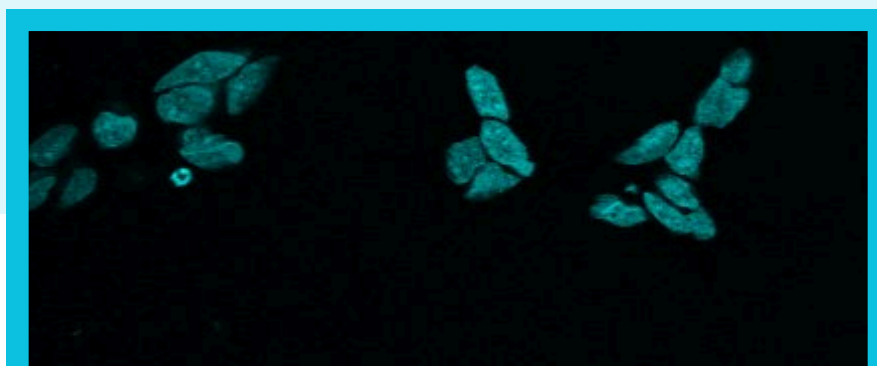
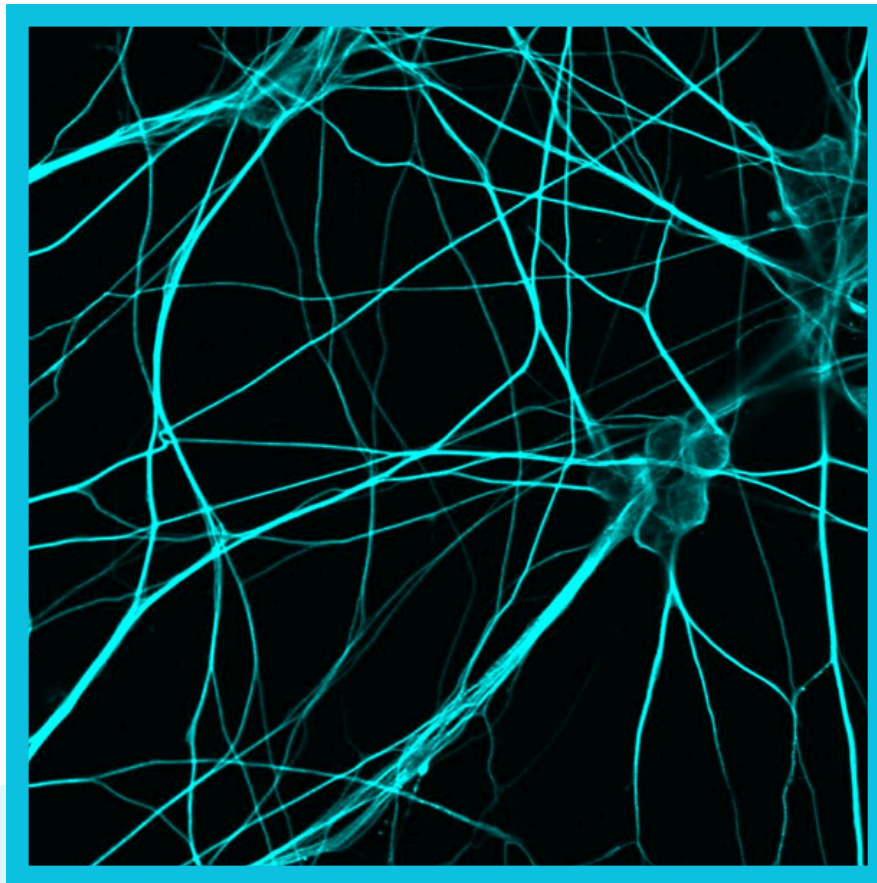
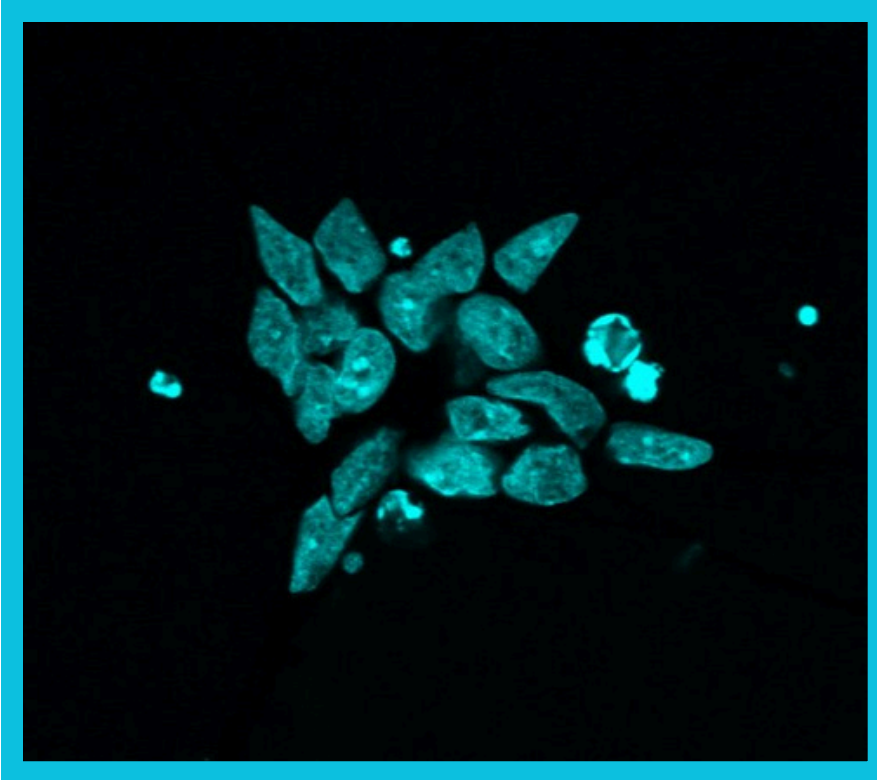


# ATRÒFIA MUSCULAR ESPINAL

Estudi de les alteracions cel·lulars implicades en la degeneració de les motoneurones i de l'eficàcia del tractament amb oligonucleòtids antisentit.

BLAU MARTÍN CORDERO



# - ÍNDEX -

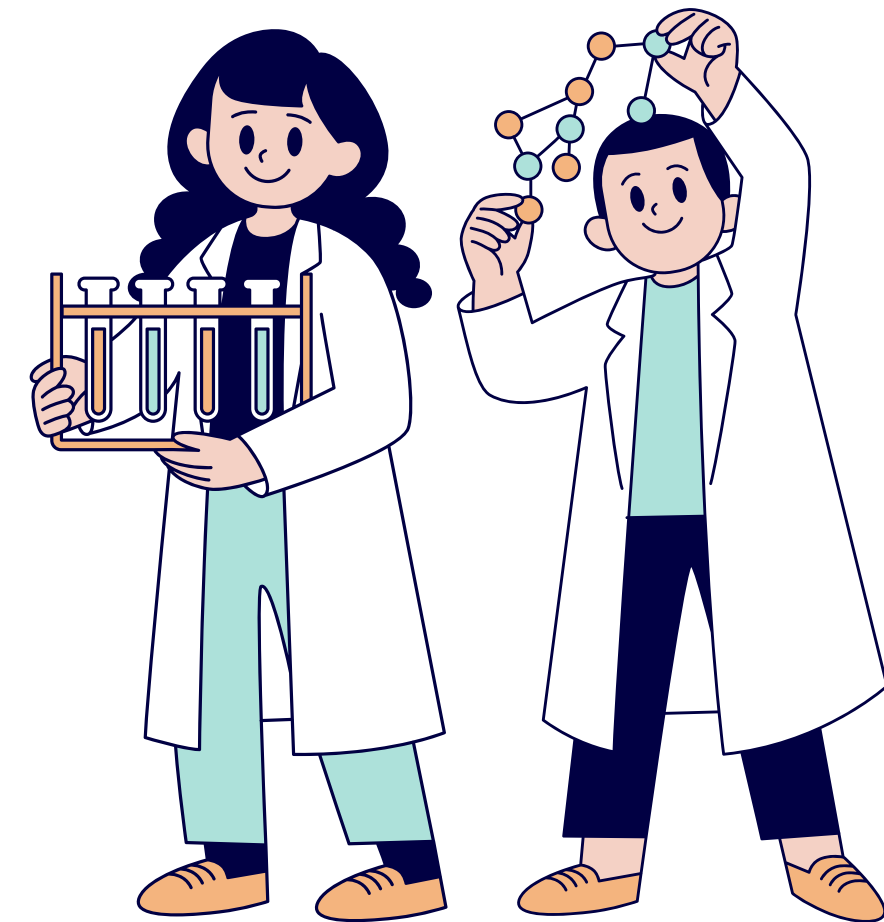
## INTRODUCCIÓ



## EL TREBALL



## EXPERIENCIA ITINERA



# **INTRODUCCIÓ**

## ATRÒFIA MUSCULAR ESPINAL (AME)



MALALTIA NEUROMUSCULAR  
HEREDITÀRIA QUE AFECTA A  
INFANTS I ES CARACTERITZA PER  
LA DEGENERACIÓ DE LES  
NEURONES MOTORES.

1

### **FEBRER**

Crèdit de metodologia

2

### **MARÇ-JULIOL**

1a reunió amb tutora ITINERA  
Recerca de la informació

3

### **1a i 2a SETMANES DE JULIOL**

Estada a l'IRB LLeida

4

### **JULIOL-SETEMBRE**

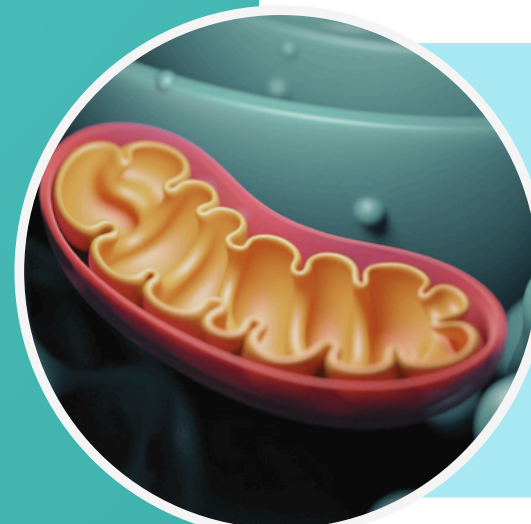
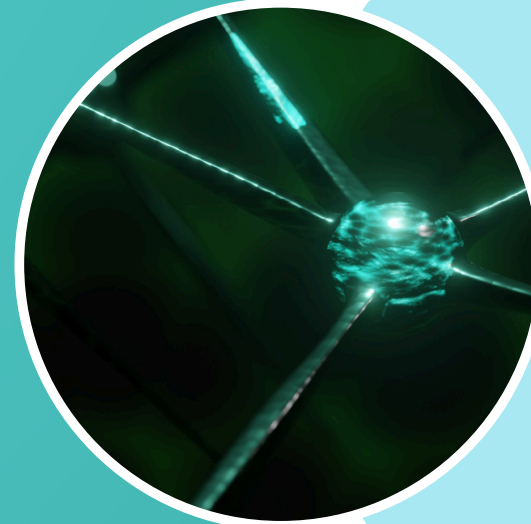
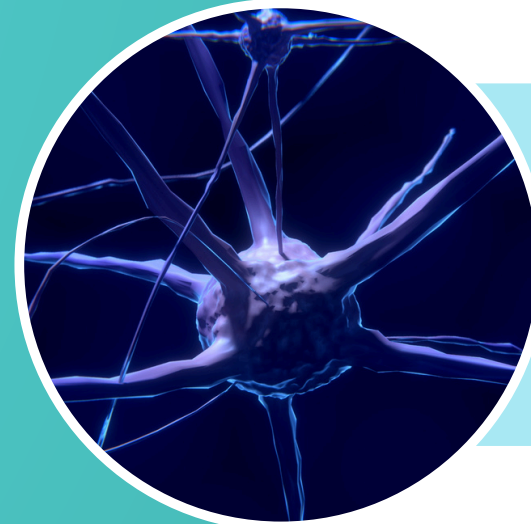
Redacció del treball



# **EL TREBALL DE RECERCA**

# HIPÒTESIS

- El tractament amb ASOs és efectiu i això resulta en un increment de SMN en motoneurons de pacients amb AME tractades respecte les no tractades.
- Si la funció mitocondrial de les motoneurons de malalts d'AME està afectada, això pot contribuir a la seva degeneració.



# OBJECTIUS

Determinar si la tècnica de diferenciació de motoneurons a partir de hiPSC és efectiva per estudiar l'AME en humans.

Observar si el tractament amb oligonucleòtids antisentit ajuda a incrementar els nivells de proteïna SMN en MNs amb AME tractades. Determinar si aquest increment varia segons el moment d'inici del tractament.

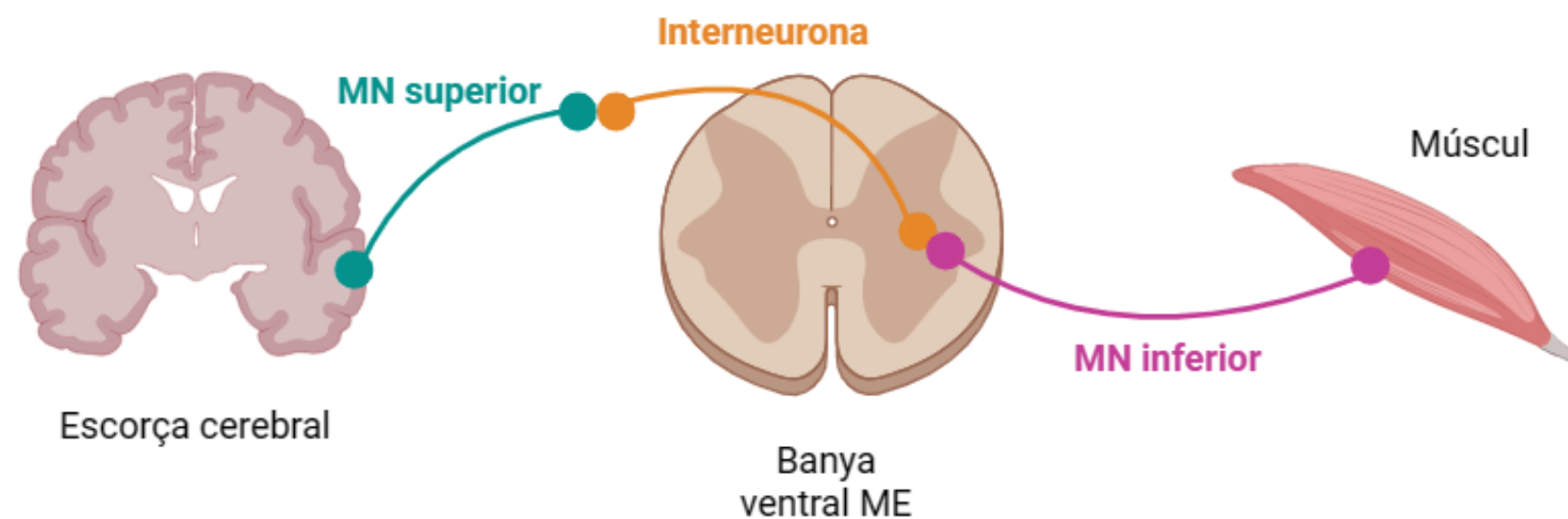
Determinar mitjançant el Seahorse (Real time cell metabolic analysis) si hi ha diferències entre la respiració cel·lular de motoneurons sanes i motoneurons amb AME.

# PART TEÒRICA

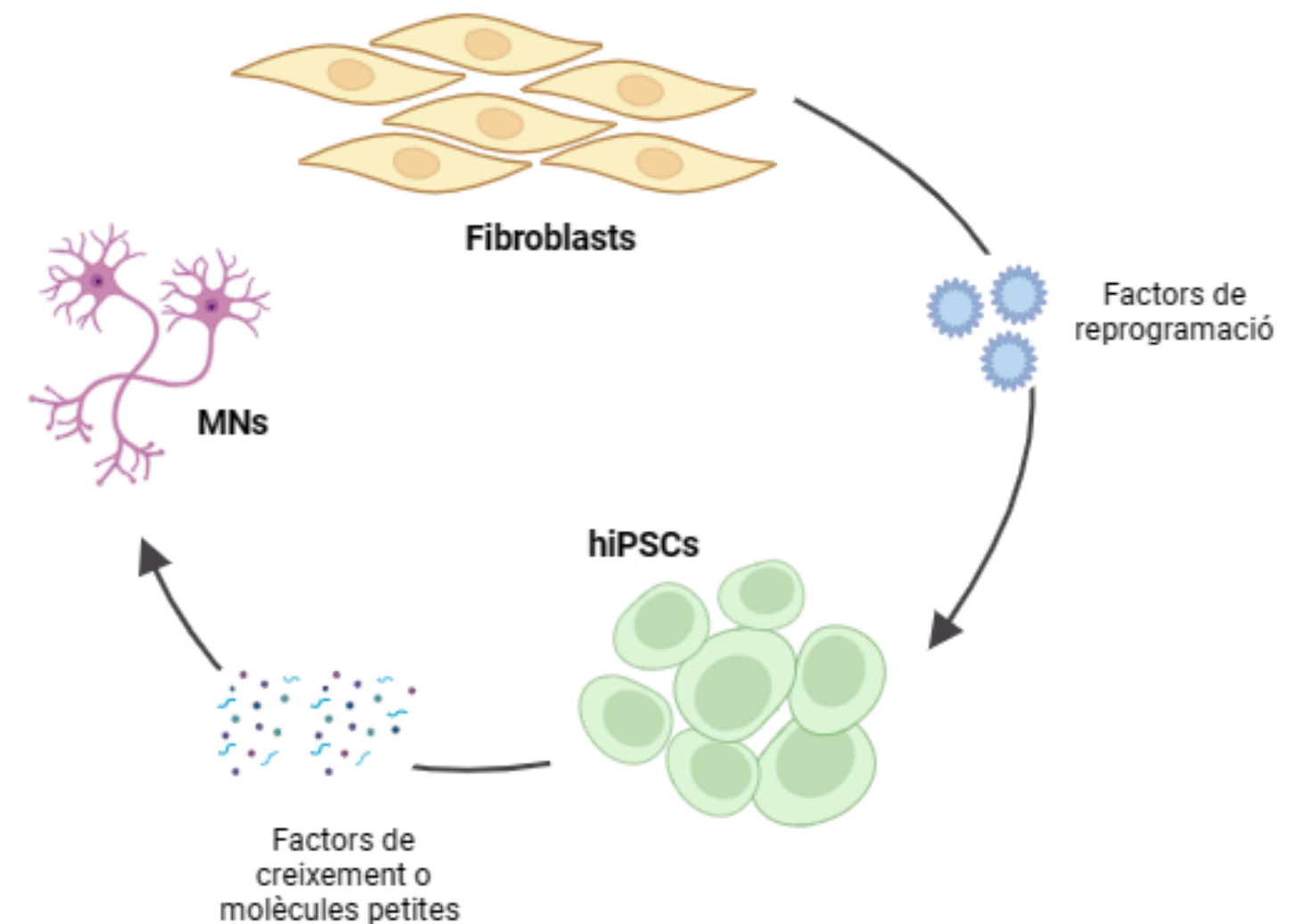
En l'AME, les MNs afectades són les **inferiors**.

Aquestes MNs només són accessibles en teixits **post mortem**.

Aquest fet ha dut al desenvolupament de la tècnica de diferenciació de MNs a partir de **cel·lules mare** (hiPSCs).



## DIFERENCIACIÓ DE MNs A PARTIR DE hiPSCs



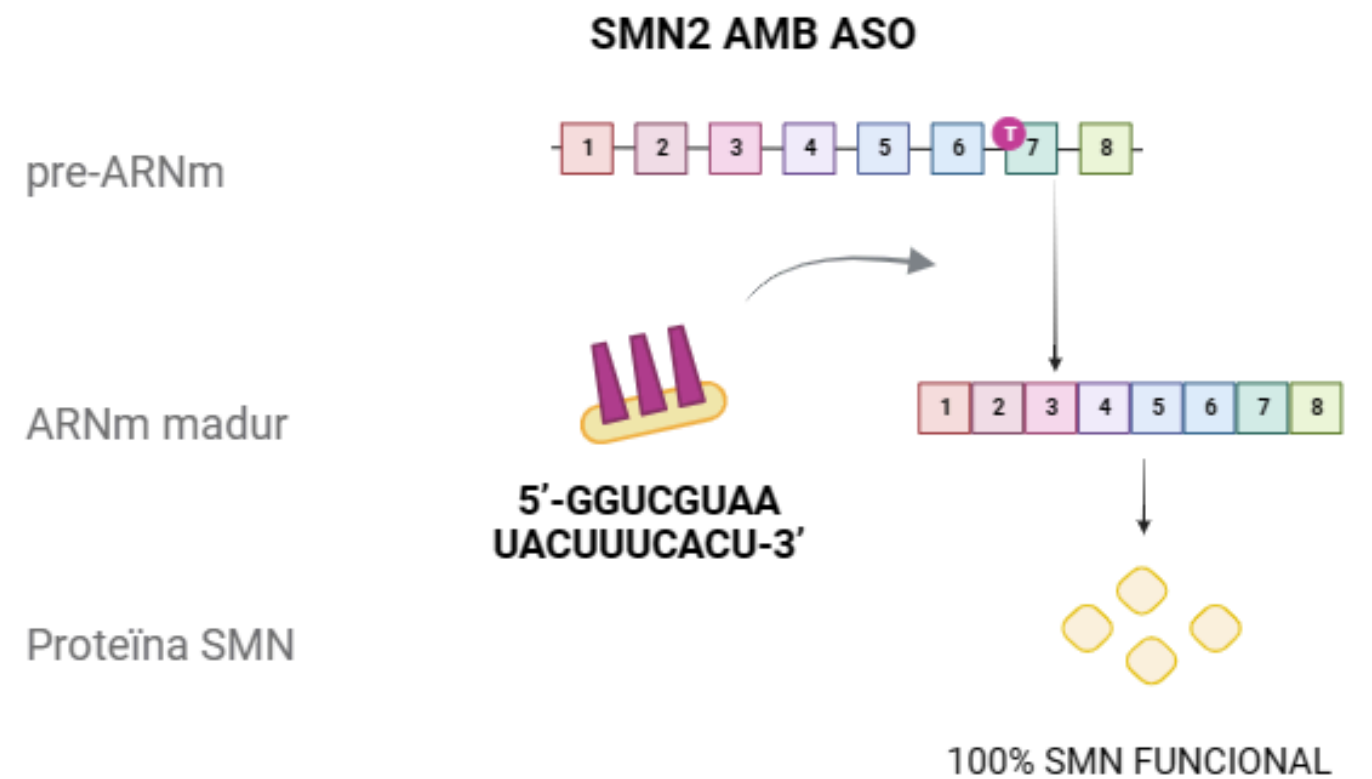
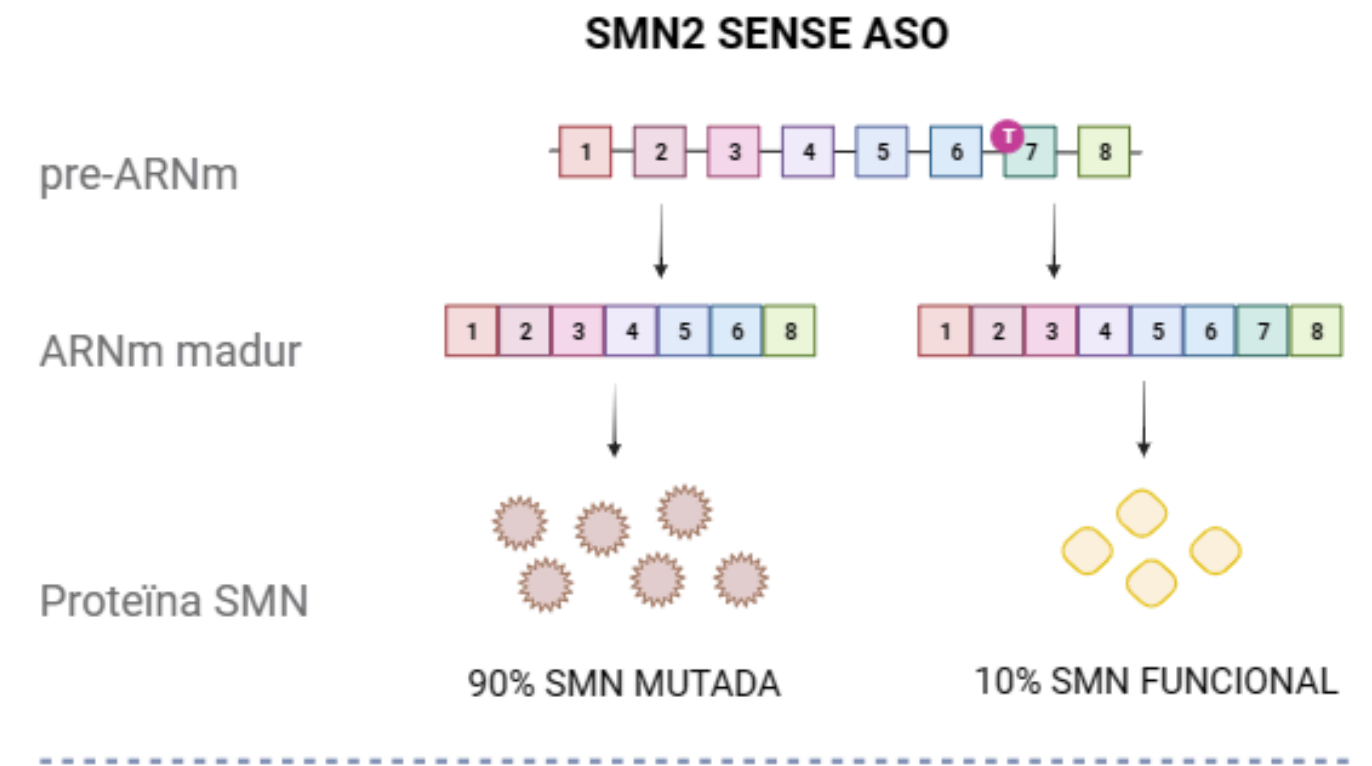
# PART TEÒRICA

Els gens *SMN1* i *SMN2* produeixen la proteïna SMN.

El gen *SMN1* està absent en l'AME i per tant, no es produeix proteïna.

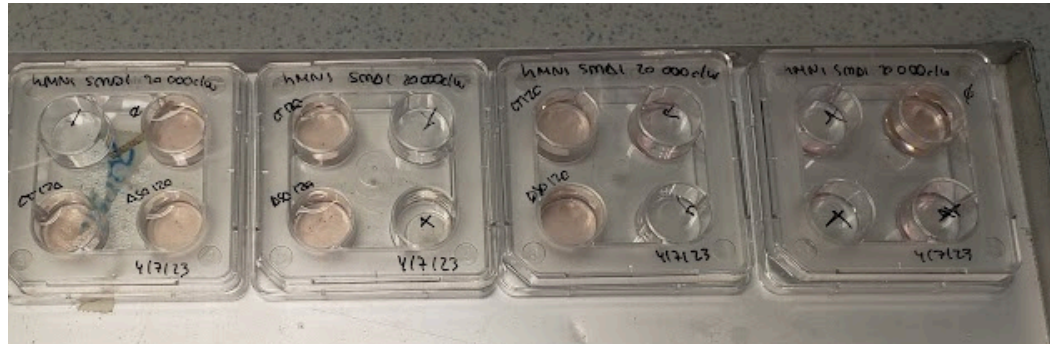
En el gen *SMN2* s'exclou l'exó 7 i un 90% de la proteïna que sintetitza està truncada.

**El tractament amb ASOs té l'objectiu d'interferir en la inclusió de l'exó 7 per tal que *SMN2* produeixi més proteïna SMN funcional.**



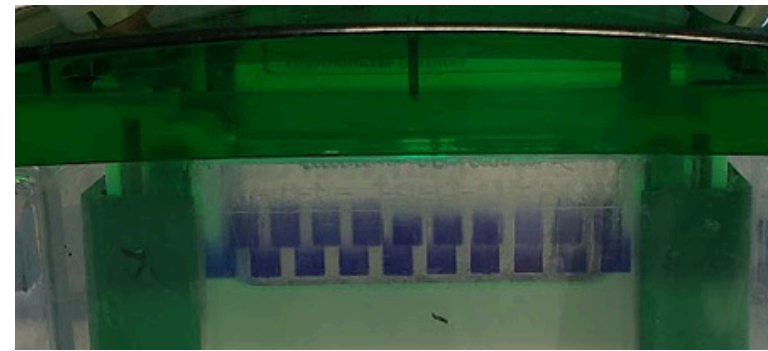


# PART PRÀCTICA



## IMMUNOFLUORESCÈNCIA

La tècnica de diferenciació de MNs a partir de hiPSC és efectiva?



## WESTERN BLOT

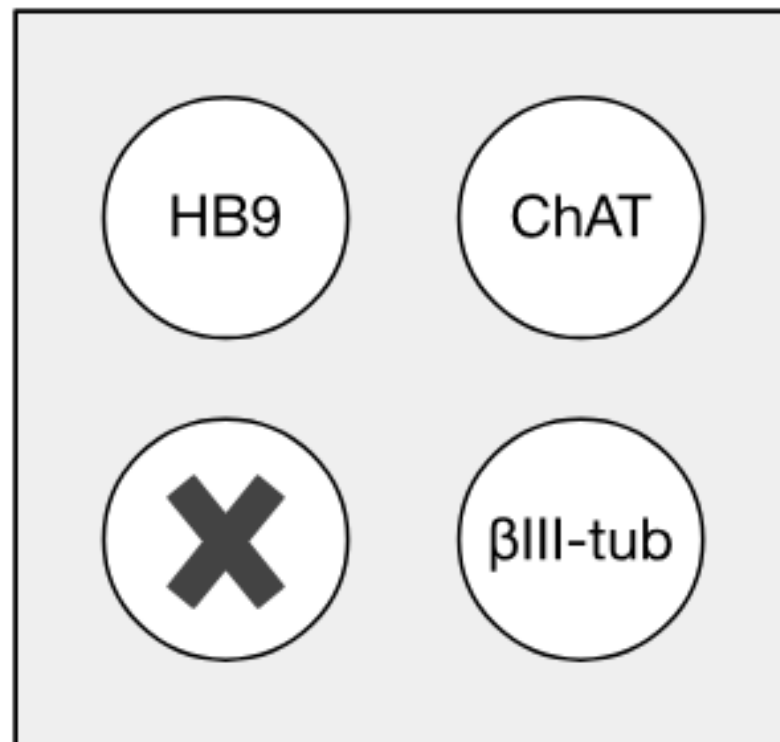
El tractament amb ASOs és eficaç?



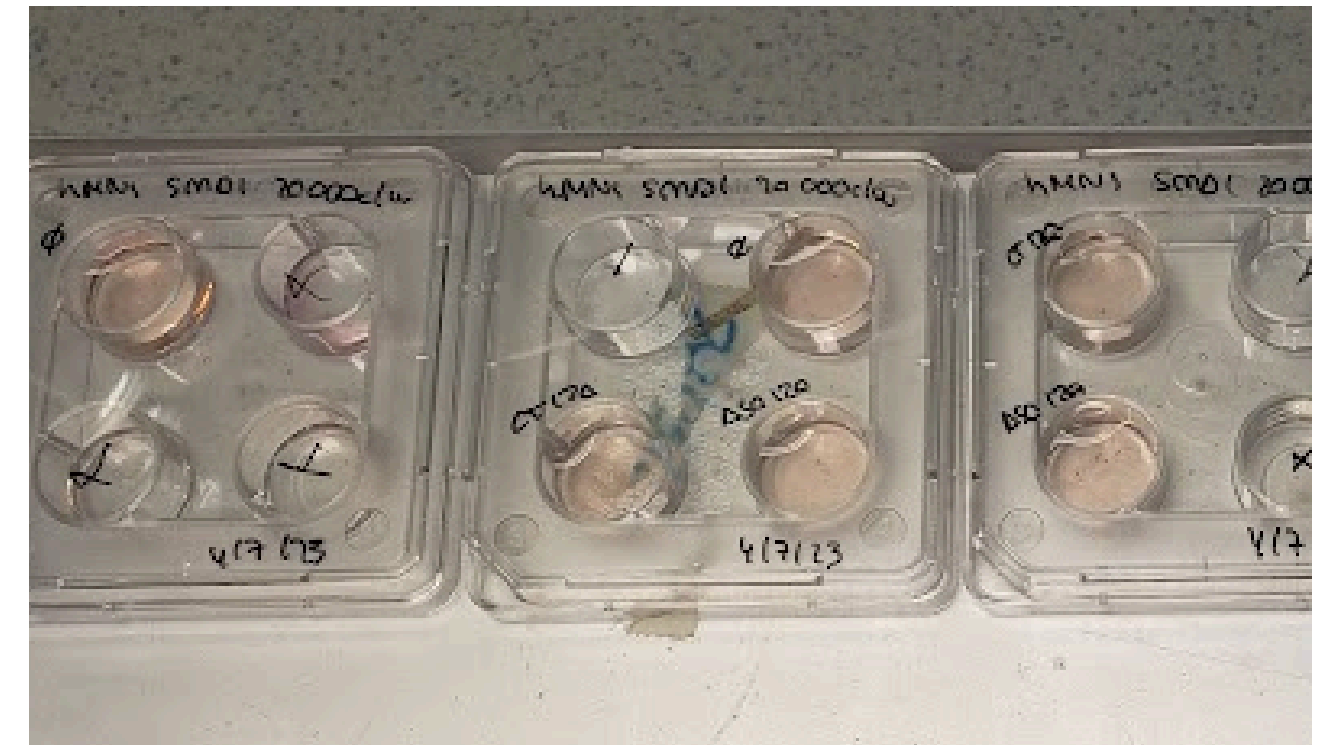
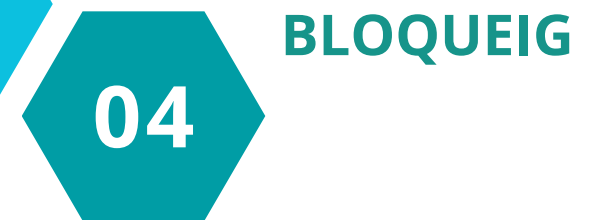
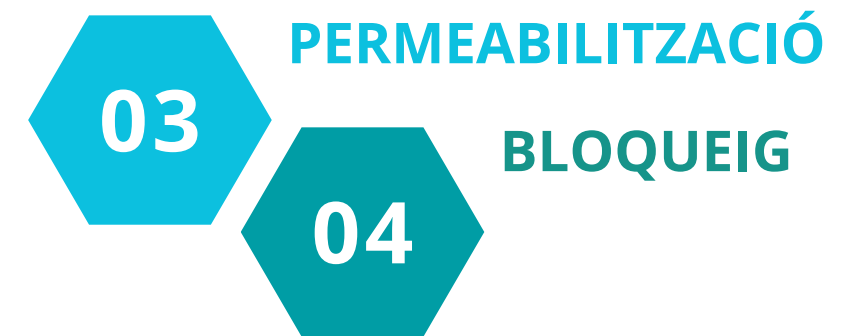
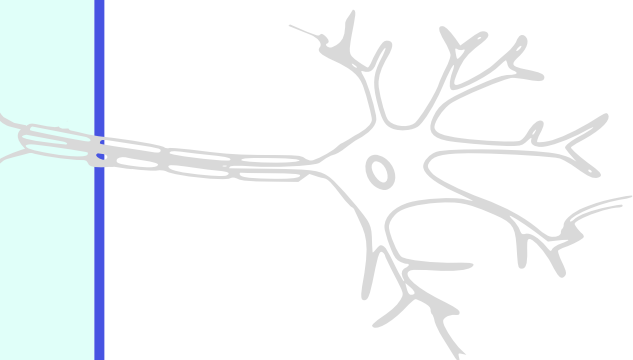
## ANÀLISI SEAHORSE

Està afectada la funció mitocondrial de les MNs amb AME?

# PART PRÀCTICA IMMUNOFLUORESCÈNCIA



ESQUEMA DE L'EXPERIMENT

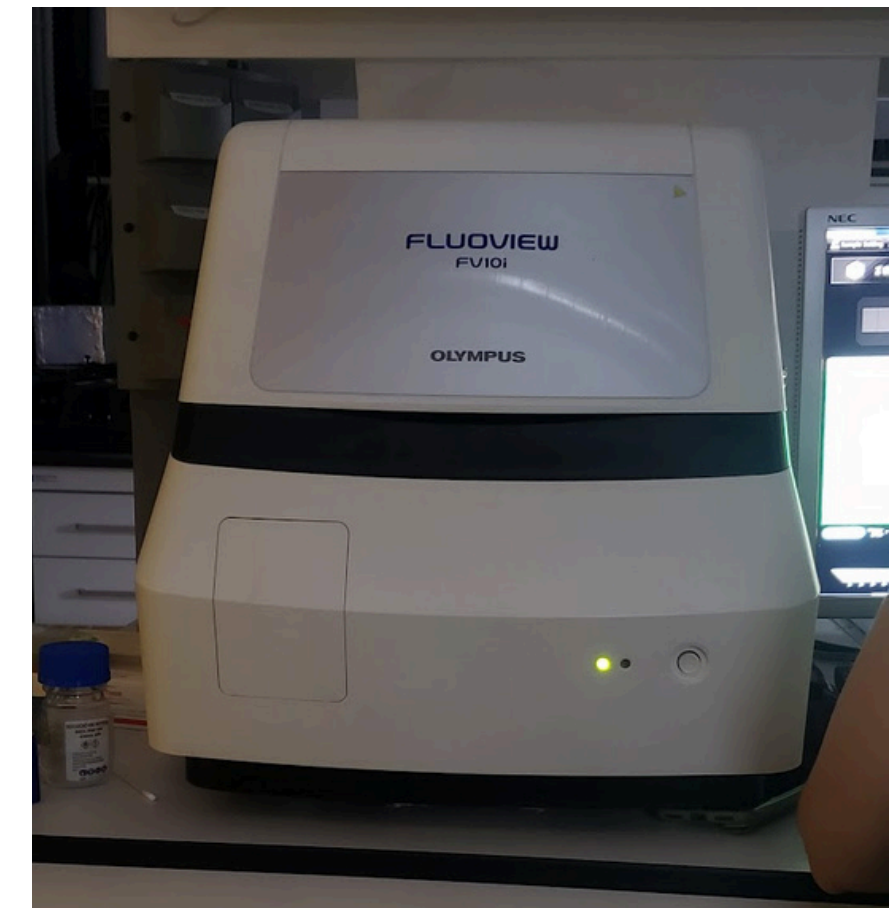
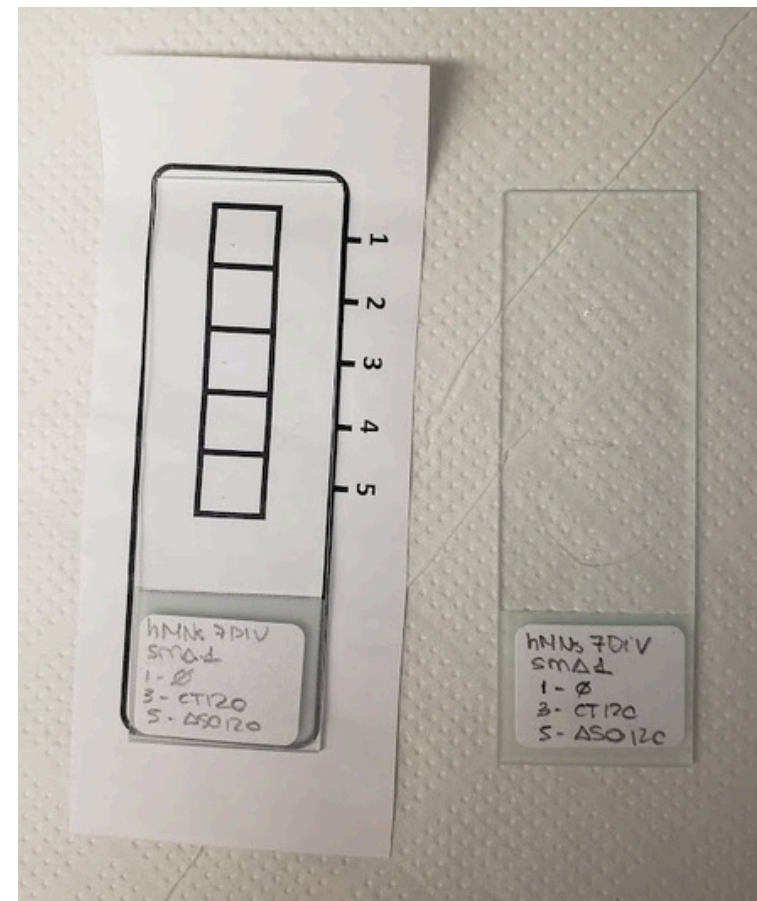
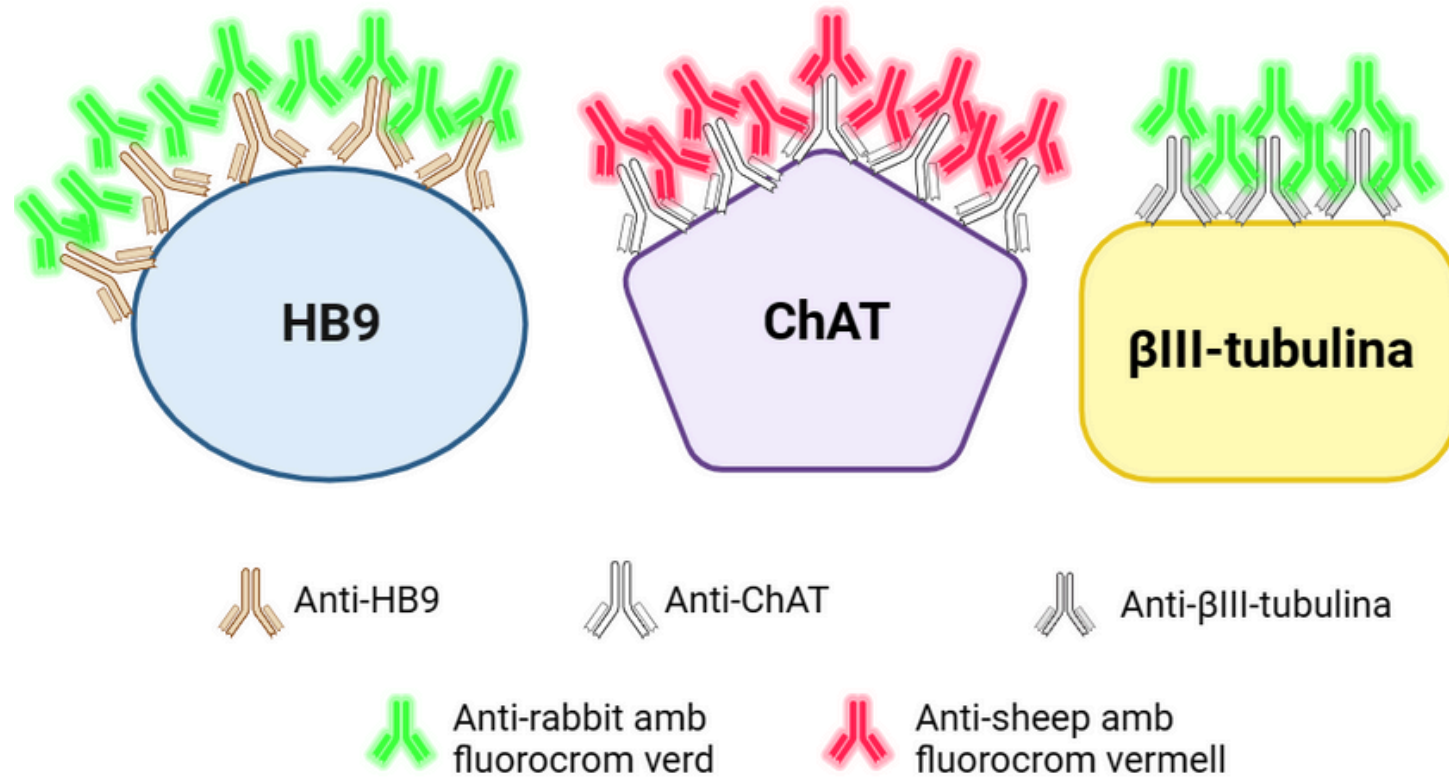


# PART PRÀCTICA IMMUNOFLUORESCÈNCIA

05 IMMUNOTINCIÓ

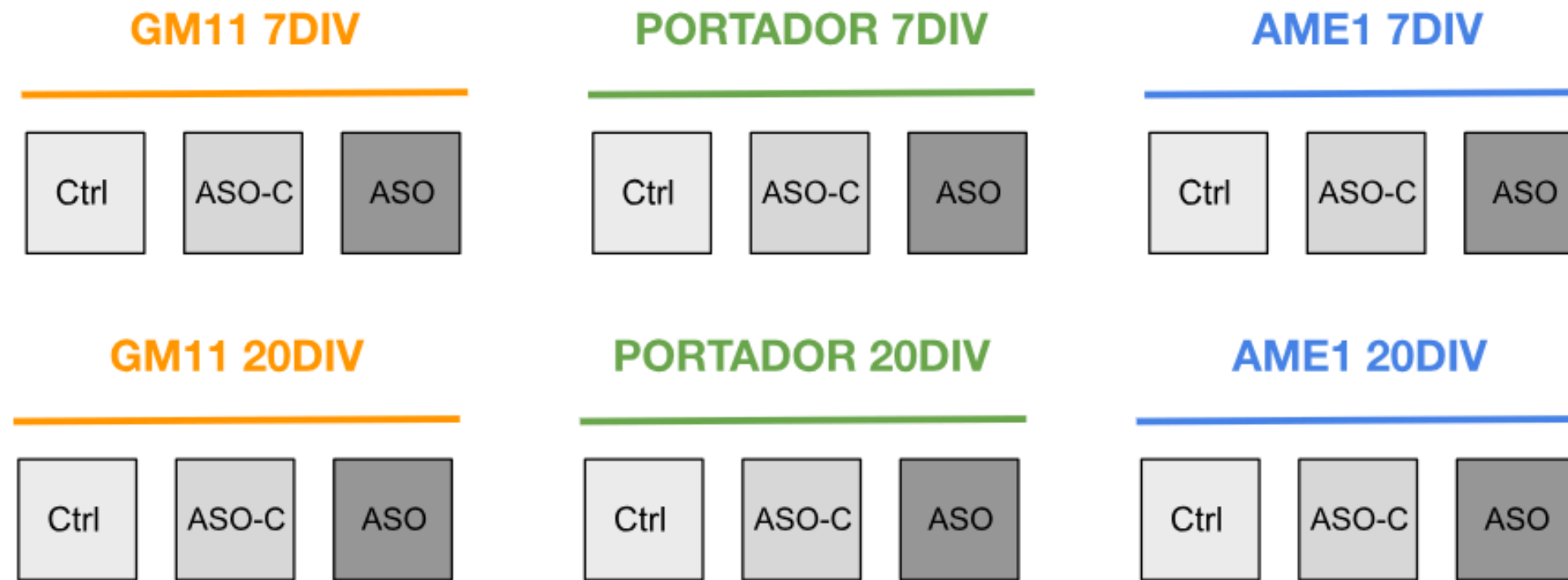
06 MUNTATGE DE LES MOSTRES

07 OBSERVACIÓ AL MICROSCOPI



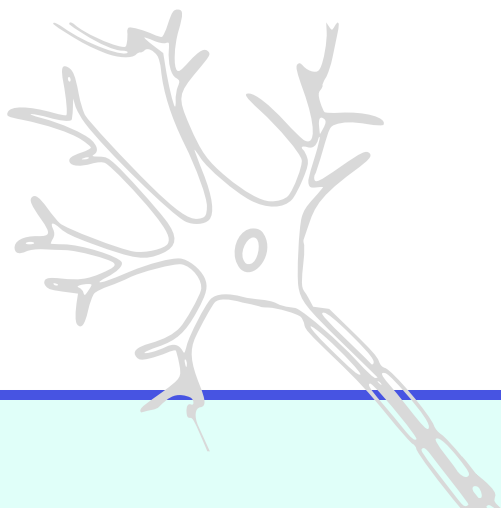
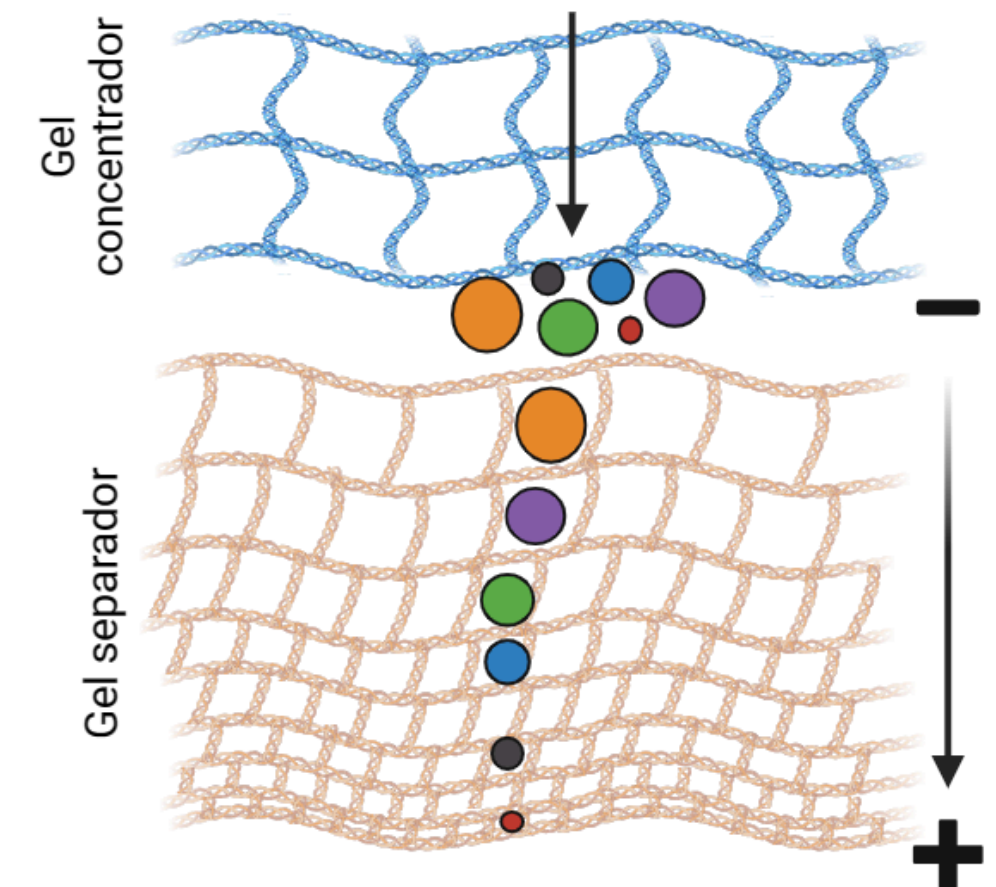
# PART PRÀCTICA WESTERN BLOT

## ESQUEMA DE L'EXPERIMENT



## 01 PREPARACIÓ DE LES MOSTRES

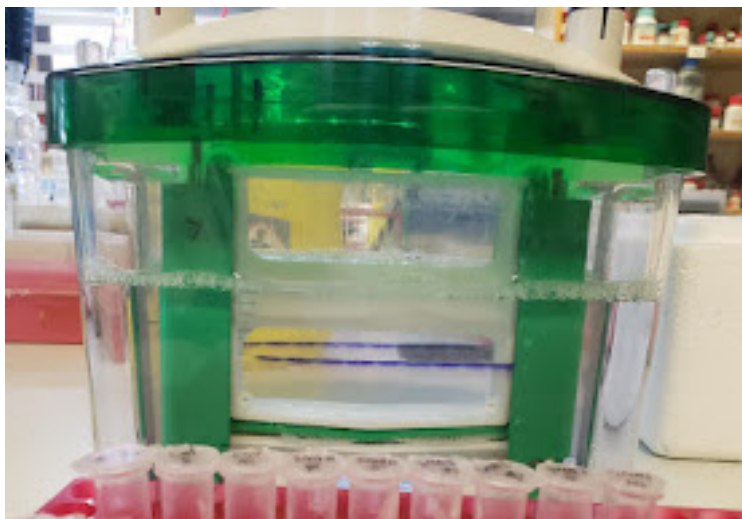
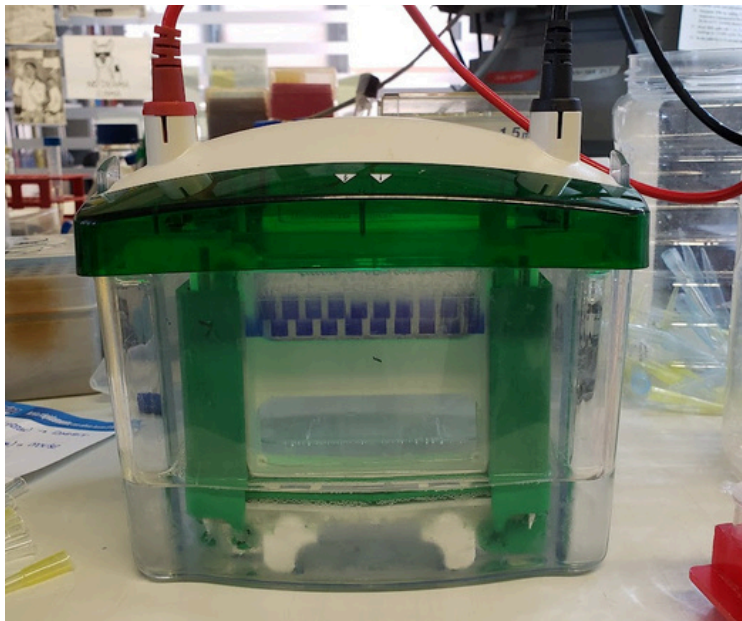
## 02 ELECTROFORESI



# PART PRÀCTICA WESTERN BLOT

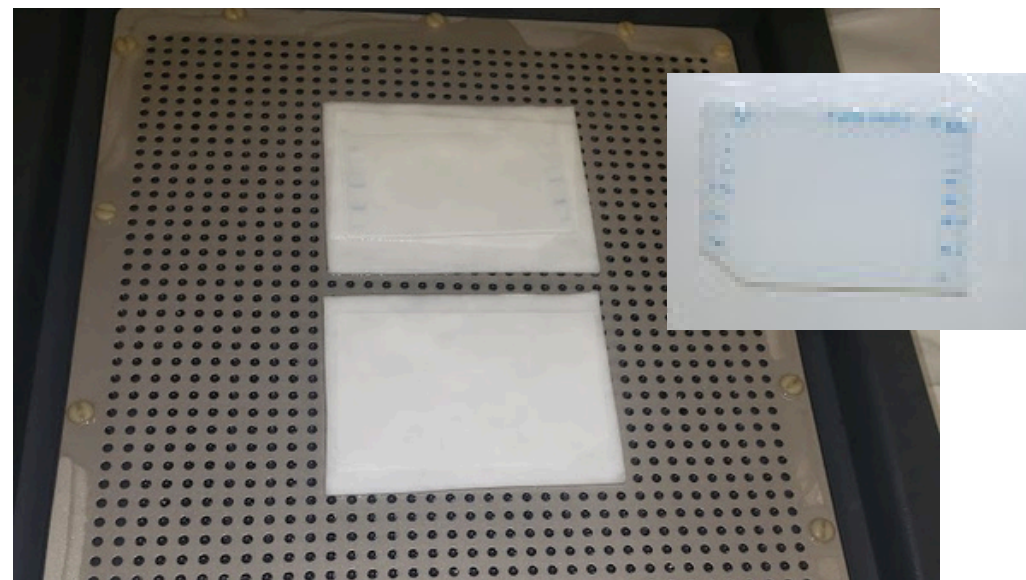
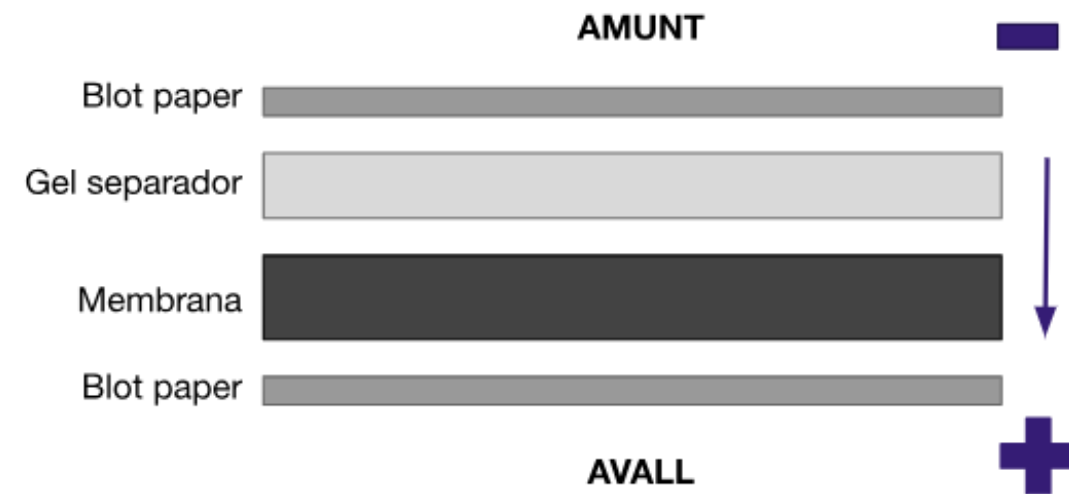
02

ELECTROFORESI



03

TRANSFERÈNCIA

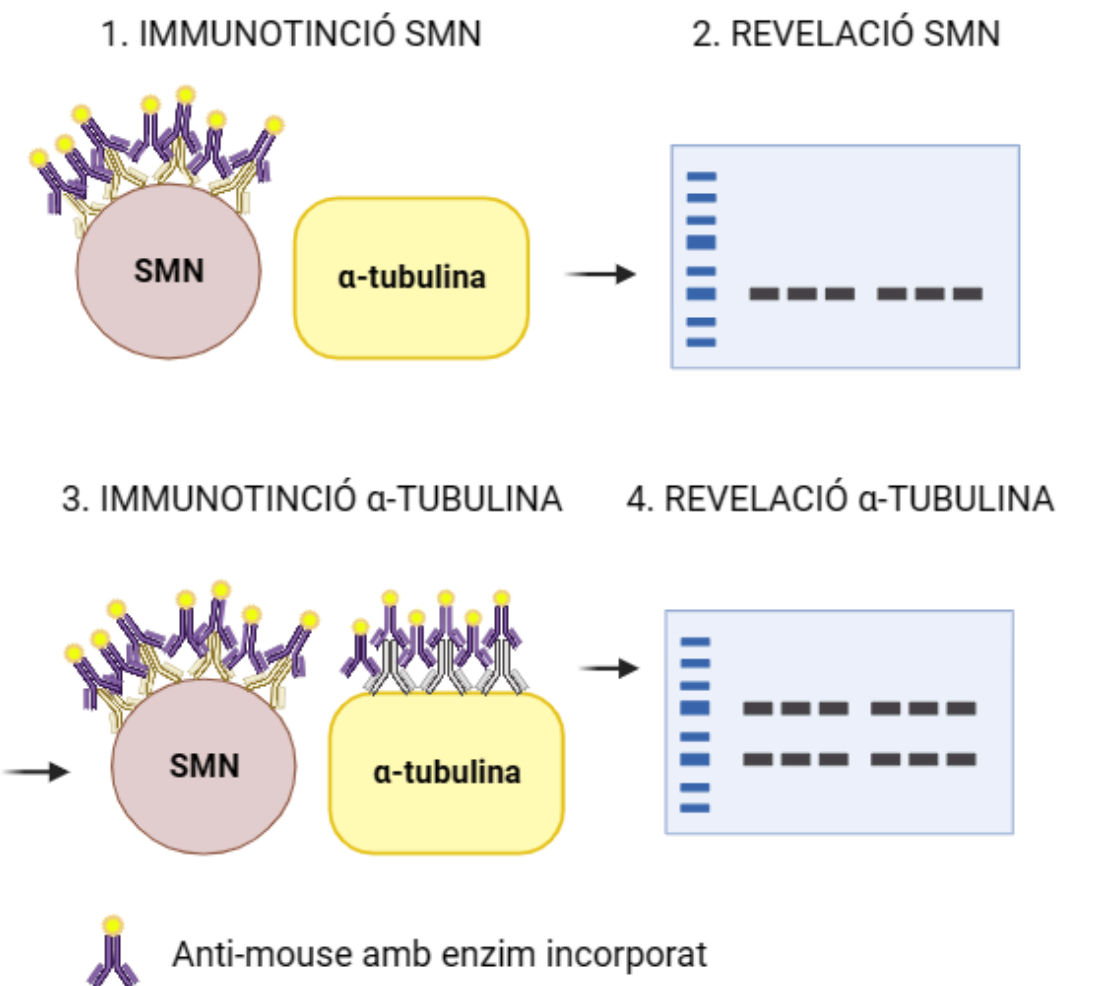


04

BLOQUEIG

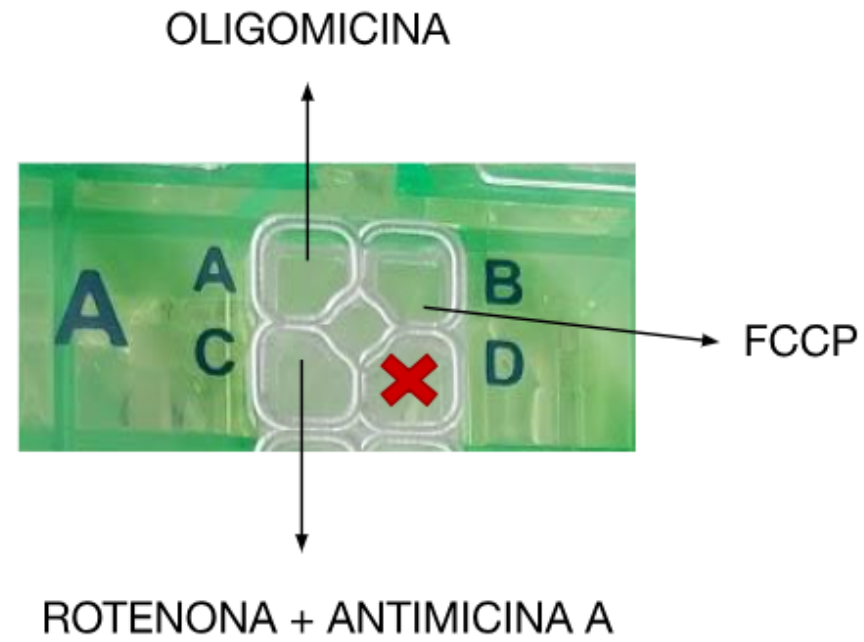
05

IMMUNOTINCIÓ I DETECCIÓ DE BANDES



# PART PRÀCTICA

# ANÀLISI SEAHORSE

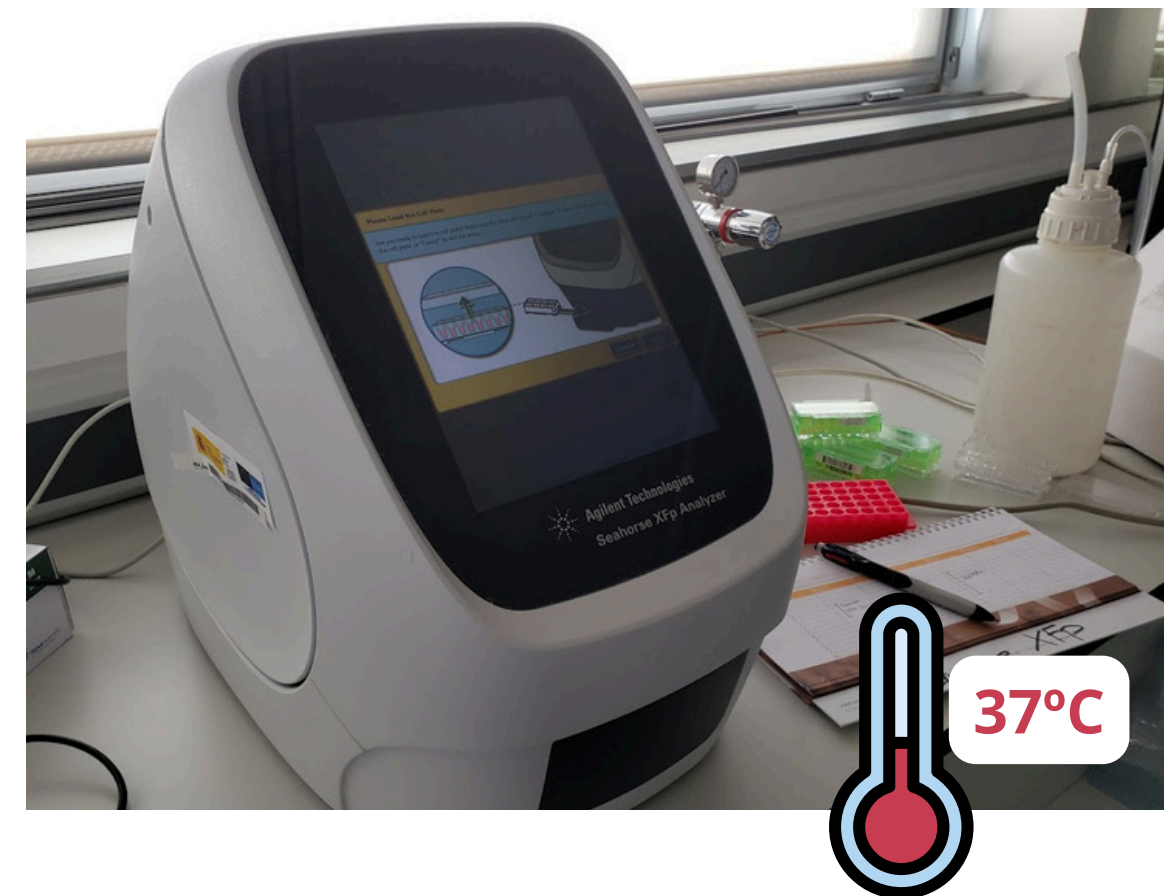


Mostres de MNs d'un individu sa i d'un pacient amb AME1

3 rèpliques

**Oxygen consumption rate**

- 01 PREPARACIÓ DE LES MOSTRES
- 02 DIA PREVI A L'ANÀLISI
- 03 PREPARACIÓ PREVIA A L'ASSAIG
- 04 EXECUCIÓ DE L'ANÀLISI
- 05 NORMALITZACIÓ I EXTRACCIÓ DE DADES

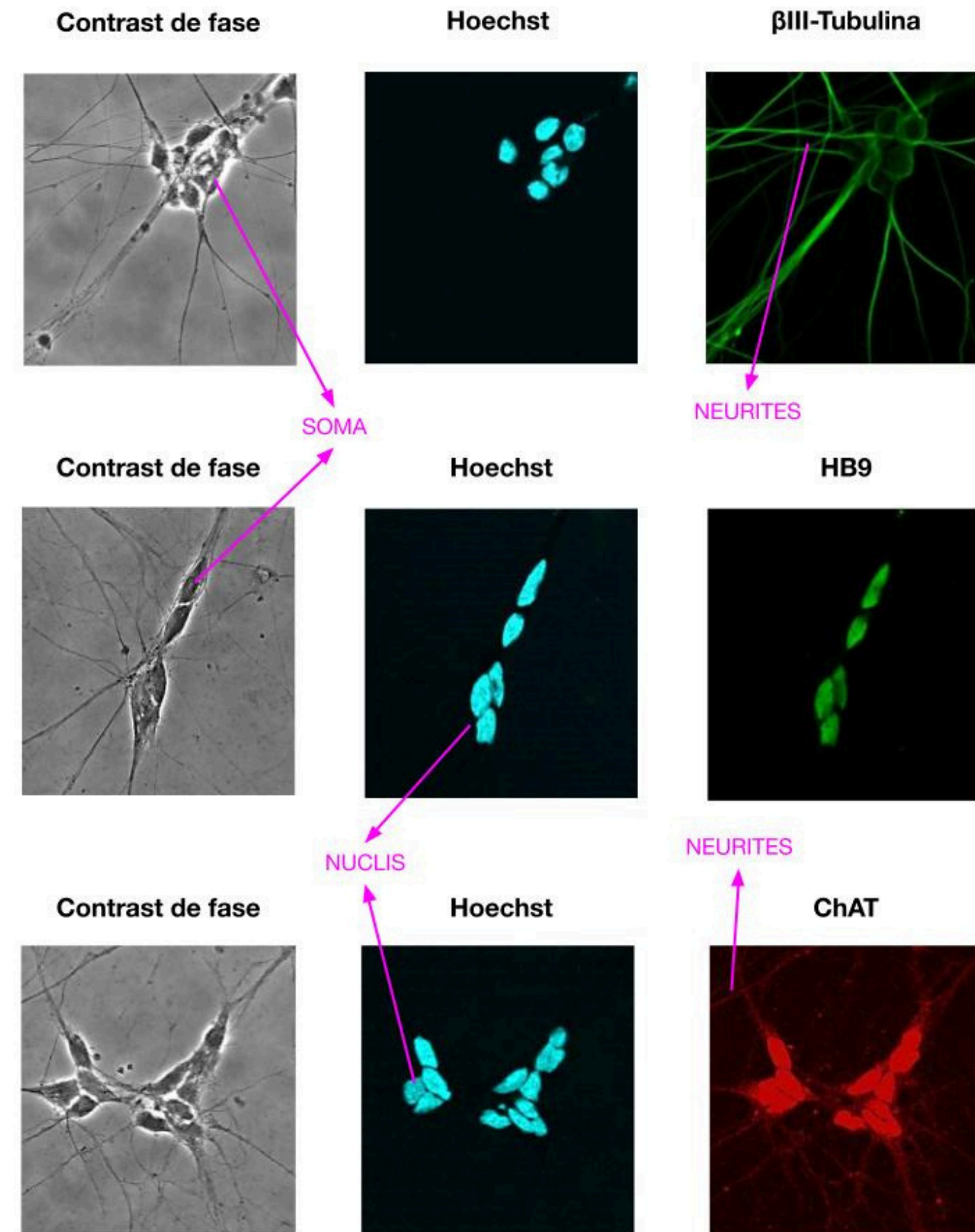


# RESULTATS

## IMMUNOFLUORESCÈNCIA

La majoria de hiPSCs es van diferenciar cap a MNs exitosament, desenvolupant totes les seves característiques.

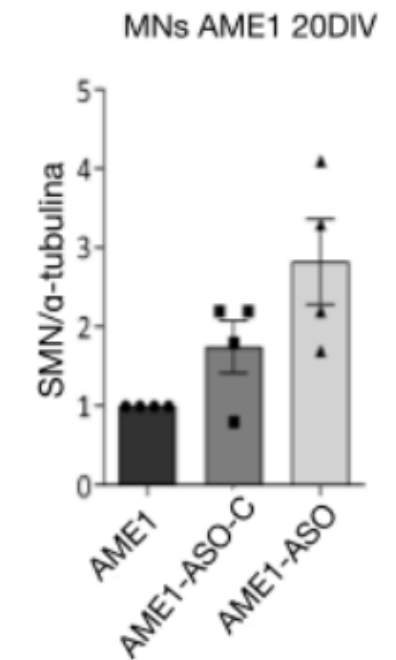
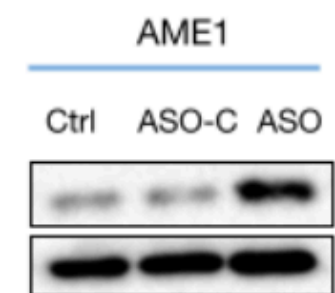
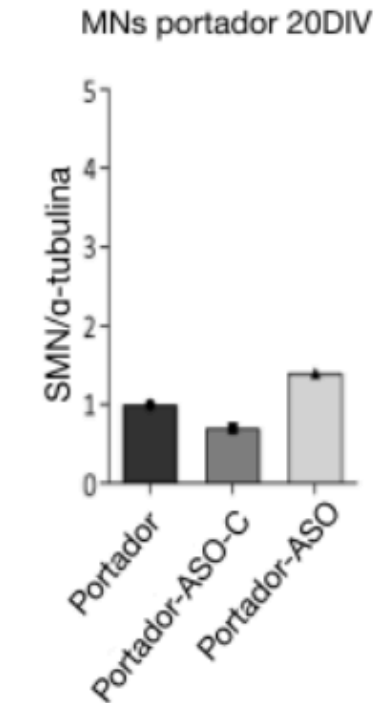
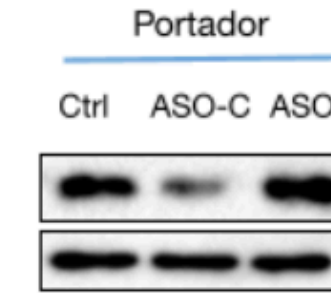
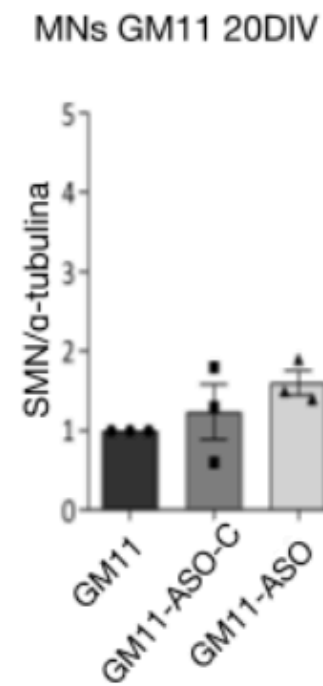
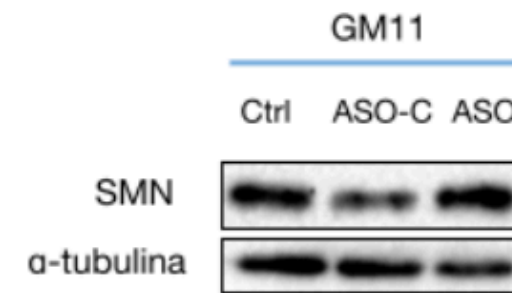
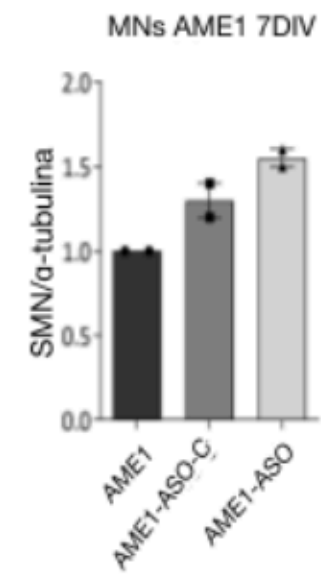
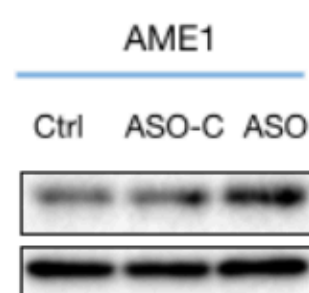
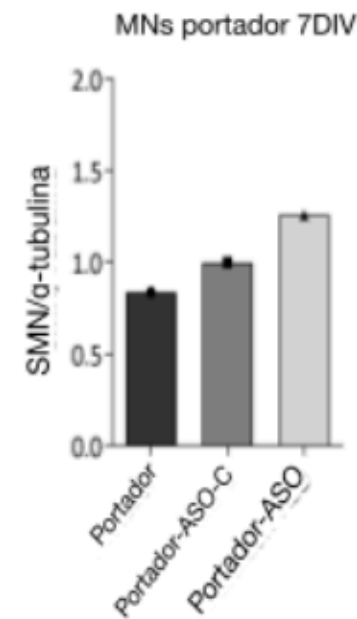
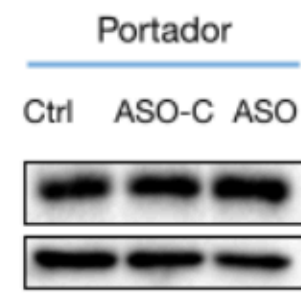
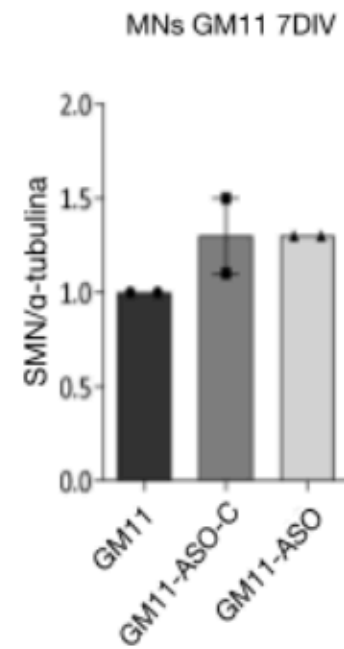
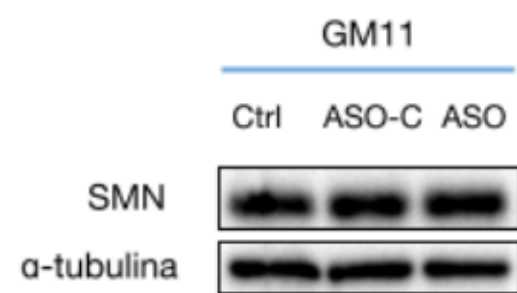
	Positiu	Negatiu
$\beta$ III-tubulina	97.000	3.000
ChAT	98.500	1.500
HB9	97.990	2.010
Mitjana	97.83	2.17



# RESULTATS WESTERN BLOT

7 dies in vitro

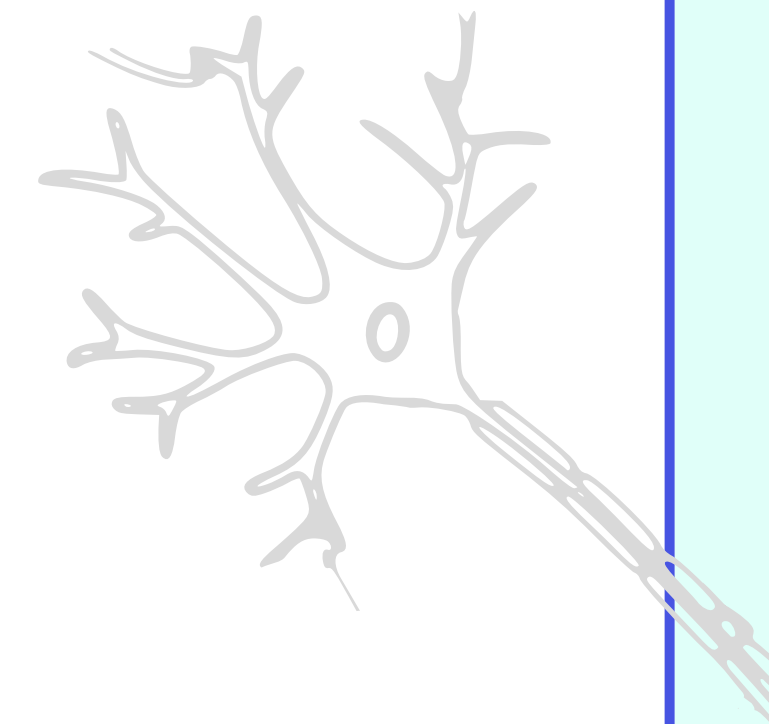
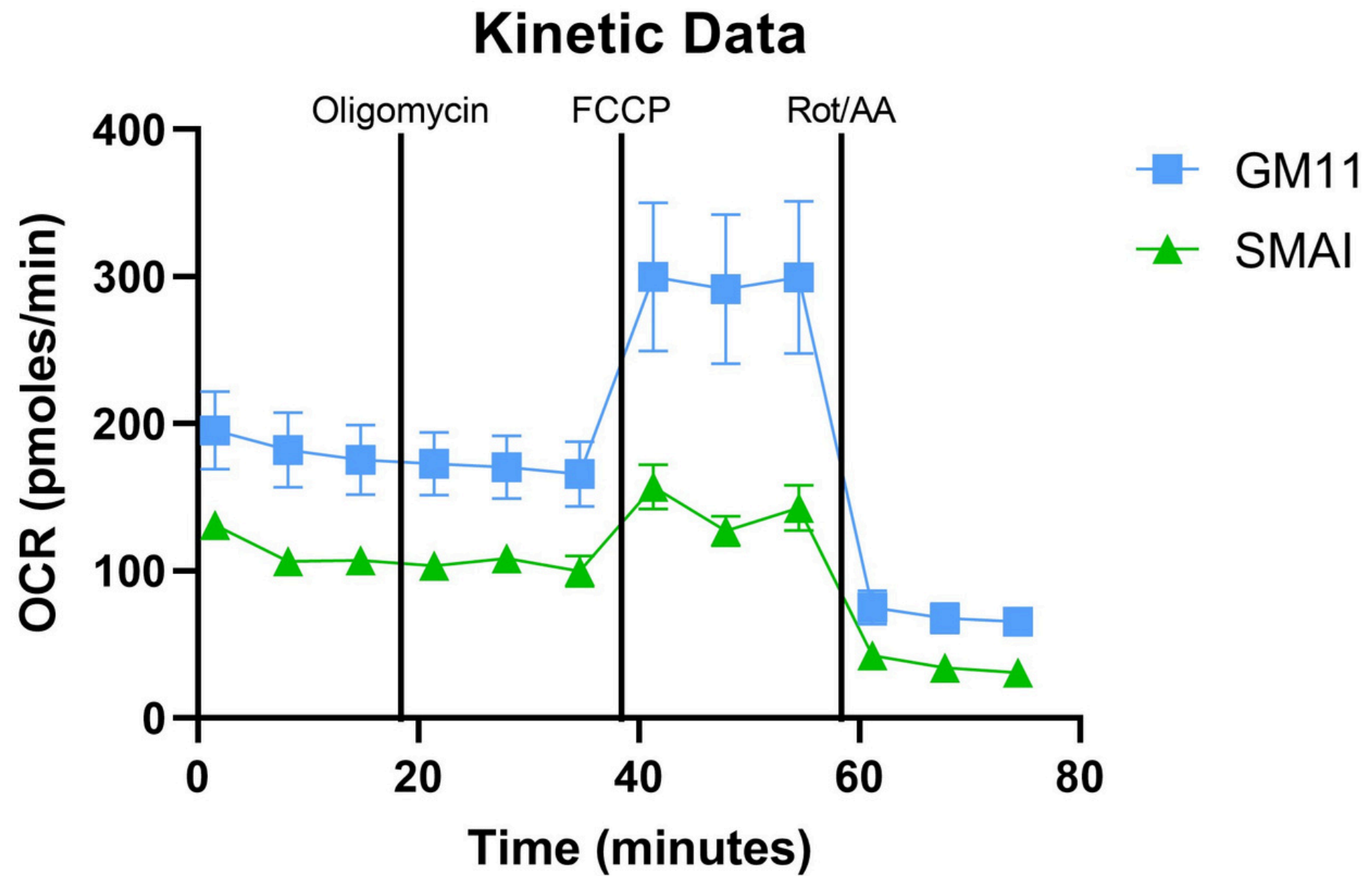
20 dies in vitro



En general s'observa un increment de SMN en les mostres tractades amb els ASOs

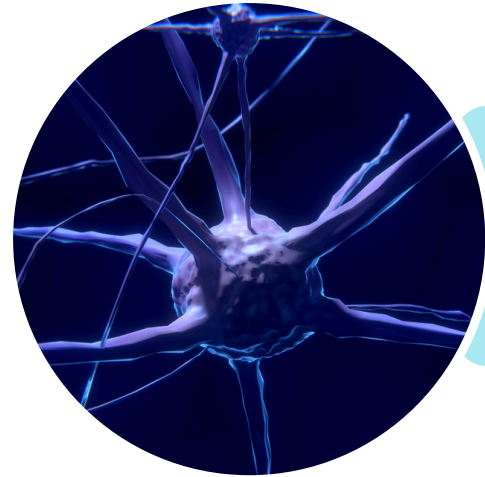


# RESULTATS ANÀLISI SEAHORSE



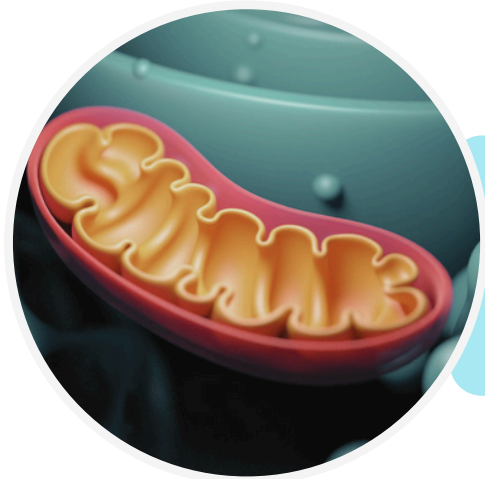
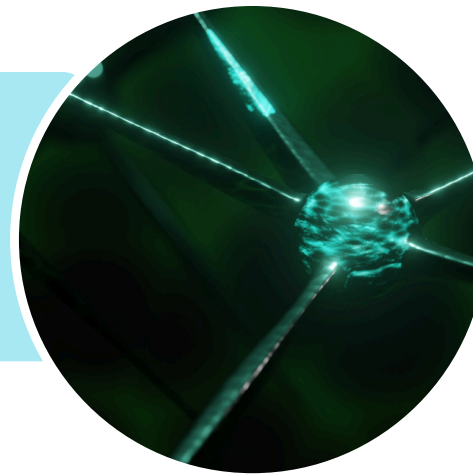
S'observa clarament que la respiració cel·lular de les MNs amb AME1 és inferior a la de les MNs d'una persona sana.

# | CONCLUSIONS



La tècnica de diferenciació de MNs a partir de hiPSCs és efectiva per l'estudi en humans de l'AME.

El tractament amb ASOs ajuda a incrementar els nivells de proteïna SMN produïda per les MNs afectades d'AME.



La funció mitocondrial de les MNs de pacients amb AME està afectada.



# **L'EXPERIÈNCIA ITINERA**



## FORMACIÓ LABORATORIS DE CULTIUS

Amb l'expedició del certificat corresponent.



## PRESENTACIONS DE MÀSTERS

Aprendre sobre la metodologia d'altres grups de treball i adquirir coneixements en altres àmbits de la salut.



## REUNIONS DEL GRUP DE TREBALL

Veure com es coordinen els components d'una unitat de treball.



## EXPERIMENTS DEL GRUP DE TREBALL

Coneixer la resta de línies d'investigació del grup de treball on estàs.



Coneixer de primera mà el **funcionament d'un laboratori de recerca** i dels diferents grups de treball.



**MOLTES GRÀNCIES PER LA  
VOSTRA ATENCIÓ**

BLAU MARTÍN CORDERO