'exó 7 i es genera la proteïna SMN funcional.

S'ha vist que les persones amb més còpies de SMN2 acostumen a tenir una forma menys greu de l'AME que aquelles amb poques còpies. En el cas que un pacient tingués l'absència completa de la proteïna SMN, aquest moriria ja que la seva forma de malaltia seria letal.





3.2. TIPUS D'AME

Aquesta malaltia es classifica en diferents tipus depenent de la gravetat dels símptomes experimentats, l'edat d'aparició, l'evolució i el número de còpies de SMN2.

Tipus d'Atròfia Muscular Espinal:	Edat d'aparició:	Esperança de vida:	Símptomes:
Tipus I o Malaltia de Werdnig-Hoffman (50-60% dels casos)	Primers 6 mesos de vida	< 2 anys	<ul style="list-style-type: none"> - Debilitats muscular greu - Incapacitat de sostenir el cap i de mantenir-se asseguts - Dificultat per respirar i alimentar-se - Hipotonia - Tremolors
Tipus II o Forma intermitja (30% dels casos)	Entre 6 i 18 mesos de vida	> 2 anys	<ul style="list-style-type: none"> - Debilitat muscular progressiva - Capacitat de mantenir-se asseguts però no de plantar-se - Hipotonia - Areflèxia - Feblesa en les extremitats - Risc de patir escoliosis
Tipus III o Malaltia de Kugelberg-Welander (10-20% dels casos)	18 mesos de vida	Solen arribar a l'edat adulta	<ul style="list-style-type: none"> - Extremitats inferiors més atrofiades que les superiors - Pèrdua d'habilitats funcionals - Capacitat de caminar i mantenir-se de peu, però amb caigudes freqüents



Tipus IV o Forma adulta (1-5% dels casos)	> 30 anys	Normal	<ul style="list-style-type: none"> - Debilitat muscular - Tremolors - Espasmes Els símptomes avancen lentament.
---	-----------	--------	--

Taula 9: Tipus d'Atròfia Muscular Espinal. Autora: Poma.

3.3. DIAGNÒSTIC

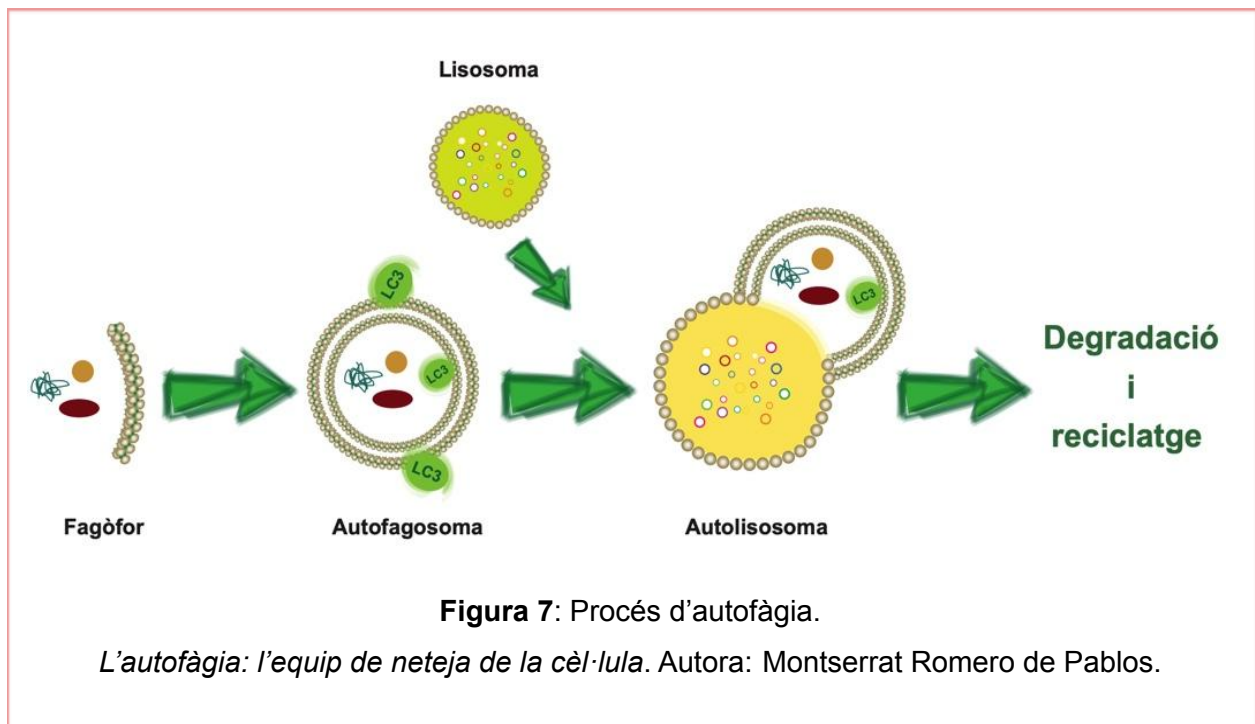
Donat el cas que s'expressi algun tipus de simptomatologia d'aquesta malaltia neurodegenerativa, es realitza un estudi electromiogràfic (EMG) per determinar l'afectació de la segona motoneurona (neurona motora inferior). Una vegada demostrat, s'ha de dur a terme un estudi genètic per tal de documentar si hi ha una **deleció** de l'exó 7 als dos al·lels del gen SMN1. Han de passar entre unes 2 i 4 setmanes per tal d'obtenir els resultats d'aquesta prova. En el cas que el diagnòstic sigui positiu per l'Atròfia Muscular Espinal, els metges indicats hauran de comunicar a la família i a l'infant afectat tots els requisits i inconvenients que comporta conviure amb aquesta malaltia. El pacient haurà de fer visites periòdiques a un neuropediatra o neuròleg, cardiòleg, nutricionista, rehabilitador i traumatòleg.

L'Aliança europea demana al govern d'Europa que inclogui una prova d'Atròfia Muscular Espinal en els programes nacionals de cribratge neonatal. Detectar la malaltia just al néixer permetrà que l'infant no desenvolupi símptomes severos ni discapacitats significatives. Es preveu que al 2025 tots els nens seran examinats d'AME i se'ls iniciarà el tractament requerit de manera immediata. El fet que es pugui detectar aquesta mutació genètica en l'etapa primerenca salvarà la vida de molts nounats i conduirà a resultats significativament millors. L'objectiu principal d'aquesta Aliança és reduir el temps que es tarda a diagnosticar un nen amb AME.



3.4. L'AUTOFÀGIA

L'autofàgia és un procés regulat responsable de la degradació de les proteïnes i dels orgànuls del citoplasma. S'encarrega d'incorporar els orgànuls i proteïnes danyats en una vesícula amb doble membrana denominada autofagosoma, que és enviada cap al **lisosoma**. Abans de la formació d'aquesta vesícula, s'origina un petit sac membranós anomenat fagòfor. L'autofagosoma es fusiona amb el lisosoma, el qual consta d'**enzims** hidrolítics que poden degradar el contingut de l'autofagosoma. Com a resultat d'aquesta unió en deriva l'autolisosoma, que conté els productes originats per la degradació.



Després que el científic Christian de Duve i el seu equip descobrisin el lisosoma, es van identificar diversos reguladors de l'autofàgia. Es va comprovar que la proteïna associada a **microtúbuls** (LC3) serveix per mesurar els nivells d'autofàgia i es troba a la membrana del lisosoma.



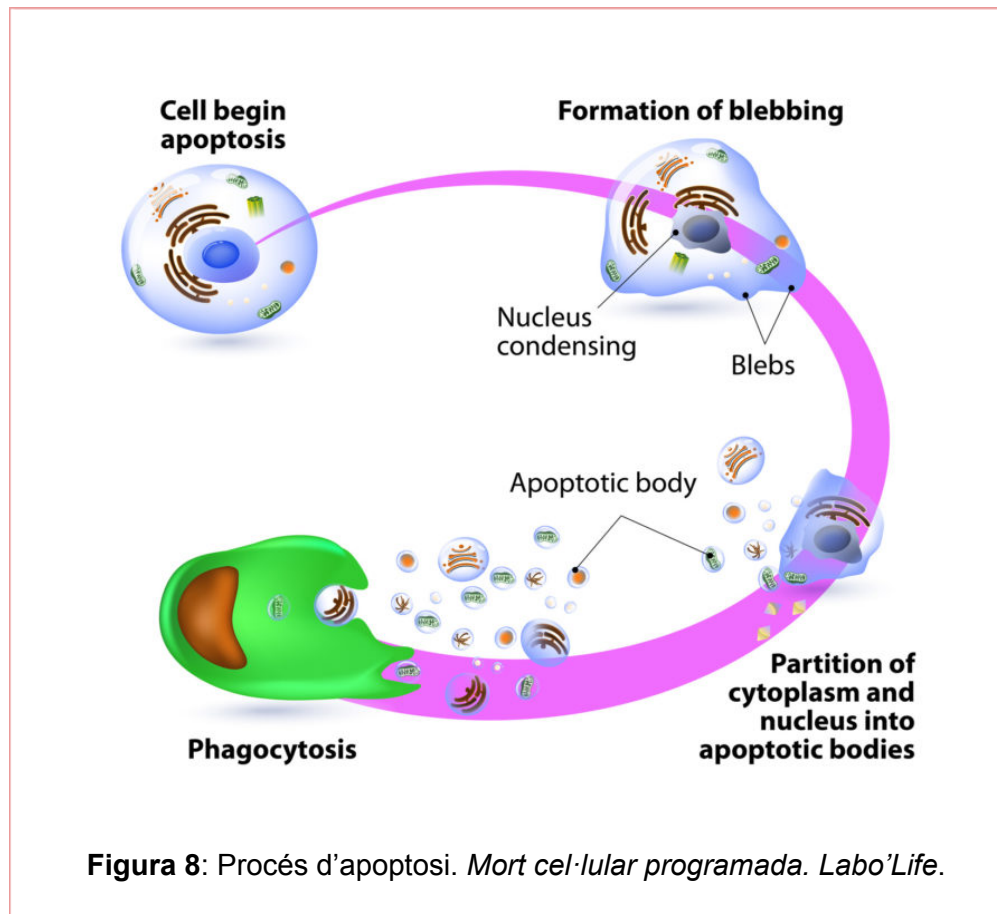
Per altra banda, s'ha demostrat que en éssers humans certes alteracions en el procés d'autofàgia estan relacionades amb diverses malalties com l'obesitat, la diabetis tipus 2, el càncer i les malalties neurodegeneratives. En els pacients amb Atròfia Muscular Espinal, l'autofàgia està involucrada en la mort de les motoneurons.

3.5. L'APOPTOSI

L'apoptosi és un tipus de mort cel·lular programada típica dels organismes pluricel·lulars. Aquest mecanisme permet que les cèl·lules danyades s'autoeliminin controladament en diferents situacions. Per a que s'activi l'apoptosi és imprescindible l'activitat proteasa d'unes proteïnes, com ara les nucleases o les caspases. Aquestes proteïnes tenen una funció essencial en aquest procés ja que generen canvis morfològics i bioquímics a les cèl·lules a les quals els provoquen la mort per apoptosi. L'apoptosi té dues vies d'activació: la via extrínseca, la qual s'activa per mitjà de proteïnes extracel·lulars anomenades lligands, i la via intrínseca, que s'activa en contacte amb senyals intracel·lulars.

	Avantatges	Inconvenients
Apoptosi	<ul style="list-style-type: none"> - Evita l'acumulació de cèl·lules no funcionals als teixits. - Intervé en processos de creixement. - Desenvolupament embrionari. - Homeòstasi cel·lular. - Funcionament del sistema immunitari. - Control del cicle cel·lular. 	<ul style="list-style-type: none"> - Un excés d'apoptosi pot originar alteracions neurodegeneratives. - Una falta d'apoptosi provoca l'acumulació de cèl·lules als teixits, fet que pot desencadenar a l'aparició de càncer o determinades infeccions virals.

Taula 10: Avantatges i inconvenients de l'apoptosi. Autora: Poma.



4. TERÀPIES DE CURA PER L'AME

Avui en dia, s'intenta buscar intervencions de cura terapèutiques per a l'AME augmentant els nivells de la proteïna SMN. L'inconvenient és que això només s'ha pogut aconseguir en un període breu de temps; en el qual es formen les sinapsis i es regulen les unions neuromusculars.

L'objectiu central de les teràpies és incrementar els nivells de la proteïna funcional SMN, la qual afavorirà la supervivència de les motoneurons. Així mateix, hi haurà una millora en el funcionament dels nervis que controlen els músculs.



S'ha vist que per millorar la qualitat de vida dels pacients és recomanable prendre relaxants musculars, els quals són efectius per controlar els espasmes i les contraccions musculars. L'eficàcia dels relaxants musculars es deu a que són capaços de regular la força i la intensitat dels senyals nerviosos i de controlar la velocitat de transmissió. Uns exemple d'aquests tipus de relaxants són: Alprazolam, Baclofen, Tizanidine i Botox.

4.1. ZOLGENSMA

L'Organisme Regulador d'Aliments i Fàrmacs nord-americà ha aprovat una teràpia gènica per a l'AME, anomenada Zolgensma, indicada per a nens de menys de 2 anys afectats pel tipus I de la malaltia. Aquest tractament farmacològic és el més car avui en dia, amb un preu de 2,1 milions de dòlars.

Zolgensma és una teràpia gènica basada en **adenovirus** genèticament modificats, els quals transporten la còpia correcta del gen deficitari dels afectats per AME. Una infusió intravenosa d'aquest adenovirus possibilita una millora en la funció motora de l'infant, com ara poder aixecar el cap o romandre assegut. La duració d'aquesta injecció és d'una hora, però té l'avantatge que aquest tractament només requereix una única dosi. És important fer la injecció intravenosa aviat, en els primers mesos de vida, perquè com més temps es deixa passar hi ha més motoneurons que es deterioren, de manera que en queden poques de funcionals. Un altre factor rellevant és la forma com s'ha aconseguit el tractament ja que en l'actualitat ja és possible duplicar un gen fora del cos. S'aconsegueix que el gen funcionant produeixi al lloc adequat la proteïna SMN amb normalitat.

4.2. SPINRAZA

L'any 2016 es va autoritzar un medicament per l'Atròfia Muscular Espinal anomenat Nusinersen, el qual està registrat com Spinraza. Nusinersen és un **oligonucleòtid** anti-sentit associat al cromosoma 5q, el qual conté informació per a la síntesi de la proteïna SMN. Spinraza és el segon medicament desenvolupat amb la biotecnologia



del “ARN anti-sentit”. El primer any de tractament té un cost d'uns 750.000\$; preu comparable a d'altres medicaments de malalties minoritàries.

Aquest medicament s'injecta per mitjà d'una injecció intratecal, la qual s'insereix directament al **líquid cefaloraquidi** a través de la part inferior de l'esquena. Els pacients reben quatre dosis carregades entre els dos primers mesos de tractament. Seguidament, se'ls fa un manteniment de dos dosis cada quatre mesos durant tota la vida de l'individu. Al igual que tots els altres tractaments, com més aviat es rep la primera dosi de Spinraza, es manifesten més significativament els resultats previstos i menys avança la malaltia.

4.3. EVRYSDI

Recentment, el dia 30 de març de 2021, la Comissió Europea va aprovar el tractament anomenat Evrysdi, també conegut com *Ridisplam*. Evrysdi es tracta d'una dosi diària oral per a pacients de 2 mesos d'edat o més amb Atròfia Muscular Espinal. Aquest tractament es basa en un líquid que els pacients es prenen a casa. És apte per aquells que tenen un diagnòstic clínic confirmat del tipus I, II o III d'AME, o pels qui porten d'una a quatre còpies del gen SMN2.

La finalitat de Evrysdi és corregir l'anomenat *alternative splicing*; mecanisme essencial per augmentar la complexitat de l'expressió de gens. Injectant les dosis pertinents d'aquest medicament s'aconsegueix evitar que les cèl·lules perdin l'exó 7 de la seqüència de RNAm; de manera que es restableix part de la producció de proteïna SMN funcional.

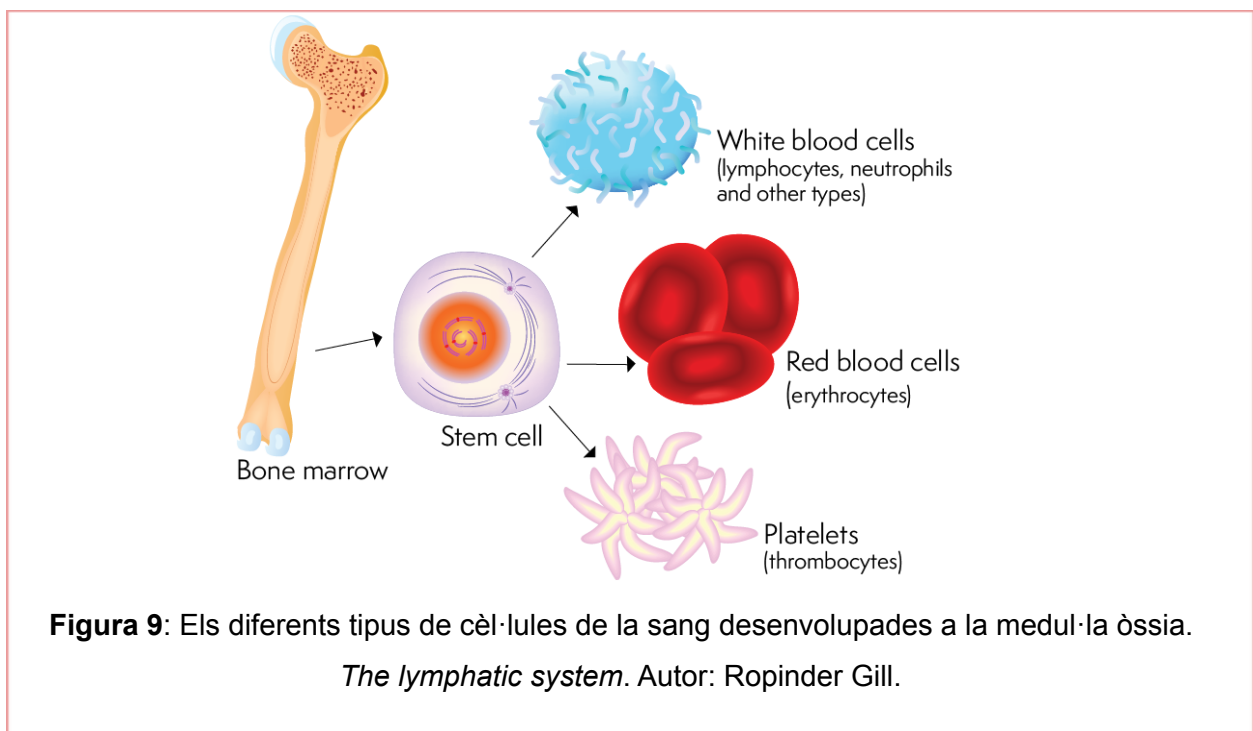
4.4. TERÀPIA CEL·LULAR

Una teràpia cel·lular consisteix en generar cèl·lules diferenciades a partir de cèl·lules mare i trasplantar-les al pacient. Com que les cèl·lules mare són extretes del propi pacient, s'evita el rebuig per histocompatibilitat, com podria succeir en un transplant d'òrgans. L'objectiu d'aquestes teràpies és saber com generar un teixit determinat a partir d'una cèl·lula mare i després obtenir-ne un òrgan concret. Les cèl·lules mare que s'estan utilitzant més en aquestes teràpies són les pluripotents i les adultes.



Tenint en compte les millores que han comportat les teràpies cel·lulars en el món de la Medicina, el transplant de medul·la òssia ha sigut el descobriment més recentment profitós. Gràcies a les cèl·lules mare s'han aconseguit guarir malalties de la sang i el sistema immunitari, com ara la **leucèmia**, el **limfoma** i el **mieloma**. Malauradament, encara no hi ha prou fiabilitat de certes teràpies cel·lulars, però malalties com la diabetis podrien ser tractades.

El fet de poder transformar cèl·lules mare en cèl·lules diferenciades ha animat a molts científics a descobrir tractaments per a malalties neurodegeneratives. Per exemple, s'està experimentant amb diferents assaigs clínics per comprovar la seva eficàcia.





4.5. ESTRATÈGIA TERAPÈUTICA: LA CALPAINA

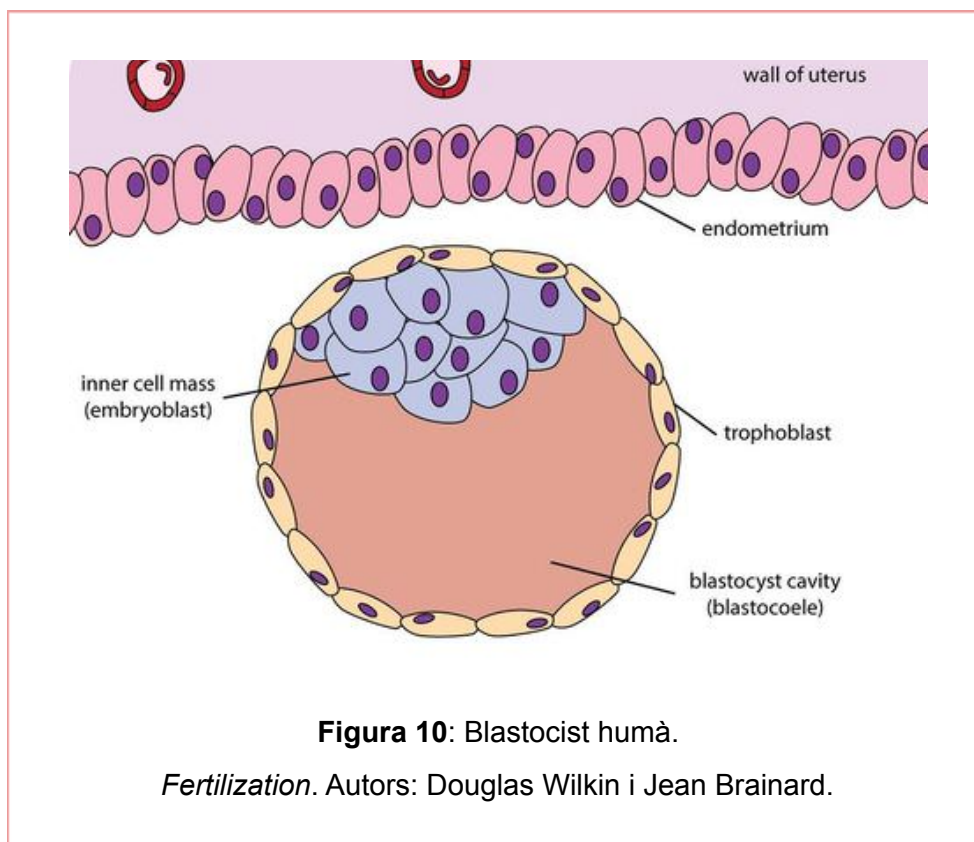
La calpaina és un enzim, concretament una proteasa regulada amb calci, que proteolitza les proteïnes en unitats més petites, i que s'ha relacionat amb trastorns neurodegeneratius, processos d'envelliment neuronal i lesions neuronals. S'han fet experiments amb l'inhibició de calpaina en ratolins i en cèl·lules humanes per intentar crear tractaments per l'Atròfia Muscular Espinal. La seva inhibició pot tenir un efecte beneficiós en el **fenotip** de la malaltia ja que influeix en la supervivència de les motoneurons i redueix l'acumulació d'autofagomes en les prolongacions de la cèl·lula. L'augment de calci citosòlic en les neurones activa les calpaines, i algunes condicions patològiques solen provocar la seva reacció excessiva. En contrast, l'activitat de la calpaina no s'ha vist incrementada en els fibroblasts dels pacients amb AME.

L'inhibidor farmacològic de la calpaina és la calpeptina. El grup de recerca Unitat de Senyalització Neuronal de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida) i la Universitat de Lleida (UdL), que han realitzats aquests experiments i han descobert aquest avenç, han sol·licitat l'ús de calpeptina pel tractament de l'AME.



4.6. PROBLEMES ÈTICS

L'ús de cèl·lules mare embrionàries (CME) comporta molta controvèrsia ja que la seva preparació requereix la destrucció d'embrions. Les CME es generen a partir de cèl·lules de blastocist humà, que és una de les fases primerenques de la vida humana. El blastocist està format per unes 100 cèl·lules, i és l'evolució de l'òvul fecundat. Si no s'implanta a l'úter, només pot sobreviure un breu període de temps. Els laboratoris i clíniques de fertilitat cultiven i aïllen blastocists per obtenir aquestes cèl·lules.



Hi ha creences religioses que consideren que una vegada l'òvul i l'espermatozoide han fecundat, el zigot resultant ja es considera una persona. Arran d'això, molts creients s'oposen a l'ús d'aquest tipus de cèl·lules ja que, ni que l'objectiu d'utilitzar-les sigui salvar a un pacient o millorar-li les condicions de vida, no és èticament correcte acabar amb la vida d'un embrió. Per evitar problemes ètics es recorre a la reprogramació de cèl·lules somàtiques per produir cèl·lules hiPSC.



HIPÒTESI I OBJECTIUS

Seguint el mètode científic, m'he plantejat dues hipòtesis i les he experimentat al laboratori per verificar-ne la certesa o no d'aquestes:

- I. Les cèl·lules hiPSC tenen una alta capacitat de diferenciació en molts tipus cel·lulars. En el cas de les cèl·lules hiPSC obtingudes de pacients amb AME, és possible que puguem diferenciar-les en motoneurons.
- II. En la condició AME s'observa una disminució dels nivells de la proteïna SMN. Aquesta reducció podria implicar modificacions dels nivells d'altres proteïnes del complex SMN, com la Gemin3.

En relació als objectius que m'he marcat en el meu treball de recerca, m'he centrat en:

- Realitzar diverses tècniques al laboratori analitzant la proteïna SMN i el complex Gemin3.
- Establir les diferències morfològiques, funcionals i/o biològiques de les neurones motores afectades per AME respecte les control.
- Investigar els mètodes que poden ser d'ús útil per buscar tractaments de malalties neurodegeneratives.
- Estudiar les aplicacions que tenen les cèl·lules mare pluripotents induïdes i la seva alta capacitat de diferenciació.



MATERIALS I MÈTODES

Durant la meva estada a l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida he estat realitzant diverses pràctiques al laboratori per tal de poder extreure certes conclusions i així demostrar les meves hipòtesis o bé rebutjar-les. Les tècniques dutes a terme han estat un Western Blot i una immunofluorescència. A més a més, hem estat controlant la diferenciació de progenitors AME i els hem estat canviant el medi de manera adequada per tal d'obtenir motoneurons.

1. WESTERN BLOT

Un Western Blot és una tècnica realitzada al laboratori que consisteix en detectar una proteïna específica en una mostra. La seva elaboració implica la preparació d'un gel d'acrilamida, el qual és necessari per realitzar l'electroforesi per separar les proteïnes. Un cop s'han separat les proteïnes, aquestes es transfereixen a una membrana que s'exposa a un anticòs específic. Per identificar la unió de l'anticòs amb la proteïna s'utilitza un marcador químic.

Al laboratori de l'IRB Lleida vam realitzar un Western Blot a partir de cèl·lules en cultiu de músculs de ratolins afectats per AME. Aquestes cèl·lules pertanyen a la línia cel·lular C2C12. L'objectiu era identificar la proteïna Gemin3, que forma part del complex SMN.

Per dur a terme aquesta tècnica vam seguir els passos indicats al protocol:

Sonicació

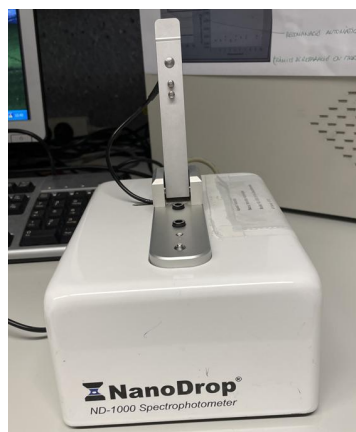
Es fa mitjançant una màquina anomenada soniprep que trenca les estructures cel·lulars i homogeneïtza la mostra. S'aplica tres vegades una sonicació de 10 segons per mostra a 6KHz.



Imatge 4: Soniprep de l'IRB Lleida. Autora: Poma.

Quantificació

Es fa per mitjà d'un nanodrop; un aparell que llegeix l'absorbància de les proteïnes de la mostra. S'aplica una longitud d'ona de 280 nm i es posen 2µl de H₂O milliQ per comprovar que l'aparell funciona correctament. Cal posar 2µl de cada mostra i mesura d'absorbància en mg/ml.



Imatge 5: NanoDrop de l'IRB Lleida. Autora: Poma.



Preparació del gel

1. Muntar les plaques d'1mm al suport i afegir H₂O milliQ per comprovar si està ben col·locat.
2. Preparar el gel separador i concentrador en dos recipients per separat:

	H ₂ O	Tris-HCl	Acrilamida	SDS	PSA	TEMED
Gel separador 8%	4,64ml	2,5ml (pH=8,8)	2,66ml	100µl	80µl	10µl
Gel concentrador 4%	3,6ml	1,5ml (pH = 6,8)	0,8ml	60µl	40µl	10µl

Taula 11: Preparació del gel separador i concentrador. Autora: Poma.

3. Afegir el separador a les plaques i posar isopropanol per a què quedi llis.
4. Deixar polimeritzar i posar el concentrador.

Electroforesi

1. Preparar les mostres; tenint en compte que el volum final que hem d'obtenir és de 30 µl per mostra.

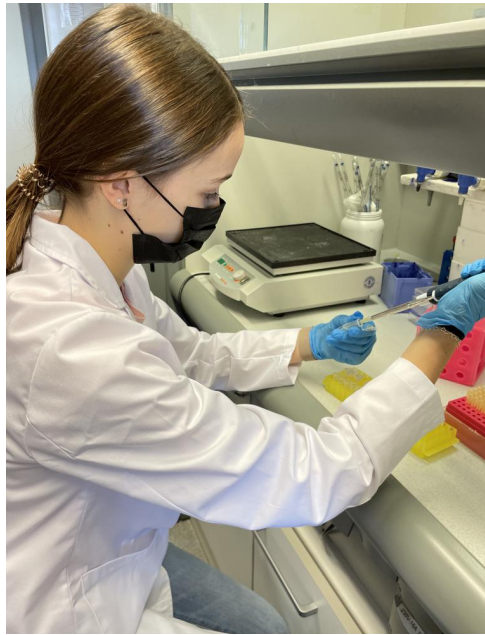
	Quantificació (mg/ml):	Quantitat de mostra (µl):	LB1x (µl):	LB5x (µl):
FSV1	2,88	13,9	10	6
Sh SMN1	1,52	26,3	-	6
FSV2	1,97	20	4	6
Sh SMN2	1,24	24	-	6

Taula 12: Preparació de les mostres. Autora: Poma.



Els virus controls són els FSV. En canvi, les cèl·lules shSMN procedeixen de la línia cel·lular C2C12 i estan tractades amb virus per disminuir l'expressió de la proteïna SMN.

Per preparar el LB1x fem una dissolució de 100 μ l de LB5x i 400 μ l de *lysis buffer*.



Imatge 6: Preparació del LB1x. Autora: Poma.

2. Afegir un buffer de càrrega a totes les mostres per ajudar a les proteïnes a desplegar-se i permetre que estiguin carregades amb les mateixes condicions.
3. Deixar les mostres 5 minuts a escalfar a 95°C i centrifugar-les amb un *short spin*.
4. Carregar les mostres per tal de separar les proteïnes. Prèviament s'ha d'envoltar el gel amb *running buffer*, i amb l'ajuda d'una agulla es posa aquest producte a dins de cada pou on es dipositen les mostres.

Al pou 2 i 7 cal posar 25 μ l de marcador, el qual es prepara amb 8 μ l de *all blue* diluït en 42 μ l de LB1x. Al pou 1, 8, 9 i 10 es posa 30 μ l de LB1x, i del 3 al 6 es posa a cada un 30 μ l de la mostra pertinent.



5. Connectar els cables al corrent amb un amperatge constant de 15mA per membrana. Amb aquest procés es separen les proteïnes i tarda 1 hora aproximadament. Aquelles proteïnes que tinguin un pes molecular inferior avançaran més que les que són més pesants.



Imatge 7: Gel amb les mostres carregades. Autora: Poma.

Transferència

Es passen totes les proteïnes del gel a la membrana.

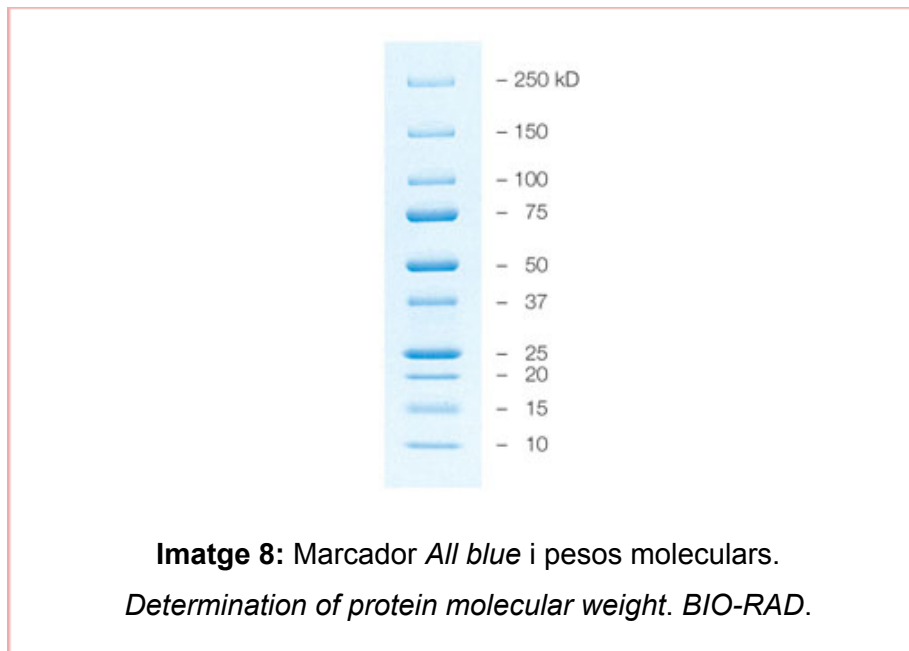
1. Agafar dos papers absorbents i remullar-los amb *buffer de transferència*. La membrana es mulla amb metanol ja que en contacte amb aquest alcohol s'activa.
2. Agafar el gel i retirar la part del gel concentrador ja que és on no hi queda cap proteïna. La part del gel separador es desenganxa del vidre amb ajuda del *buffer de transferència* per muntar el transfer.



3. Muntar el transfer: a sota es posa un paper absorbent, al mig la membrana i a dalt el gel. A damunt de tot això es disposa l'altre paper absorbent.
4. Tapar-ho amb una tapa i endollar el sistema de transferència (*semi dry transfer unit*). Aplicar 45V per membrana i deixar-ho actuar 1 hora.

Detecció immunològica

Com que la Gemin3 pesa 100KDa i la SMN pesa 40KDa aproximadament, es talla la membrana pel punt de 75KDa. Així s'obtenen els resultats sobre els nivells de cada proteïna de manera separada.



Imatge 8: Marcador *All blue* i pesos moleculars.
Determination of protein molecular weight. BIO-RAD.

1. Bloquejar la membrana amb una solució d'un 5% de llet desnatada. Per fer-ho, s'han d'abocar 30ml de tris-buffered saline amb un 0,1% de *Tween 20 Detergent* (TBST) i 1,5g de llet en pols. Això és fa perquè la **caseïna** de la llet impedeix que hi hagi unions inespecífiques.
2. Fer 3 rentats a la membrana amb TBST d'una durada de 5 minuts cadascun.



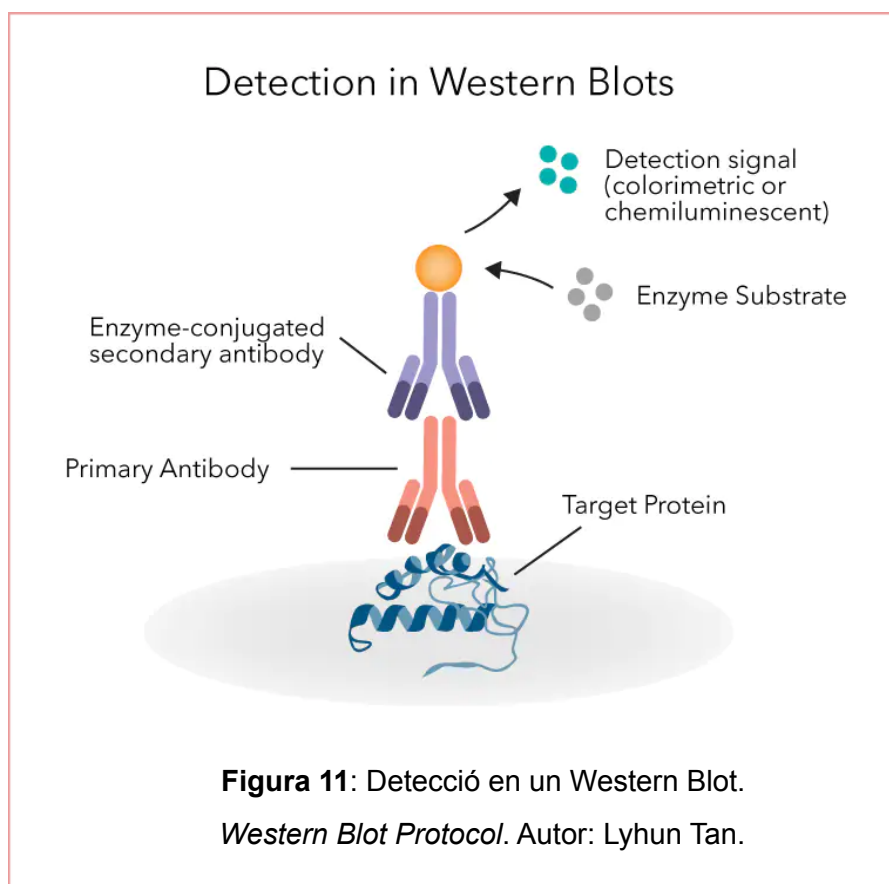
3. Incubar amb anticossos primaris de Gemin3 i de SMN per separat al tros de membrana pertinent i deixar-ho *overnight* a 4°C. S'han de posar 5µl de cada **anticòs primari** en 5ml de TBST, per tal d'obtenir una dissolució 1:1000.
4. Retirar l'anticòs primari i guardar-lo per poder-lo reutilitzar. Fer 3 rentats a la membrana amb TBST d'una durada de 5 minuts cadascun.
5. Tornar a aplicar la solució de bloqueig a la membrana i posar l'**anticòs secundari**, el qual s'unirà al primari. El secundari permetrà observar les proteïnes al fer la detecció immunològica. S'ha de posar 1µl de cada anticòs secundari en 20ml de TBST, per tal d'obtenir una dissolució 1:20000. Els anticossos secundaris utilitzats, els quals són *anti-mouse*, es deixen actuar durant 1 hora a temperatura ambient.
6. Retirar l'anticòs secundari. Fer 3 rentats a la membrana amb TBST d'una durada de 5 minuts cadascun.
7. Abocar a sobre d'un vidre dos substrats: primer la peroxidasa i després el *luminol*. Al ajuntar-se reaccionen i així es pot distingir la banda de proteïnes. Cal remullar la membrana al vidre uns 5 minuts i col·locar-la dins d'un tros de folder.
8. Revelar: s'ha de posar la membrana a un aparell anomenat *ChemiDoc*. D'aquesta manera, s'obtenen els resultats i es pot comparar els nivells de Gemin3 i SMN per separat presents a cada mostra. Això permet saber si aquestes dues proteïnes es veuen afectades en la condició AME o no.



Tubulina

La **tubulina** és un control de càrrega del total de proteïna de la mostra i permet normalitzar i comparar els resultats.

1. Deixar l'anticòs primari de la tubulina en contacte amb la membrana 20 min a temperatura ambient.
2. Fer tres rentats de la membrana amb TBST durant 5 min.
3. Posar l'anticòs secundari durant 50 min i fer 3 rentats més.
4. Revelar: els resultats obtinguts haurien de mostrar una quantitat de proteïna idèntica en totes les mostres.





2. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Una immunofluorescència és un mètode biològic basat en l'ús d'anticossos químics tenyits amb substàncies fluorescents per tal d'identificar proteïnes sota l'acció de la llum aplicada per un microscopi. Per realitzar-se, és necessari un anticòs primari i un de secundari. L'objectiu d'aquesta tècnica recau en localitzar una o diverses proteïnes específiques i saber-ne la concentració.

Al laboratori hem realitzat una immunofluorescència per comparar els nivells de proteïna Gemin3 entre mostres de cèl·lules mare diferenciades en motoneurons afectades per AME i neurones motores control GM11.



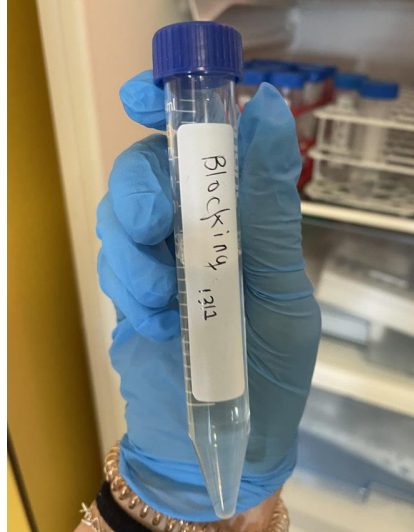
Imatge 9: Motoneurons GM11 control i en condició AME. Autora: Poma.

Hem seguit el següent protocol:

1. Després d'estar 6 dies *in vitro*, al dia específic, cal posar les motoneurons amb paraformaldehid al 4% durant 10 minuts.
2. Fer 3 rentats amb tampó fosfat salí (PBS) i fer una segona fixació de 10 min amb metanol fred (-20°C). El metanol a aquestes baixes temperatures ajuda al procés de permeabilització. Després, treure el metanol i fer 3 rentats més amb PBS 1x.



3. Per bloquejar les mostres s'utilitza una solució de PBS 1x que conté BSA al 5% i tritó X-100 al 0,2%. Aquesta solució es deixa actuar durant 2 hores.



Imatge 10: Solució bloqueig. Autora: Poma.

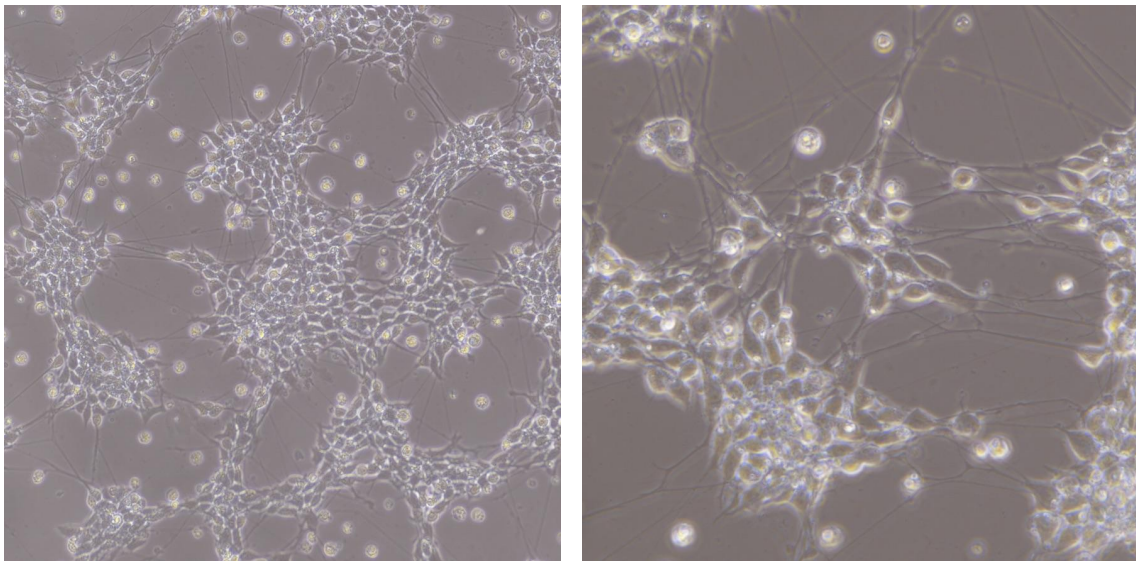
4. Incubar *overnight* a 4°C amb l'anticòs primari diluït a la solució bloqueig. Calen 4µl d'anticòs primari en 200µl de solució, per tal d'obtenir una dissolució 1:50.
5. Fer 3 rentats de 5 min amb la solució bloqueig i incubar les mostres amb els anticossos secundaris pertinents durant 1 hora a temperatura ambient. Cal 1µl d'anticòs secundari en 400µl de solució, per tal d'obtenir una dissolució 1:400. Els anticossos secundaris més utilitzats són: el *anti-rabbit*, que és de color verd, i el *anti-mouse*, que és de color rosa.
6. Fer 5 rentats de 5 min amb PBS 1x i afegir *Hoechst* (1:400) durant 25 min a temperatura ambient. Aquesta tinció fluorescent ens permetrà identificar el nucli de les cèl·lules.
7. Revelar: amb color vermell es veurà indicada la Gemin3, amb verd la tubulina i amb blau el *Hoechst*.



RESULTATS

1. DIFERENCIACIÓ DELS PROGENITORS AME

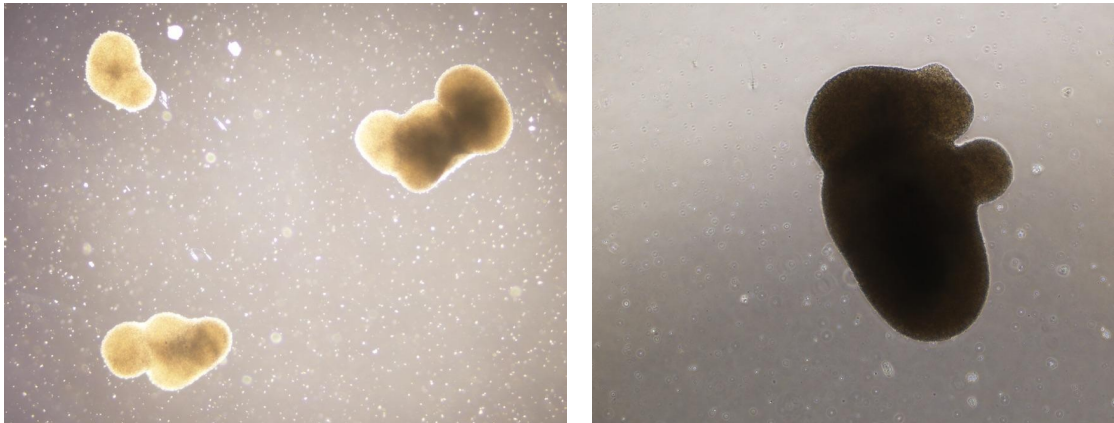
L'objectiu de fer un seguiment de l'evolució dels progenitors AME és dur a terme futures investigacions, per a poder utilitzar un cultiu humà enlloc d'un animal. Al laboratori hem aconseguit que els progenitors progressivament vagin passant a neurosferes, les quals són el pas previ a les motoneurones. Les plaques de cultiu cel·lular on hi ha els progenitors han estat prèviament tractades i tenen càrrega. Cal destacar que és necessària la presència d'una matriu per tal que les cèl·lules es puguin enganxar a la placa. Al canviar el medi dels progenitors AME hem fet servir un enzim anomenat *acutasa* per trencar la **matriu extracel·lular** de les cèl·lules.



Imatge 11: Progenitors AME observats al microscopi amb 20 augmentos (esquerra) i amb 40 augmentos (dreta). Autora: Ana Garcerá Teruel.

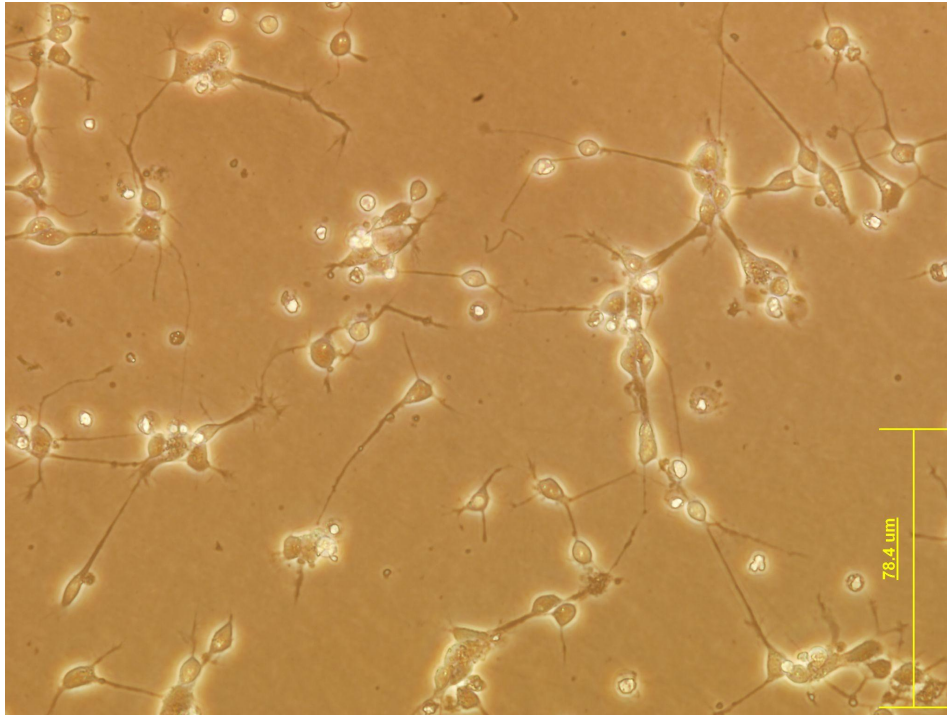


Les neurosferes, les quals estan formades per moltes cèl·lules, es mantenen en una placa petri. Al canviar el seu medi, hem utilitzat un enzim anomenat *accumax* per dissociar-les. Abans de diferenciar-se en motoneurons, les cèl·lules han estat incubades durant 6 dies i en presència del medi d'inducció de neurosferes.



Imatge 12: Neurosferes observades al microscopi amb 4 augments (esquerra) i amb 10 augments (dreta). Autora: Ana Garcerá Teruel.

La utilitat principal de les motoneurons és estudiar malalties del sistema nerviós, o bé provar diversos tractaments. En el nostre cas hem utilitzat cèl·lules mare pluripotents induïdes extretes de fibroblasts humans de pacients amb AME. D'aquesta manera, hem pogut estudiar l'afectació que pateixen les motoneurons i els canvis que experimenten al ser genèticament modificades.



Imatge 13: Motoneurons humanes en condició AME. Autora: Ana Garcerá Teruel.

Les cèl·lules hiPSC utilitzades han sigut comprades al *Coriell Institute for Medical Research*. La línia de cèl·lules mare GM23240 prové d'un pacient masculí de 3 anys amb el tipus II d'AME. Aquestes han estat reprogramades amb construccions lentivirals que codifiquen OCT4, SOX2, NANOG i LIN28. Per altra banda, la línia de cèl·lules mare control GM 23411*B provenen de fibroblasts humans reprogramats amb sis factors (OCT4, SOX2, KLF4, CMYC, NANOG, LIN28) utilitzant vectors retrovirals.

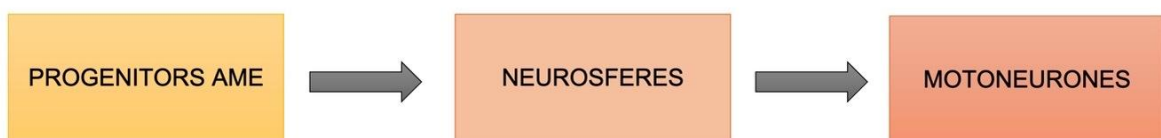
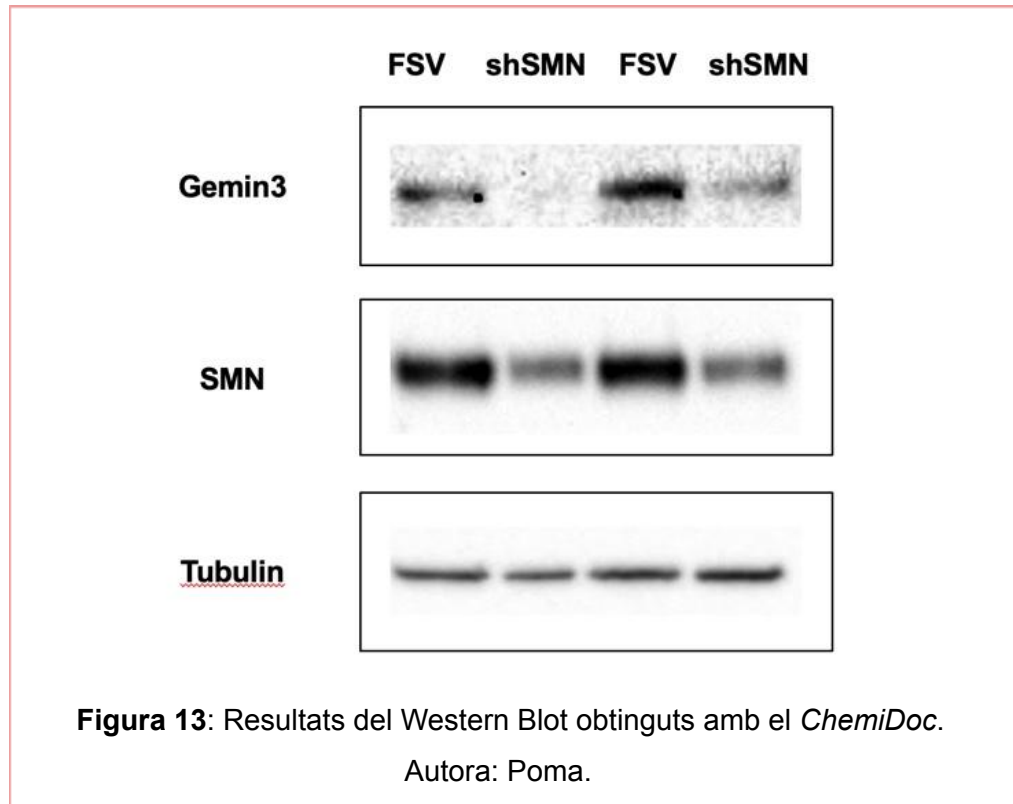


Figura 12: Pas de progenitors AME fins a motoneurons. Autora: Poma.



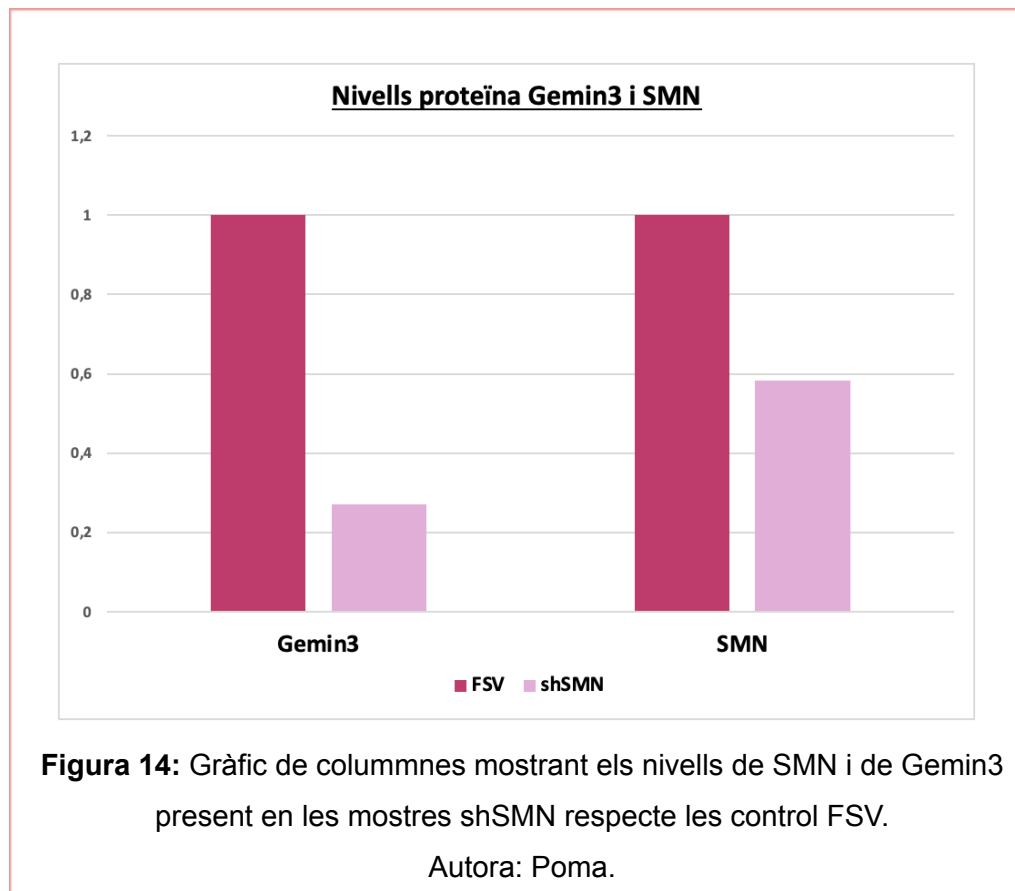
2. ANÀLISI DELS NIVELLS DE SMN I GEMIN3

2.1. CÈL·LULES EN CULTIU DE RATOLINS



Els resultats obtinguts en la tècnica del Western Blot utilitzant la tubulina són els esperats. En cas que la concentració de tubulina no hagués estat igual en les mostres FSV que en les shSMN significaria que les quantitats de proteïna no són equivalents i llavors les conclusions establertes sobre els nivells de SMN i Gemin3 no serien fiables.

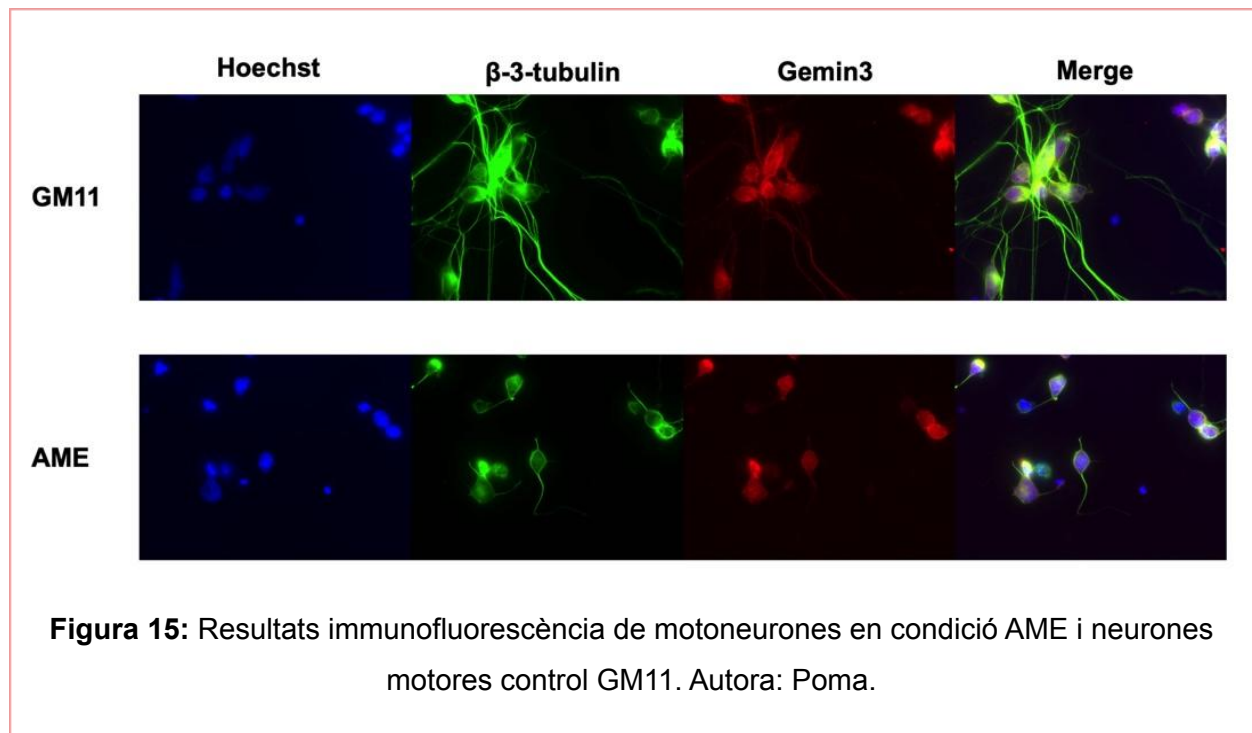
Tal i com he pogut comprovar al revelar, en les mostres de teixit de ratolins afectats per Atròfia Muscular Espinal els nivells de Gemin3 i de SMN es veuen reduïts en comparació amb el control. Per tant, les dues proteïnes es veuen involucrades en aquesta malaltia neuromuscular. Cal destacar la remarcable defallida de la proteïna Gemin3.



2.2. NEURONES MOTORES

Per mitjà de l'elaboració d'una immunofluorescència, he pogut analitzar la Gemin3. Concretament, he pogut distingir si aquesta proteïna es troba al nucli de la cèl·lula o bé només als axons. En aquest cas també he utilitzat la tubulina per identificar tota la neurona completa.

Tenint en compte les neurones control GM11, he observat que el complex SMN anomenat Gemin3 es troba tant al nucli com a les prolongacions de les motoneurons, tot i que els nivells d'aquesta proteïna són més alts al nucli. Al fixar-me en les cèl·lules en condició AME, m'ha cridat l'atenció el fet que els seus axons són significativament més curts. Tot i això, aquest resultat no és important ja que s'ha estudiat que la deficiència de SMN en les motoneurons no afecta la formació dels axons o el creixement de les neurites, però sí que causa defectes greus al transport axonal.



Per a quantificar el complex Gemin3 present al nucli de les motoneurons control i en condició AME he utilitzat aplicació d'ordinador anomenada *ImageJ* (National Institute of Health-USA). Fer la quantificació m'ha permès verificar la meua hipòtesi ja que els resultats han mostrat que hi ha una reducció del complex Gemin3 en les motoneurons en condició AME. Per fer-ho, he quantificat nucli per nucli de les neurones calculant l'àrea de cadascun. Llavors, he dividit els resultats de la quantificació per l'àrea més petita per a poder normalitzar els resultats. D'aquesta manera, he pogut comparar la concentració de la proteïna i he observat que les cèl·lules afectades per AME presenten una reducció de Gemin3.

La Gemin3 té un patró puntejat a la immuno, i aquest patró ens serveix per quantificar el nombre de *spots* amb el programa *ImageJ*. A la figura es mostren els punts positius de Gemin3 al soma de les motoneurons AME.

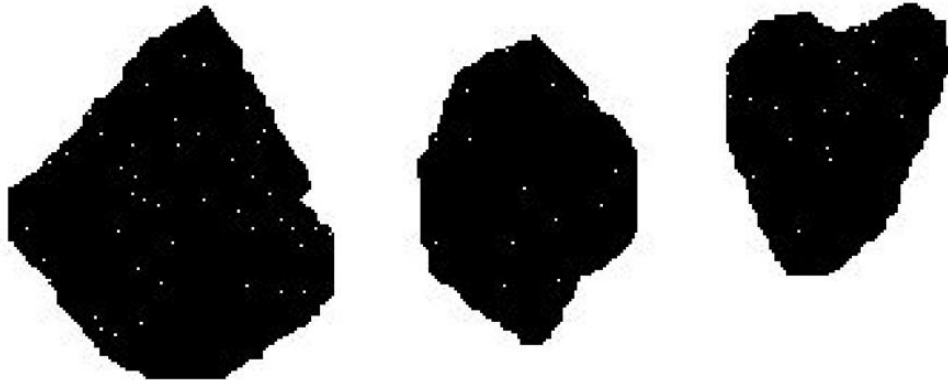


Figura 16: Exemple de la quantificació de Gemin3 en tres nuclis de motoneurones en condició AME. Dut a terme amb l'aplicació *ImageJ*.



DISCUSSIÓ

L'Atròfia Muscular Espinal és una malaltia neuromuscular de caràcter genètic que afecta a les motoneurons de la medul·la espinal. Des de fa anys es coneix que el gen SMN és el responsable d'aquest desordre genètic, però actualment s'estan descobrint noves proteïnes implicades en l'atròfia dels músculs. Els tractaments actuals estan facilitant les condicions de vida de molts infants amb AME i la investigació d'aquesta malaltia minoritària segueix en curs.

Seguint el procés experimental per diferenciar cèl·lules hiPSC i transformant-les en motoneurons, hem pogut estudiar quines proteïnes estan implicades en la mort de les neurones motores. La conclusió ha estat que la proteïna SMN es veu força afectada; com ja era previst. Aprofundint més, hem distingit com la Gemin3, un complex de SMN, també es veu alterada en la condició AME.

L'estudi d'aquest treball desencadena altres temes de debat molt interessants sobre la ciència i la medicina. Els científics mai tanquen les portes al camp del coneixement, ja que sempre es pot descobrir alguna cosa nova.

1. MEDICINA PERSONALITZADA

Ser capaços d'obtenir motoneurons al laboratori pot ser un gran avenç en la medicina personalitzada; la qual s'adapta a les necessitats concretes de cada pacient.

A partir de cèl·lules mare pluripotents induïdes extretes de fibroblasts de pacients podem obtenir progenitors d'AME, des dels quals es pot aconseguir neurosferes canviant el medi. Un cop tenim neurosferes, es fa el pas final per arribar al nostre objectiu: utilitzar motoneurons com a model de la malaltia neurodegenerativa estudiada. A aquest tipus de neurones es poden sobreexpressar gens, com ara el gen SMN, que produirà la sobreexpressió de la proteïna SMN funcional i així podrem estudiar la seva recuperació. Amb les motoneurons dels malalts es poden organitzar una sèrie d'assaigs clínics.



Aprovar un tractament per una malaltia és un procés que requereix molt temps, ja que s'han de testar molt fàrmacs *in vitro*. Aquells fàrmacs que tinguin una resposta positiva poden ser candidats de futures teràpies. Com que es coneixen diferents tipus d'AME i la gravetat dels símptomes de cada persona pot variar, seria interessant l'ús de la medicina personalitzada. El fet que avui en dia ja es pugui seqüenciar el genoma humà d'un individu ha donat un cop de mà en aquest aspecte. Saber amb més exactitud les característiques biològiques, genètiques i metabòliques dels pacients de manera individual permetrà que els efectes secundaris dels medicaments farmacològics utilitzats es redueixin, ja que s'adaptaran a les diferents necessitats.

La medicina personalitzada pot ser molt útil a l'àrea de l'oncologia per buscar cures de càncers. A més a més, altres malalties neurodegeneratives com l'Esclerosi Lateral Amiotròfica (ELA) o l'Alzheimer poden beneficiar-se d'aquestes aproximacions terapèutiques. Analitzar la informació genètica del DNA, del RNA missatger, de les proteïnes i dels metabòlits de cada pacient possibilita una adequada prevenció, diagnòstic, orientació pronòstica i tractament individualitzats.

2. BIOMARCADORS

Els biomarcadors són proteïnes que estan alterades en una malaltia i ens serveixen per diagnosticar i preveure l'evolució d'aquesta. En el cas de l'AME són rellevants els nivells de SMN, però també els de Gemin3 que es veuen reduïts tot i no estar tan estudiats. La identificació de nous biomarcadors en l'àrea neurològica és imprescindible per a la búsqueda de nous fàrmacs i tractaments. Aquests indicadors biològics han de ser validats abans de ser utilitzats en la pràctica clínica habitual.

La búsqueda de biomarcadors de fluids, principalment en sang o líquid cefaloraquídi, està tenint força èxit en les malalties neurodegeneratives. La finalitat d'aquesta recerca és tenir un coneixement més ampli dels mecanismes moleculars de malalties com l'Alzheimer i desenvolupar-ne dianes terapèutiques.



Si tenim en compte els factors de risc implicats en aquests desordres genètics, és essencial identificar-los ja que podrien servir per millorar la qualitat de vida de molts pacients amb tipus greus d'una malaltia determinada. L'objectiu és descobrir quins processos biològics precedeixen l'inici dels símptomes i així establir mètodes de prevenció.

En relació al càncer, destaca la identificació de biomarcadors de benefici o resistència a anticòssos. Els marcadors tumorals poden ser cercats en la sang, orina, teixits tumorals o teixits sans propers a un tumor.

En termes globals, el propòsit de conèixer els diferents tipus d'indicadors de patologies específiques és comprendre amb més profunditat el pronòstic d'aquestes i intentar anticipar-les. Per tant, les cèl·lules mare realitzen un paper fonamental en la cerca de tractaments ja que la varietat de funcions que poden dur a terme són infinites. Des del meu punt de vista, l'ús de cèl·lules hiPSC significa una revolució en la medicina.



CONCLUSIONS

La meua recerca i investigació m'ha permès extreure unes conclusions concretes respecte l'Atròfia Muscular Espinal. La hipòtesi plantejada suggeria l'obtenció de motoneurons com a indicadors biològics de la malaltia estudiada. A més, mencionava una possible reducció de la proteïna SMN i del complex Gemin3 en els pacients afectats per AME.

Per tant, he pogut confirmar el meu estudi i elaborar aquestes conclusions de manera precisa i clara:

- Diferenciar cèl·lules hiPSC en motoneurons obre les portes a una investigació profunda de l'Atròfia Muscular Espinal. Sobreexpressant o reduïnt certs gens d'aquestes neurones motores es pot identificar quines proteïnes es veuen alterades i buscar mètodes per regular-ne els nivells. De fet, els tractaments que regulen el gen deficitari SMN dels pacients afectats per AME han contribuït en la millora de la seva funció motora.
- La reducció de la proteïna SMN va acompanyada de la disminució dels nivells de Gemin3. Aquestes dos proteïnes són biomarcadors, és a dir, indicadors biològics de la malaltia estudiada. Aquest fet no només s'observa en les motoneurons en condició AME, sinó també en els teixits de ratolins que tenen aquesta malaltia.

En relació als meus èxits personals, l'elaboració del meu treball de recerca m'ha proporcionat molts avantatges i recursos que em poden ser útils en un futur. He gaudit i he après moltes coses realitzant les pràctiques i les tècniques instrumentals al laboratori de l'IRB Lleida. Gràcies a haver-me esforçat per dur a terme tota la recerca necessària, m'he assabentat del gran interès que tinc per aquesta branca de la ciència. De ben segur que quan tingui l'ocasió m'especialitzaré en un aspecte relacionat amb la neurologia o en l'estudi de les famoses cèl·lules mare.



Voldria remarcar la importància que té el fet d'interessar-se i dedicar-se a la investigació mèdica ja que encara hi ha moltes malalties de les quals se'n desconeix un tractament viable. Les cèl·lules hiPSC encara necessiten un estudi més profund però de moment estan sent un mètode molt eficient per la ciència.

Respecte al procés de diferenciació dels progenitors AME, m'ha semblat impressionant l'alta capacitat de reproducció que tenen les cèl·lules. Hem hagut de ser molt exactes i precisos al canviar-los el medi per tal de no danyar-les. Haver aconseguit diferenciar-les en motoneurons i, a més a més, haver analitzat els nivells de certes proteïnes m'ha permès demostrar l'eficàcia dels nous mètodes per aprofundir en la comprensió de malalties minoritàries.

Aquesta experiència m'ha fet veure que el món de la ciència, en concret de la biomedicina, és infinit. Sempre es pot estirar el fil per descobrir i millorar tot el que s'està fent en l'actualitat i anar un pas més enllà per donar solució a tants interrogants que la vida ens planteja. És un món que m'apassiona, precisament per aquesta vessant d'investigació contínua que planteja. Per tant, és evident que si es vol millorar la qualitat de vida i donar resposta a malalties minoritàries, neurodegeneratives, genètiques.... cal invertir en investigació d'una manera rigorosa per tal d'aconseguir els objectius plantejats. Moltes de les investigacions arriben a verificar hipòtesis que són errònies, però aquestes ajuden a descartar opcions i, per tant, suposen un avenç cap a la resposta final. Un procés, de vegades massa llarg i costós, però gratificant quan finalment s'aconsegueix l'objectiu.



BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

- **REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES DE TREBALLS UNIVERSITARIS I TESIS DOCTORALS**

FRAGA BOUZAS, Uxía, Tècniques instrumentals (unitat de senyalització neuronal). Treball de 3r de biomedicina dirigit per Dra. Ana Garcerá Teruel. Elaborat a l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida. p. 8 i 12.

FUENTE RUIZ, Sandra de la, Development of new therapeutic strategies for Spinal Muscular Atrophy. Tesi doctoral dirigida per Dra. Rosa Maria Soler Tatché. Elaborat a Universitat de Lleida , 2020. p. 127-131.

VIVANCOS GUIU, Núria, Anàlisi de la regulació de la proteïna SMN per vies de senyalització en models cel·lulars d'atròfia muscular espinal. Treball final de Màster dirigit per Dra. Rosa Maria Soler Tatché. Elaborat a l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida , 2018-2019. p. 19-22.

L'apoptosi, l'inici d'un final : Estudi del procés de mort cel·lular programada i la seva importància en determinades malalties. Premis de recerca, Universitat de Vic . p. 10-14.

- **REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES D'ARTICLES DE PUBLICACIONS**

“Calpain system is altered in survival motor neuron reduced cells from in vitro and in vivo spinal muscular and atrophy models”. Cell Death & disease 11. Núm. 487 (2020), p. 2-6.

“Sistema nervioso: Anatomía”. Infermera virtual. Col·legi oficial infermeres i infermers de Barcelona. p. 2-4.



- **REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES DE LLIBRES**

BALLESTEROS VÁZQUEZ, Manuel; JIMENO FERNÁNDEZ, Antonio; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Santiago. Biología Sèrie Observa 1r batxillerat. Barcelona: Grup Promotor / Santillana Educación, S. L., 2016. 289 p. ISBN 978-84-9047-672-7.

ESTELLER BADOSA, Manel. No sóc el meu ADN: L'origen de les malalties i com prevenir-les. Primera edició. Barcelona: RBA La Magrana, 2017. 195 p. ISBN 978-84-8264-821-7.

- **REFERÈNCIES DE LLOCS WEB**

ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL: Declaración de la AMM sobre investigación con células madre [en línia].
· <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-la-amm-sobre-investigacion-con-celulas-madre-embrionarias/> · [consulta: 9.07.2021].

EUROSTEMCELL: Células iPS y repropamación celular: cómo convertir cualquier célula del cuerpo en una célula madre [en línia].
· <https://www.eurostemcell.org/es/celulas-ips-y-reprogramacion-celular-como-convertir-cualquier-celula-del-cuerpo-en-una-celula-madre> · [consulta: 20.05.2021].

EUROSTEMCELL: La investigación con células madre embrionarias: un dilema ético [en línia].
· <https://www.eurostemcell.org/es/investigacion-con-celulas-madre-embrionarias> · [consulta: 9.07.2021].

FISIOONLINE: Motoneuronas o neuronas motores [en línia].
· <https://www.fisioterapia-online.com/motoneuronas> · [consulta: 06.06.2021].



GENCAT: La medicina personalitzada: Una nova forma d'entendre la medicina [en línia]. <http://medicaments.gencat.cat/la-medicina-personalitzada/> [consulta: 20.07.2021].

GUÍAS DE NEURO: Sinapsis [en línia]. <https://www.guiasdeneuro.com/sinapsis/> [consulta: 15.06.2021].

INFO-FARMACIA.COM: Zolgensma. Atrofia muscular espinal [en línia]. <http://www.info-farmacia.com/medico-farmaceuticos/informes-tecnicos/zolgensma-atrofia> [consulta: 02.06.2021].

KEN HUB: Nervous system [en línia]. <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-nervous-system> [consulta: 04.06.2021].

SMA NEWS TODAY: Evrysdi (Risdiplam) [en línia]. <https://smanewstoday.com/evrysdi-risdiplam/> [consulta: 15.07.2021].



GLOSSARI

Acetilcolina: substància química classificada com èster. Serveix per enviar senyals a altres cèl·lules; fins i tot a cèl·lules nervioses, musculars i glandulars. És un dels principals neurotransmissors del sistema nerviós que es troba al llarg de tot l'encèfal.

Adenovirus: família de virus que pot infectar persones de qualsevol edat. Aquestes infeccions acostumen a afectar les vies respiratòries superiors, tot i que poden causar malalties a diferents àrees del cos.

Anticòs primari: molècula específica per a una proteïna concreta o una biomolècula d'interès.

Anticòs secundari: molècula que s'uneix amb un anticòs primari, el qual està subjectat a un antígen concret.

Areflèxia: condició que indica la presència de danys neurològics o interrupcions a les vies nervioses. Aquesta situació clínica es caracteritza pel fet que no es produeix cap tipus de reacció quan s'estimulen els reflexos osteotendinosos.

Bulb raquidi: estructura molt resistent a la qual radiquen els centres vitals més importants per regular els reflexos de la tos, el mastegament, l'esternut... i també la funció respiratòria, la circulatòria i la de l'equilibri. Concretament, és una protuberància situada a l'extremitat superior de la medul·la espinal.

Caseïna: proteïna que es troba a la llet i és rica en fòsfor.

Cerebel: part de l'encèfal que té la funció de coordinar els moviments voluntaris del cos. Aquest representa un 10% del cervell, però conté la meitat de les seves neurones.

Còrtex cerebral: superfície més externa del cervell. És una capa fina de teixit nerviós que conté sis capes de cèl·lules i, per tant, no és homogènia. Al còrtex cerebral és on



tenen lloc processos com la imaginació, la percepció, el pensament, el judici i la decisió.

Cromosoma: estructura condensada d'ADN en forma de bastonet. Els cromosomes estan situats a l'interior de les cèl·lules que contenen informació genètica. Aquests van aparellats i consten d'unes proteïnes anomenades histones.

Deleció: mutació cromosòmica que consisteix en la pèrdua d'un fragment del cromosoma.

Encèfal: part del sistema nerviós central situada al crani. Està format pel cervell, el cerebel i el bulb raquidi.

Enhancer splicing exònic: procés biològic per mitjà del qual els introns (regions no codificadores dels gens) són escindits de la transcripció d'ARN missatger primari i els exons (regions codificadores dels gens) s'uneixen per generar ARN missatger madur. Aquest fet comporta conseqüències al processament d'ARNm i en alguns casos pot produir una alteració al fenotip.

Enzim: biomolècula que afavoreix i regula les reaccions químiques en els éssers vius. Els enzims són biocatalitzadors, és a dir, substàncies que augmenten notablement la velocitat d'una reacció sense consumir-se.

Estímul: variació de les condicions ambientals que afecta a les cèl·lules. Les hormones i els neurotransmissors són exemples d'estímuls químics.

Fenotip: conjunt de caràcters visibles que un organisme presenta a causa de la interacció entre el seu genotip i l'ambient.

Fibres extrafusals: fibres que tenen la capacitat de contraure's. Consisteixen la major part del múscul esquelètic i s'encarreguen de generar la força muscular.



Fibres intrafusals: fibres no contràctils que són el component principal del fus neuromuscular. No generen força muscular, es troben encapsulades en beines i formen fusos musculars paral·lels a les fibres extrafusals.

Fibroblast: cèl·lula plana i allargada que intervé en la formació de les fibres de col·lagen. Es troba en el teixit conjuntiu i té un paper important en la cicatrització de ferides.

Ganglis: massa de cèl·lules nervioses del sistema nerviós perifèric.

Glutamat: neurotransmissor que actua com a mediador de la informació cognitiva, sensorial, motora, emocional. Participa en el 80-90% de les sinapsis del cervell. En el cicle de Krebs té el seu inici el procés de síntesi del glutamat.

Hipotonia: disminució del to muscular que pot afectar tant a nens com a adults. Les conseqüències que comportar són una excessiva elasticitat del múscul i tova consistència. A més a més, implica que les articulacions no es troben ben fixades.

Homeòstasi cel·lular: conjunt de fenòmens d'autoregulació que fan possible el manteniment d'una relativa constància en les propietats i la composició del medi intern de l'organisme.

Leucèmia: tipus de càncer de la sang que s'inicia a la medul·la espinal. Comporta un augment incontrolable de la quantitat de glòbuls blancs (leucòcits), els quals es produeixen a la medul·la espinal i s'utilitzen per combatre infeccions.

Limfoma: tipus de càncer del sistema immunitari que té lloc quan els glòbuls blancs o limfòcits perden el control i es divideixen de manera anormal o no moren quan ho haurien de fer. En els pacients amb limfoma, els limfòcits malalts s'acumulen de manera exagerada als ganglis limfàtics o bé a altres parts del sistema limfàtic.



Líquid cefaloraquídi: líquid incolor que circula pels espais buits del cervell i la medul·la espinal i entre dues de les meninges. Les seves funcions són protegir, sostenir i nodrir el sistema nerviós central, fer de via de comunicació hormonal i eliminar substàncies.

Lisosoma: orgànuls membranosos de les cèl·lules eucariotes. Són vesícules que contenen enzims encarregats de dur a terme la digestió cel·lular.

Matriu extracel·lular: estructura fibril·lar formada per polisacàrids i glicoproteïnes que recobreix la membrana plasmàtica de totes les cèl·lules. És la membrana de secreció pròpia de les cèl·lules animals.

Medul·la espinal: columna de teixit nerviós situada al conducte vertebral i que uneix l'encèfal amb el cos. La seva funció és transmetre impulsos nerviosos als nervis raquidis, els quals porten la informació d'entrada al sistema nerviós central i la de sortida als diferents llocs del cos.

Microtúbuls: filaments cilíndrics que s'originen per la polimerització de dímers compresos d'alfa i beta tubulina. Es troben al citoplasma de les cèl·lules eucariotes i tenen un gruix de 25 nanòmetres. S'encarreguen del moviment de les vesícules intracel·lulars i del moviment de cilis i flagels.

Mieloma: tumor maligne format per un tipus de glòbuls blancs anomenats cèl·lules plasmàtiques. Aquestes cèl·lules adquireixen característiques atípiques que proliferen de manera exagerada a la medul·la òssia de l'interior dels ossos.

Neurotransmissors: biomolècules situades a l'interior de les neurones i que estan secretades per les vesícules sinàptiques. S'encarreguen de transmetre l'impuls nerviós a través de la sinapsi.

Nucleòtid: molècula química orgànica formada per una base nitrogenada, un àcid fosfòric i una pentosa. Té un fort caràcter àcid a causa del grup fosfat que s'ionitza.



Oligonucleòtid: polímer curt d'àcid nucleic, format per uns 20 nucleòtids, utilitzat en la investigació. La síntesi d'oligonucleòtids requereix un estricte control respecte a la temperatura, el pH, la qualitat dels substrats, etc.

Queratinòcits: cèl·lules més abundants de l'epidermis. Aquestes cèl·lules van augmentant els seus nivells de queratina fins arribar a perdre tots els orgànuls cel·lulars al final de la seva diferenciació.

Retrovirus: tipus de virus que enlloc d'ADN conté ARN com a material genètic.

Sensibilitat visceral: resposta fisiològica normal de les alteracions de les estructures buides del tracte alimentari.

Teixit adipós: teixit connectiu format per adipòcits, fibroblasts, una fracció de limfòcits i cèl·lules endotelials i de l'estroma. Té capacitat per emmagatzemar lípids i també pot secretar molècules biològicament actives.

Telòmer: extrem del cromosoma lineal. És una seqüència repetitiva d'ADN no codificant del cromosoma que el protegeix. Quan una cèl·lula es divideix, els telòmers s'escurcen.

Tubulina: proteïna globular formada per dos polipèptids: la tubulina alfa i la beta. Es troba a les cèl·lules eucariotes i s'encarrega de formar els microtúbuls.

Vesícules sinàptiques: esferes petites localitzades a l'extrem dels axons de les neurones. Quan té lloc una sinapsis, aquestes vesícules secreten un neurotransmissor.



ABREVIATURES

BSA: albúmina de sèrum boví

LB: *laemmli buffer*

PBS: tampó fosfat salí

PFA: *paraformaldehyde*

PSA: persulfat d'amoni

SDS: dodecilsulfat sòdic

TBS: tris-buffered saline

TEMED: tetrametiletildiamina



ANNEXOS

ANNEX 1: GALERIA FOTOGRÀFICA

Durant el procediment de les tècniques pertinents al laboratori he anat fent fotografies de les fases d'experimentació i dels instruments que he utilitzat. Per tant, totes les imatges adjuntes estan fetes per mi i mostren l'evolució i realització de la meva part pràctica del treball relacionada amb el procés d'investigació.

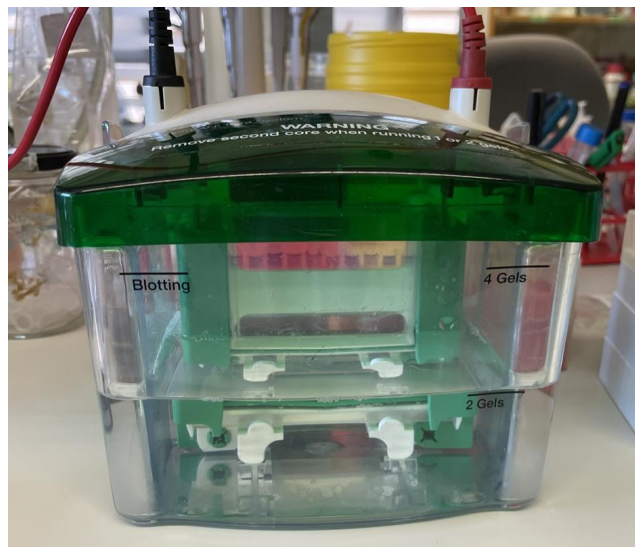
- **APARELLS DE LABORATORI UTILITZATS**



Imatge 14: Microscopi òptic amb contrast de fases utilitzat per inspeccionar cultius cel·lulars.



Imatge 15: Aparell de muntatge per a la preparació de dos gels d'acrilamida.



Imatge 16: Càmera d'electroforesis. Aquest sistema es connecta al corrent i, quan les mostres estan carregades, es pot observar quines proteïnes avancen més ràpidament que altres en funció del seu pes molecular.



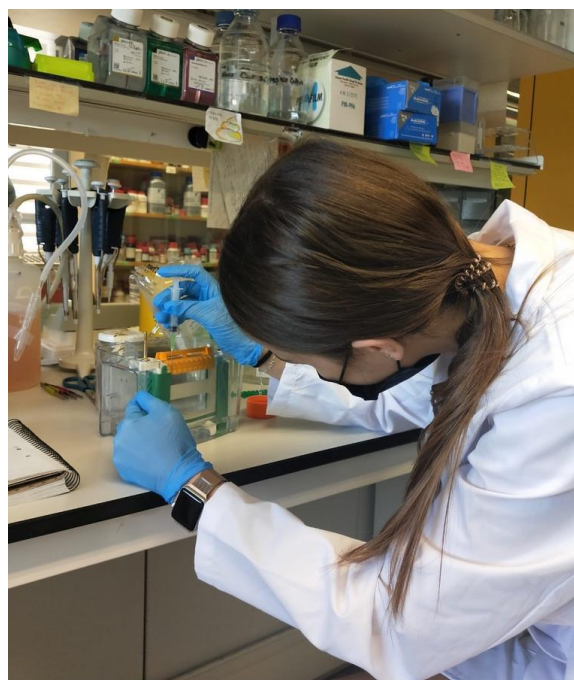
Imatge 17: *ChemiDoc MP Imaging System*. Aquest aparell l'he utilitzat a la fase final de l'elaboració del Western Blot per revelar les membranes i analitzar els nivells de cada proteïna pertinent.



- PROCEDIMENTS DE TÈCNiques DE LABORATORI



Imatge 18: Escalfament de les mostres a 95°C. Aquest pas es fa abans de fer una centrifugació amb un *short spin*. L'aparell utilitzat es diu *Thermomixer comfort*.



Imatge 19: Preparació de l'electroforesis. En aquesta fotografia s'observa com amb l'ajuda d'una agulla es posa *running buffer* a dins de cada pou on es disposen les mostres.



Imatge 20: Transferència en el Western Blot. Es pot apreciar el procés en el qual hem remullat dos papers absorbents amb *buffer de transferència*.

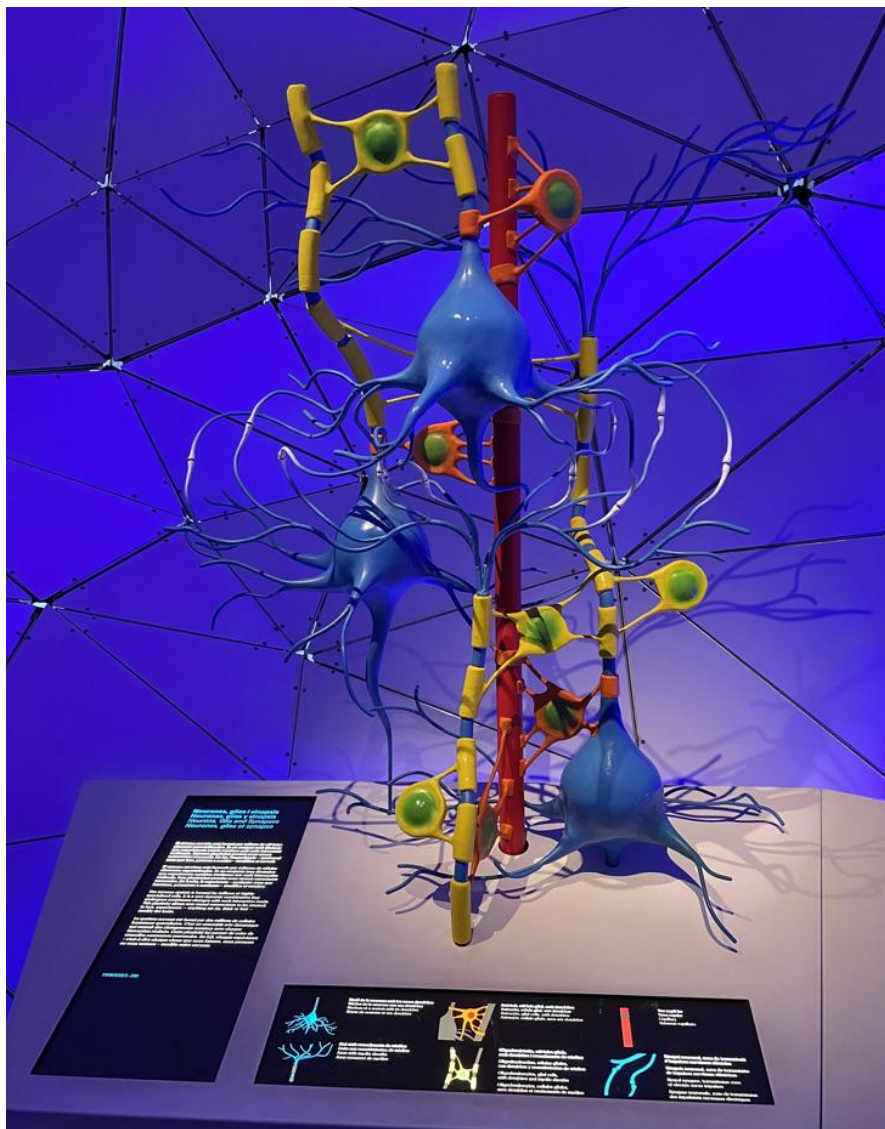


Imatge 21: Muntatge del sistema de transferència per endollar-ho al corrent. S'utilitza l'aparell *semi dry transfer unit* i s'apliquen 45V per membrana.



- **ALTRES**

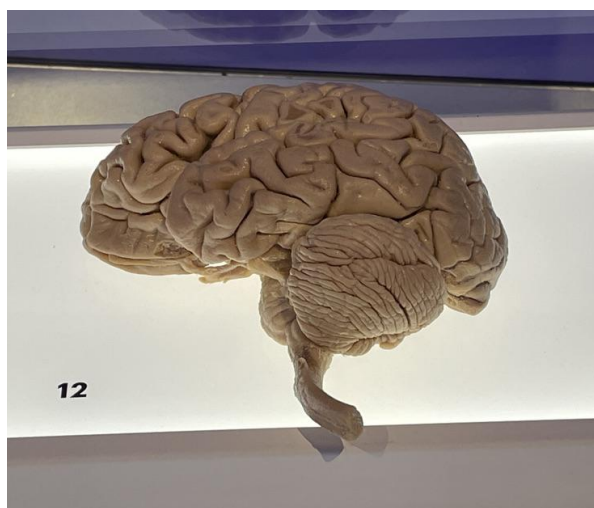
En una visita realitzada al CosmoCaixa de Barcelona vaig fer diverses fotografies a exposicions i estructures sobre aspectes de la biologia i, en concret, de la neurologia. Anar al museu de la ciència em va proporcionar una imatge més visual sobre conceptes com la sinapsi, les neurones i el sistema nerviós. He escollit un recull de fotos relacionades amb el temari del treball realitzat.



Imatge 22: Neurones, glies i sinapsis.



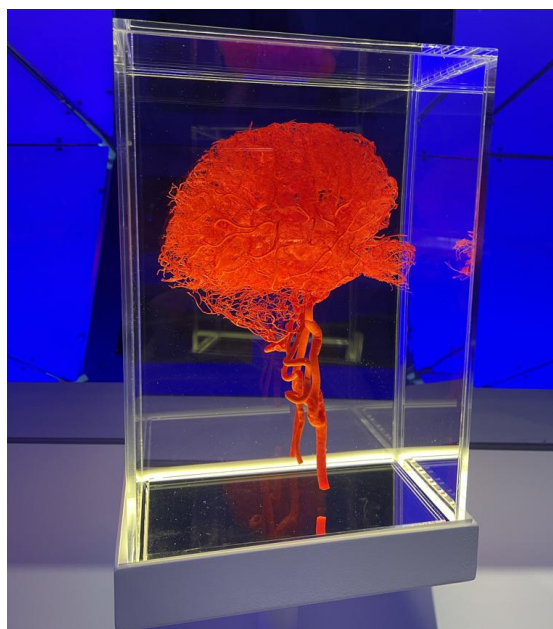
Imatge 23: Cadena de DNA en una estructura tridimensional.



Imatge 24: Cervell d'humà.



Imatge 25: El sistema nerviós.



Imatge 26: Sistema vascular d'una cervell humà plastinat.



ANNEX 2: ÍNDEX D'IMATGES, TAULES I FIGURES

Imatge 1: Cèl·lules mare adultes	11
Imatge 2: Cèl·lules mare embrionàries	11
Imatge 3: Dues nenes afectades d'Atròfia Muscular Espinal	13
Imatge 4: Soniprep de l'IRB Lleida	28
Imatge 5: NanoDrop de l'IRB Lleida	28
Imatge 6: Preparació del LB1x	30
Imatge 7: Gel amb les mostres carregades	31
Imatge 8: Marcador <i>All blue</i> i pesos moleculars	32
Imatge 9: Motoneurons GM11 control i en condició AME	35
Imatge 10: Solució bloqueig	36
Imatge 11: Progenitors AME observats al microscopi amb 20 augments (esquerra) i amb 40 augments (dreta)	37
Imatge 12: Neurosferes observades al microscopi amb 4 augments (esquerra) i amb 10 augments (dreta)	38
Imatge 13: Motoneurons humanes en condició AME	39
Imatge 14: Microscopi òptic amb contrast de fases	58



Imatge 15: Aparell de muntatge per la preparació de dos gels d'acrilamida	58
Imatge 16: Càmera d'electroforesis	59
Imatge 17: <i>ChemiDoc MP Imaging System</i>	59
Imatge 18: Escalfament de les mostres a 95°C	60
Imatge 19: Preparació de l'electroforesis	60
Imatge 20: Transferència en el Western Blot	61
Imatge 21: Muntatge del sistema de transferència per endollar-ho al corrent	61
Imatge 22: Neurones, glies i sinapsis	62
Imatge 23: Cadena de DNA en una estructura tridimensional	63
Imatge 24: Cervell d'humà	63
Imatge 25: El sistema nerviós	64
Imatge 26: Sistema vascular d'un cervell humà plastinat	64
Taula 1: Classificació del sistema nerviós en funció dels criteris anatòmics	3
Taula 2: Classificació del sistema nerviós en funció dels criteris funcionals	4
Taula 3: Parts principals d'una neurona	5



Taula 4: Tipus de sinapsis	6
Taula 5: Tipus de motoneurons en funció de la seva posició al SNC	8
Taula 6: Tipus de motoneurons en funció de les fibres musculars que innerven	8
Taula 7: Tipus de cèl·lules mare en funció de la capacitat de diferenciació	10
Taula 8: Tipus de cèl·lules mare en funció del seu origen	11
Taula 9: Tipus d'Atròfia Muscular Espinal	17
Taula 10: Avantatges i inconvenients de l'apoptosi	19
Taula 11: Preparació del gel separador i concentrador	29
Taula 12: Preparació de les mostres	29
Figura 1: Anatomia d'una neurona	5
Figura 2: Diferències entre una sinapsi química i una elèctrica	7
Figura 3: Intervenció del múscul esquelètic i tipus de fibres musculars	9
Figura 4: Aplicacions de les cèl·lules hiPSC	12
Figura 5: Caràcter genètic de l'AME	14
Figura 6: El gen SMN2 només produeix un 10% de proteïna SMN funcional	15
Figura 7: Procés d'autofàgia	18



Figura 8: Procés d'apoptosi	20
Figura 9: Els diferents tipus de cèl·lules de la sang desenvolupades a la medulla òssia	22
Figura 10: Blastocist humà	25
Figura 11: Detecció en un Western Blot	34
Figura 12: Pas de progenitors AME fins a motoneurones	39
Figura 13: Resultats del Western Blot obtinguts amb el <i>ChemiDoc</i>	40
Figura 14: Gràfic de columnnes mostrant els nivells de SMN i de Gemin3 present en les mostres shSMN respecte les control FSV	41
Figura 15: Resultats immunofluorescència de motoneurones en condició AME i neurones motores control GM11	42
Figura 16: Exemple de la quantificació de Gemin3 en tres nuclis de motoneurones en condició AME	43