# UNIVERSIDAD EUROPEA DE MADRID

**ESCUELA DE ARQUITECTURA, INGENIERÍA Y DISEÑO**

**ÁREA INGENIERÍA INDUSTRIAL**


## INGENIERÍA BIOMÉDICA

## TRABAJO FIN DE GRADO

# Estudio in vitro de la diferenciación miogénica en un modelo celular de distrofia muscular asociada a laminopatía


**Alumno: Javier Esteban Martínez**

**Director: D. Fernando de Miguel Pedrero**



**JUNIO 2025**

**TÍTULO**: Estudio in vitro de la diferenciación miogénica en un modelo celular de distrofia muscular asociado a laminopatía

**AUTOR**: Javier Esteban Martínez

**DIRECTOR DEL PROYECTO**: D. Fernando de Miguel Pedrero

**FECHA**: convocatoria ordinaria junio

# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, Miguel y Ana, por haberme brindado siempre la mejor educación posible, haberme inculcado desde pequeño la importancia de estudiar, ser responsable y, en definitiva, por haber sido una inspiración y apoyo incondicional siempre.

A mi hermana Paula por alegrar siempre mis días y a mis abuelos Julio y Ana por el cariño que siempre me han dado.

También, a mi director de TFG Fernando de Miguel Pedrero por su ayuda y orientación a la hora de realizar el proyecto. Sus paciencia, tiempo invertido y explicaciones han sido fundamentales para poder desarrollar el trabajo.

# RESUMEN

Las laminopatías son un conjunto de enfermedades genéticas con un espectro de patologías muy amplio y heterogéneo que son provocadas por mutaciones en las proteínas de la lámina nuclear. A estas proteínas se les conoce como laminas, se suelen localizar en él gen LMNA y están envueltas por la envoltura nuclear de las células eucariotas. Estas enfermedades son muy extrañas y tienen una baja incidencia en la población.

Uno de los síntomas más comunes afecta al tejido musculoesquelético provocando afecciones como distrofia muscular congénita (CMD), hipotonía o debilidad muscular generalizada. Sin embargo, no se conoce mucho acerca de tratamientos terapéuticos o aproximaciones médicas que puedan proporcionar una solución a la enfermedad. Recientemente, ha crecido el interés y el número de investigaciones relacionadas, lo que invita a pensar en nuevos avances en los años venideros.

Este proyecto recoge una investigación y recopilación literaria acerca de laminopatías y la CMD asociada a esta enfermedad. Además, se realizan una serie de experimentos de laboratorio, con líneas celulares de mioblastos de ratón, C2C12, enfocado en la formación de fibras musculares con mioblastos sanos y mutados con knockout para LMNA, como ocurre en la enfermedad de laminopatía. También, se aplican conceptos como la curva de crecimiento, se mide el alineamiento de las células y se crea un “organoide” o cultivo 3D con gelatina metacrilada como matriz que replica las características del tejido muscular esquelético y permite el encapsulamiento de las células.

Se analiza, interpreta y discute acerca de los resultados obtenidos, las diferencias que hay entre las células musculares sanas y mutadas y como estas afectan y condicionan a los enfermos de laminopatía.

**Palabras clave**: laminopatía, CMD, C2C12, mioblastos de ratón, fibras musculares, células musculares.

# ABSTRACT

Laminopathies are a group of genetic diseases with a very broad and heterogeneous spectrum of pathologies, caused by mutations in the nuclear lamina proteins. These proteins are known as lamins, are usually located in the LMNA gene, and are enclosed by the nuclear envelope of eukaryotic cells. These diseases are very rare and have a low incidence in the population.

One of the most common symptoms affects the musculoskeletal tissue, leading to conditions such as congenital muscular dystrophy (CMD), hypotonia, or generalized muscle weakness. However, little is known about therapeutic treatments or medical approaches that could provide a solution to the disease. Recently, there has been growing interest and an increasing number of related studies, which suggests the possibility of new advancements in the coming years.

This project presents a literature review and research on laminopathies and CMD associated with this disease. In addition, a series of laboratory experiments are carried out using mouse myoblast cell lines, C2C12, focusing on the formation of muscle fibers with both healthy myoblasts and LMNA-knockout mutants, as observed in laminopathy Concepts such as the growth curve are also applied, cell alignment is measured, and an 'organoid' or 3D culture is created using methacrylated gelatin as a matrix, which replicates the characteristics of skeletal muscle tissue and allows for cell encapsulationThe results obtained are analyzed, interpreted, and discussed, focusing on the differences between healthy and mutant muscle cells and how these differences affect and influence individuals with laminopathy.

**Keywords**: laminopathy, CMD, C2C12, mouse myoblasts, muscle fibers, muscle cells.

“Estar preparado es importante, saber esperarlo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida”

Arthur Schnitzler

# TABLA RESUMEN

| | **DATOS** |
|---|---|
| **Nombre y apellidos:** | Javier Esteban Martínez |
| **Título del proyecto:** | Estudio in vitro de la diferenciación miogénica en un modelo celular de distrofia muscular asociada a laminopatía |
| **Directores del proyecto:** | D. Fernando de Miguel Pedrero |
| **El proyecto se ha realizado en colaboración de una empresa o a petición de una empresa:** | NO |
| **El proyecto ha implementado un producto:** (esta entrada se puede marcar junto a la siguiente) | NO |
| **El proyecto ha consistido en el desarrollo de una investigación o innovación:** (esta entrada se puede marcar junto a la anterior) | SI |
| **Objetivo general del proyecto:** | Realizar ensayos de laboratorio acerca del crecimiento y diferenciación de células C2C12 sanas y mutadas aplicando diferentes técnicas y conceptos y relacionándolo con la enfermedad de laminopatía muscular |

# Índice

**AGRADECIMIENTOS** ..... 3
**RESUMEN** ..... 4
**ABSTRACT** ..... 5
**CLAVE DE ABREVIATURA** ..... 13
**Capítulo 1. RESUMEN DEL PROYECTO** ..... 15
1.1 Contexto y antecedentes ..... 15
1.2 Planteamiento del problema ..... 15
1.3 Objetivos del proyecto ..... 15
1.4 Experimentos realizados ..... 16
1.5 Resultados ..... 16
1.6 Estructura de la memoria ..... 17
**Capítulo 2. ANTECEDENTES / ESTADO DEL ARTE** ..... 18
2.1 Estado del arte ..... 18
2.2 Contexto y justificación ..... 20
2.3 Planteamiento del problema ..... 21
**Capítulo 3. OBJETIVOS** ..... 23
3.1 Objetivos generales ..... 23
3.2 Objetivos específicos ..... 23
3.3 Beneficios del proyecto ..... 24
**Capítulo 4. MARCO TEÓRICO** ..... 25
4.1 Introducción a la enfermedad de laminopatías ..... 25
4.1.1 Componentes de la envoltura nuclear ..... 25
4.1.2 Clasificación, localización y expresión de las laminas ..... 27
4.1.3 Enfermedades principales asociadas a laminopatías ..... 29
4.1.4 Historia y evolución de las laminopatías ..... 32
4.2 Distrofia muscular congénita asociada a laminopatía ..... 33
4.2.1 Distrofia muscular congénita (CMDs) ..... 33
4.2.2 Distrofia muscular congénita asociada al gen LMNA (L-CMD) ..... 34
4.3 Posibles terapias y tratamientos para laminopatías ..... 38
4.3.1 Tratamientos y cuidados actuales para enfermos de laminopatía ..... 38

4.3.2 Fármacos que inhiben la farnesilación de la progerina ..... 39
4.3.3 Edición del genoma humano con CRISPR/Cas9 ..... 41
4.3.4 Otros posibles métodos para combatir laminopatías ..... 43
4.3.5 Métodos de detección de laminopatía ..... 44
**Capítulo 5. DESARROLLO DEL PROYECTO** ..... 46
5.1 Planificación del proyecto y herramientas empleadas ..... 46
5.2 Objetivos de desarrollo sostenible ..... 47
5.3 Recursos requeridos ..... 48
5.3.1 Materiales químicos y biológicos ..... 48
5.3.2 Equipos y dispositivos ..... 48
5.4 Procedimientos de los experimentos ..... 49
5.4.1 Formación de fibras musculares ..... 49
5.4.2 Alineamiento y direcionalidad ..... 60
5.4.3 Curva de crecimiento ..... 62
5.4.4 Cultivo 3D con gelatina metacrilada ..... 67
5.5 Resultados experimentales ..... 74
**Capítulo 6. DISCUSIÓN** ..... 76
6.1 Interpretación y análisis de los resultados ..... 76
**Capítulo 7. CONCLUSIONES** ..... 79
7.1 Conclusiones del proyecto ..... 79
7.2 Conclusiones personales ..... 79
**Capítulo 8. FUTURAS LÍNEAS DE TRABAJO** ..... 81
**Capítulo 9. ANEXOS** ..... 83
**Capítulo 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... 84

# Índice de Figuras

Ilustración 1. Organización de la envoltura nuclear (5) ..... 25
Ilustración 2. Esquema de la estructura del núcleo (10) ..... 26
Ilustración 3. Estructura del complejo poro nuclear (11) ..... 27
Ilustración 4. Genes que codifican las laminas A, B y C (5) ..... 28
Ilustración 5. Índice de incidencia de principales mutaciones en el gen LMNA (24) ..... 36
Ilustración 6. Morfología Nuclear para líneas celulares mutadas (23) ..... 36
Ilustración 7. "Zokinvy" fármaco inhibidor de la farnesiltransferasa que sirve como tratamiento para la progeria infantil (26) ..... 40
Ilustración 8. Sistema CRISPR/Cas9 (28) ..... 41
Ilustración 9. Diagrama de Gantt sobre la cronología del TFG ..... 46
Ilustración 10. Alícuotas de células C2C12 sanas y C2C12 con Knockout para el gen LMNA ..... 49
Ilustración 11. Cabina de flujo laminar vertical ..... 50
Ilustración 12. Hemocitómetro con células C2C12 sanas en la parte superior y C2C12 KO en la parte inferior ..... 51
Ilustración 13. Cámara de hemocitómetro vista a microscopio ..... 52
Ilustración 14. Frascos T25 con C2C12 sanas/ Frascos T25 con C2C12 KO ..... 53
Ilustración 15. Limpiador ultrasónico con medios de cultivo "D10F" y "D3H" ..... 55
Ilustración 16. Bomba de vacío con punta de aspiración incorporada ..... 55
Ilustración 17. Placa p24 con C2C12 sanas y C2C12 KO con y sin gelatina ..... 56
Ilustración 18. $C2C12_0$ sin gelatina / $C2C12_0$ con gelatina / $KO_0$ sin gelatina / $KO_0$ con gelatina 56
Ilustración 19. $C2C12_0$ sin gelatina / $C2C12_0$ con gelatina / $KO_0$ sin gelatina / $KO_0$ con gelatina 56
Ilustración 20. Imagen filtrada $C2C12_0$ sin gelatina / $C2C12_0$ con gelatina / $KO_0$ sin gelatina / $KO_0$ con gelatina ..... 57
Ilustración 21. $C2C12_1$ sin gelatina / $C2C12_1$ con gelatina / $KO_1$ sin gelatina / $KO_1$ con gelatina 57
Ilustración 22. Imagen filtrada $C2C12_1$ sin gelatina / $C2C12_1$ con gelatina / $KO_1$ sin gelatina / $KO_1$ con gelatina ..... 58
Ilustración 23. $C2C12_6$ sin gelatina / $C2C12_6$ con gelatina / $KO_6$ sin gelatina / $KO_6$ con gelatina 58
Ilustración 24. Imagen filtrada $C2C12_6$ sin gelatina / $C2C12_6$ con gelatina / $KO_6$ sin gelatina / $KO_6$ con gelatina ..... 59
Ilustración 25. Día 0 / Orientación $C2C12_0$ sin gelatina / $C2C12_0$ con gelatina / $KO_0$ sin gelatina / $KO_0$ con gelatina ..... 60
Ilustración 26. Día 1 / Orientación $C2C12_1$ sin gelatina / $C2C12_1$ con gelatina / $KO_1$ sin gelatina / $KO_1$ con gelatina ..... 61
Ilustración 27. Día 6 / Orientación $C2C12_6$ sin gelatina / $C2C12_6$ con gelatina / $KO_6$ sin gelatina / $KO_6$ con gelatina ..... 61
Ilustración 28. Placa P6 con C2C12, C2C12KO y tubos eppendorf ..... 62
Ilustración 29. Curva de crecimiento de C2C12 y KO en un volumen de 10 $cm^2$ ..... 64
Ilustración 30. Curva de crecimiento de C2C12 y KO en un volumen de 1 $cm^2$ ..... 64
Ilustración 31. C2C12 y C2C12KO días 1,2,3 y 4 de la curva de crecimiento ..... 65

Ilustración 32. Gelatina metacrilada al 1% y 5% a temperatura ambiente ..... 68
Ilustración 33. Cultivo 3D de C2C12 y C2C12KO con gelatina metacrilada..... 69
Ilustración 34. C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1% ..... 69
Ilustración 35. C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1% ..... 70
Ilustración 36. Irradiación de luz azul sobre "organoide" con fotopolimerizador ..... 71
Ilustración 37. P24 con "organoide" compuesto por C2C12, LAP y gelatina metacrilada ..... 71
Ilustración 38. C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1% ..... 72
Ilustración 39. C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1% ..... 73
Ilustración 40. “Organoide” C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1%..... 73

# Índice de Tablas

Tabla 1. Resultados conteo hemocitómetro para C2C12 sanas..... 52
Tabla 2. Resultados conteo hemocitómetro para C2C12 KO..... 53

# CLAVE DE ABREVIATURA

**ABS** (**A**nti**b**iotic **S**olution): Solución antibiótica

**ADLD**: Leucodistrofia autosómica dominante

**ARNm**: Ácido ribonucleico mensajero

**C2C12**: Línea celular de mioblastos de ratón

**CMD** (**C**ongenital **M**uscular **D**ystrophy): Distrofia muscular congénita

**CRISPR (C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats): Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas

**CRISPR/Cas9** (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats / **C**RISPR-**as**sociated protein **9**): Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas / proteína asociada a CRISPR 9

**D3H**: (**D**MEM + **3**% **H**S): Medio DMEM con 3% de suero de caballo

**D10F**: (**D**MEM + **10**% **F**BS): Medio DMEM con 10% de suero fetal bovino

**DCM**: Distrofia muscular congénita

**DC** (**D**ilated **C**ardiomyopathy): cardiomiopatía dilatada

**DMEM** (**D**ulbecco's **M**odified **E**agle's **M**edium): Medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO** (**D**imethyl **S**ulfoxide): Dimetilsulfóxido

**ECG**: Electrocardiograma

**EDMD**: Distrofia muscular de Emery-Dreifuss

**EMG**: Electromiografía

**FBS** (**F**etal **B**ovine **S**erum): Suero fetal bovino

**FDA**: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

**FPLD2**: Lipodistrofia Familiar Parcial de Dunnigan

**FTI**: Inhibidor de la farnesiltransferasa

**HDR** (**H**omology **D**irected **R**epair): Recombinación homóloga

**HGPS**: Progeria o síndrome de Hutchinson-Gilford

**HS** (**H**orse **S**erum): Suero de caballo

**IF**: Intermediate filaments o filamentos intermedios

**Ig**: Inmunoglobulina

**LAP** (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate): Fosfinato de litio fenil-2,4,6-trimetilbenzol

**L-CMD** (**L**MNA-related **C**ongenital **M**uscular **D**ystrophy): Distrofia muscular congénita asociada a LMNA

**LGMD**: Distrofias musculares de cinturas

**LMNA**: Gen de la lamina A/C en *Homo sapiens*

**LMNB1**: Gen de la lamina B1 en *Homo sapiens*

**LMNB2**: Gen de la lamina B2 y B3 en *Homo sapiens*

**LPA**: Lipodistrofia parcial adquirida o síndrome de Barraquer-Simons

**NHEJ** (**N**on-**H**omologous **E**nd **J**oining): Unión de extremos no homólogos

**ODS**: Objetivos de desarrollo sostenible

**P24**: Placas mutipocillo de 24 pozos

**P6**: Placas multipocillo de 6 pozos

**PBS** (**P**hosphate-**B**uffered **S**aline): Solución salina fosfatada

**RE**: Retículo endoplasmático

**RER**: Retículo endoplasmático rugoso

**SNC**: Sistema nervioso central

# Capítulo 1. RESUMEN DEL PROYECTO

## 1.1 Contexto y antecedentes

Las laminopatías son un grupo de enfermedades raras causadas por defectos en proteínas de la lámina nuclear, una parte de la envoltura nuclear de las células eucariotas. Diversas alteraciones en los genes que codifican dichas proteínas están en la patogénesis de la enfermedad. Estas enfermedades son muy graves y desde una temprana edad comienzan a manifestarse provocando problemas musculares, alteraciones cardiacas, insuficiencias respiratorias y un envejecimiento prematuro entre muchas otras afecciones.

La baja incidencia de estas enfermedades en la población junto con la gran complejidad genética que suponen hace que exista una falta de financiación para investigar acerca de laminopatías. Todo esto implica, que no exista un tratamiento específico lo que conlleva a que los enfermos tengan esperanzas de vida muy reducidas, sean altamente dependientes y tengan que estar sometidos a cuidados médicos constantes.

## 1.2 Planteamiento del problema

La mayoría de laminopatías se deben a mutaciones en el gen LMNA, el cual desempeña funciones muy importantes en la estructura del núcleo celular. Una de ellas, es una distrofia muscular causada por mutaciones en el gen lamina A que codifica la proteína lamina A. Esta enfermedad concreta, es en la que se va a centrar gran parte de la investigación.

La distrofia muscular congénita (CMD) aparece en varias laminopatías y se caracteriza por provocar atrofia y debilidad muscular desde una temprana edad.

En este proyecto, se investiga y recopila información acerca de la distrofia muscular congénita en laminopatía y se realizan experimentos in vitro con mioblastos de ratón (C2C12) para esclarecer y documentar experimentos como la formación de fibras musculares in vitro o analizar el comportamiento de las C2C12 al crear un “organoide” o sustrato artificial que replica las características del tejido muscular esquelético.

## 1.3 Objetivos del proyecto

El objetivo principal del proyecto está enfocado en una secuencia de ensayos in vitro con mioblastos murinos (C2C12), sanos y mutados, acerca del crecimiento y diferenciación de ambos tipos y las diferencias que existen en el proceso de formación de fibras musculares. También, se busca medir distintos parámetros de las células como el crecimiento, la viabilidad o el alineamiento. Y se crea un “organoide” o tejido artificial que replica las características del tejido

muscular esquelético para favorecer el bienestar de las células y la formación de fibras musculares.

La otra parte del proyecto consiste en una investigación donde se recopila información y se revisa toda la literatura acerca de las laminopatías y la distrofia muscular congénita asociada a esta enfermedad.

En todo momento, se busca que haya una correlación entre ambas secciones.

## 1.4 Experimentos realizados

Crecimiento y diferenciación de células C2C12 sanas y mutadas. Incluye las diferencias en el proceso de formación de fibras musculares entre C2C12 sanas y mutadas.

Curva de crecimiento de una semana para ambas tipos de células, C2C12 sanas y mutadas.

Medir el alineamiento de las células en distintas etapas de la diferenciación con el software ImageJ.

Creación de un "organoide" de gelatina metacrilada, LAP y células C2C12 favoreciendo el entrecruzamiento de la gelatina metacrilada con un fotoiniciador y radiación electromagnética en el espectro de la luz azul.

## 1.5 Resultados

Las células C2C12 sanas son capaces de diferenciarse formando fibras musculares y las C2C12 mutadas no son capaces de hacerlo.

El crecimiento y división de las C2C12 sanas es más rápido que el de las C2C12 mutadas. Se descubre que para una densidad celular inicial de 5.000 células por $cm^2$ en el día 5 de la curva de crecimiento el número de C2C12 sanas duplica el de C2C12 mutadas.

Se comprueba que el alineamiento de las células favorece la formación de fibras musculares siendo mayor en células C2C12 sanas que en mutadas y siendo todavía superior el porcentaje de alineamiento si se realiza previamente un tapizado con gelatina.

Se crea un "organoide" que consiste en un polímero que replica las condiciones en las que se encuentran las células C2C12 en el tejido muscular y que las encapsula al irradiarlas con luz azul.

## 1.6 Estructura de la memoria

La memoria se ha organizado siguiendo la siguiente estructura:

- **Capítulo 1 "Resumen del proyecto"**: aborda los principales apartados del proyecto de forma breve para que cualquier persona que lo lea pueda obtener una noción básica y sencilla acerca del Trabajo Fin de Grado.
- **Capítulo 2 "Antecedentes/Estado del arte"**: en este apartado se habla de los principales documentos científicos que han servido como base para la investigación teórica, del contexto, justificación y del planteamiento del problema del proyecto.
- **Capítulo 3 "Objetivos"**: se establecen los objetivos del proyecto, dividiéndolos en principales y específicos. También, se habla acerca de los beneficios que puede aportar este proyecto.
- **Capítulo 4 "Marco teórico"**: se centra en la recopilación de información e investigación teórica en la que se profundiza en conceptos relacionados con las laminopatías y la distrofia muscular congénita asociada a dicha enfermedad.
- **Capítulo 5 "Desarrollo del proyecto"**: se explica minuciosamente los experimentos realizados con las células C2C12. En este capítulo, se expone el procedimiento empleado y los resultados obtenidos.
- **Capítulo 6 "Discusión"**: se analiza todo lo relacionado con el resultado de los experimentos y la interpretación de estos. Se habla de comparaciones, impresiones, limitaciones del experimento, hipótesis realizadas, posibles mejoras y errores cometidos entre otros temas.
- **Capítulo 7 "Conclusiones"**: se comenta acerca de las conclusiones, dividiéndolas en personales y del proyecto.
- **Capítulo 8 "Líneas futuras de investigación"**: se discute sobre cómo se podría continuar con el proyecto y que avances se podría tratar de alcanzar, centrándose en aquellos aspectos que tienen mucho potencial.
- **Capítulo 9: "Anexos"**: consiste en documentos complementarios ligados al proyecto.
- **Capítulo 10: "Referencias bibliográficas"**: se aportan identificadores de los documentos científicos empleados en el desarrollo del proyecto.

# Capítulo 2. ANTECEDENTES / ESTADO DEL ARTE

## 2.1 Estado del arte

Antes de empezar con el desarrollo de los capítulos principales, es importante hacer una recopilación y breve explicación de todos aquellos documentos científicos que han sido de utilidad para asentar las bases del conocimiento necesario para desarrollar este proyecto.

- **Estudio retrospectivo internacional de la historia natural de la distrofia muscular congénita relacionada con LMNA.** (1)

  En este artículo científico se recoge información acerca de un ensayo clínico con 190 pacientes, originarios de 23 países distintos y pertenecientes a 34 centros alrededor del mundo, que padecen distrofia muscular congénita asociada a laminopatías producidas por algún tipo de mutación en el gen LMNA. Este fue un estudio, a nivel mundial, ya que, debido a la bajísima prevalencia de esta enfermedad, encontrar a tantos enfermos y que sus familiares estén dispuestos a que sean monitorizados es bastante complicado y sirve para darse cuenta del alcance de este estudio. Al concluir la investigación, se dio una cohorte final para 151 individuos, de los cuáles 81 padecían L-CMD, 66 EDMD y 4 LGMD1B. De estas tres enfermedades, la L-CMD es claramente la que empieza a mostrarse antes, con un inicio de las manifestaciones musculares esqueléticas en los 2 primeros años de vida y se puede decir que la enfermedad que tiene diagnóstico más grave, dentro del complicado diagnóstico que tienen las tres variantes de CMD asociada a laminopatía que están involucradas en el ensayo clínico.

  La CMD asociada a cualquier laminopatía empieza a manifestarse desde el inicio de la vida y por esta razón los pacientes de este estudio empiezan a ser monitorizados desde los primeros meses después de su nacimiento. El estudio conllevó varios años de seguimiento personalizado a cada paciente, estimándose una media de 7 años de monitorización a cada enfermo.

  Este estudio sirvió para obtener muchos datos e información que resulta muy esclarecedora y permite conocer más acerca de estas enfermedades tan raras que empiezan a atacar a los pacientes desde el comienzo de sus vidas. También, como involucró a un gran número de enfermos se han podido recoger datos estadísticos de la CMD asociada a laminopatías. Algunos de estos datos incluyen información relevante como que la edad media a la que los pacientes comenzaba a manifestar síntomas de la enfermedad fue 0,9 meses de vida. La edad media de vida que vivieron los pacientes fue de 9 años. La mayoría de los pacientes conseguían la deambulación independiente en rangos de edad muy similares a los de un neonato sano, pero aquellos que no lo lograban tendían a que la enfermedad se desarrollase aún más rápido. Y se pretende confirmar y mejorar la evolución de los pacientes de L-CMD en función de su estado deambulatorio ya que se cree que esta característica está muy relacionada con el desarrollo de la enfermedad.

Este estudio fue un éxito gracias a toda la información recabada. No se consiguió ayudar demasiado a alargar la vida de los pacientes porque es muy complicado y se carece de un tratamiento específico, pero resultó ser un estudio muy esclarecedor que permitió establecer las fases de progresión clínica medidas por la pérdida de las facultades motoras funcionales y la aparición de problemas médicos.

- **Estudio del potencial de la edición génica mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para el tratamiento de la distrofia muscular congénita asociada a LMNA.** (2)

  En esta tesis doctoral, publicada en 2024, se explora una posible nueva alternativa para combatir la distrofia muscular congénita ligada al gen LMNA (L-CMD). Esta se basa en incorporar un método de edición genética conocido como CRISPR/Cas9 y aplicarlo en líneas celulares de mioblastos de ratón, C2C12, para tratar de erradicar las mutaciones que provocan la L-CMD. La tecnología CRISPR/Cas9 nos permite hacer modificaciones en el ADN de un organismo, ya sea agregando o quitando material genético. Está herramienta ha demostrado tener el potencial para poder combatir múltiples enfermedades genéticas en las próximas décadas.

  En el estudio in-vivo se usa CRISPR/Cas9 para tratar de eliminar una de las mutaciones más frecuentes en L-CMD. Está concretamente, se debe a un nucleótido cambiado en el exón 4 del gen LMNA en la posición 745 de la secuencia codificante (c.745C>T). La mutación hace que se produzca un cambio en un aminoácido, dando lugar a triptófano en vez de arginina en la posición 249 (p.R249W). Por lo tanto, lo que la tesis pretende es eliminar el alelo mutante R249W mediante la edición genética. Además, también se creó un modelo homocigótico de ratón con las células musculares C2C12.

  Los resultados para la destrucción del alelo mutante R249W fueron muy positivos y esperanzadores Se propone que la eliminación del exón 4 podría ser una estrategia terapéutica. Si se consiguen extrapolar, en un futuro cercano, los resultados obtenidos con células de ratón a células humanas se podrían curar una de las variantes más frecuente de la L-CMD, ya que se piensa que, si se consigue revertir la mutación, lo más probable es que se pueda acabar también con las manifestaciones y síntomas patológicos.

- **Las mutaciones de novo en LMNA causan una nueva forma de distrofia muscular congénita.** (3)

  Ensayo clínico dirigido por la doctora Susana Quijano-Roy y publicado en el año 2008. Está investigación fue de vital importancia ya que permitió identificar una nueva entidad patológica de laminopatía que es la distrofia muscular congénita asociada al gen LMNA, también conocida como L-CMD.

  El ensayo clínico consistió en estudiar y monitorizar un grupo de 15 pacientes que ya en su primer año de vida sufrían miopatía y otros síntomas que eran más graves que el del resto de laminopatías y CMDs estudiadas hasta la fecha. A los enfermos se les sometía a exámenes neurológicos y genéticos, y todos tenían la peculiar coincidencia de que el gen

mutado LMNA se encontraba en estado de heterocigosis de novo. Nos referimos al término "de novo" cuando se produce una alteración genética que aparece por primera vez en un individuo, es decir, que esta mutación no es heredada por parte de sus progenitores.

Con el paso del tiempo, los investigadores se dieron cuenta de que las manifestaciones patológicas eran muy agresivas y aparecían de forma muy temprana. Era frecuente que los niños presentasen el síndrome de cabeza caída y en los pacientes con pronóstico más graves no tenían ningún desarrollo motor y no eran capaces de aprender a andar de forma independiente. Todas estas afecciones, solían ir acompañadas de graves problemas musculares, insuficiencias respiratorias y problemas cardiacos como arritmias.

En el momento que se realizó el ensayo clínico, las enfermedades más similares que se conocían era la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), una distrofia muscular de cinturas asociada con defectos del sistema de conducción cardíaca conocida como LGMD1B y una forma de distrofia muscular de cinturas dilatada o DCM-CD. En primera instancia se pensaba que los pacientes del ensayo presentaban alguna variación más maligna de esta enfermedad, pero al concluir la monitorización y ver que las manifestaciones patológicas eran relativamente diferentes a las de las enfermedades nombradas previamente, se concluyó que se trataba de una nueva variante o tipo de laminopatía.

Por lo tanto, los resultados de la investigación clínica llevaron a la interpretación de que se encontraban ante un tipo de laminopatía nunca vista con anterioridad porque los síntomas que padecían los pacientes eran más graves y aparecían de forma más temprana. Esta enfermedad se conoce como L-CMD.

## 2.2 Contexto y justificación

Las laminopatías son un conjunto de enfermedades genéticas muy heterogéneas causadas por defectos en las láminas de la envoltura nuclear de las células eucariotas. Estas enfermedades tienen consecuencias muy severas en los enfermos provocando problemas musculares, alteraciones cardiacas, trastornos metabólicos, neuropatías, afecciones respiratorias y síndromes de envejecimiento acelerado entre otras.

Este grupo de enfermedades son catalogadas como muy raras y se caracterizan por tener una prevalencia muy reducida en la población en la que por cada 10000 habitantes hay menos de 5 personas que padecen la enfermedad. En España, hay alrededor de 10 personas que padecen la enfermedad de laminopatía. (4)

Esta enfermedad degenerativa no tiene ningún tipo de cura o terapia especializada y debido a su extrema rareza apenas hay recursos económicos que permitan investigar acerca de ella. Por lo tanto, debido a la falta de financiación y la gran complejidad biológica y genética que estás enfermedades suponen, las personas que sufren laminopatías tienen esperanzas de vida mucho

más reducidas, son altamente dependientes y tienen que estar sometidos a cuidados médicos constantes.

Aparte de ser una enfermedad de muy baja incidencia, hay que añadir que la existencia de las laminopatías se conoce desde hace pocos años. La primera aparición de una enfermedad asociada a laminopatía comienza en 1994, cuando se descubre una mutación en la proteína emerina, una proteína transmembrana que se encuentra en la lamina nuclear. Más tarde, esta enfermedad se conocería como distrofia muscular de Emery Dreifuss (EDMD) y se caracteriza por provocar atrofia y debilidad muscular. (5)

Con el paso del tiempo, se sigue investigando acerca de esta enfermedad y van apareciendo nuevos casos que tienen varias similitudes con la primera laminopatía identificada. Surgen diferentes laminopatías que tienen en común que afectan a las proteínas lamina de la envoltura nuclear. Hoy en día, las laminopatías comprenden un grupo de más de 15 enfermedades diferentes, cada una con sus particularidades específicas, pero es frecuente que haya varias manifestaciones clínicas que se repitan como la distrofia muscular, el envejecimiento prematuro, las lipodistrofias o las miocardiopatías. Esto quiere decir que los mecanismos patológicos de este conjunto de enfermedades son muy similares por lo que cualquier avance que se produzca en alguna de las enfermedades será muy beneficioso para el resto de las patologías asociadas.

En la actualidad, hay mucha más investigación e información acerca de las laminopatías. Existen grupos de investigación que han elaborado ensayos clínicos para tratar de esclarecer o encontrar algún tipo de solución con lo que luchar contra esta enfermedad, pero lo cierto es que, hoy en día, no hay ningún método viable que haya sido probado en humanos. A pesar de los avances, este grupo de enfermedades no tienen cura y solo se puede ayudar a los pacientes con algún tipo de terapia, cuidados paliativos, fisioterapia muscular, dispositivos de ortopedia, cirugías para corrección de escoliosis y mediante la implantación de dispositivos médicos como desfibriladores.

## 2.3 Planteamiento del problema

La gran mayoría de las laminopatías están asociadas a mutaciones en el gen LMNA, el cual codifica las proteínas lamina A y C que desempeñan funciones muy importantes en la estructura del núcleo celular. En la actualidad, se conocen más de 400 mutaciones en el gen LMNA en pacientes. Estas mutaciones se encuentran distribuidas a lo largo de todo el gen y están asociadas con una amplia variedad de fenotipos.(6)

Una de esas laminopatías es una distrofia muscular causada por mutaciones en el gen lamina A que codifica la proteína lamina A. Esta laminopatía concreta, es en la que se va a centrar gran parte de la investigación.

La distrofia muscular congénita (CMD) es una enfermedad que provoca atrofia y debilidad muscular. No es específica de laminopatías, sino que se produce en una serie de enfermedades diferentes, pero cuando está asociada a estas, la enfermedad aparece a edades muchos más tempranas y el pronóstico es más grave. El gen LMNA mutado, es uno de los genes que tiene mayor incidencia en la CMD. (7)

Aunque aún no haya una estrategia terapéutica concreta que haya demostrado poder dar una solución a las mutaciones genéticas que aparecen en el gen LMNA, en los últimos años, ha habido un aumento de la investigación acerca de esta enfermedad y cada vez hay una mayor cantidad de propuestas. Hasta el momento, no existe ningún método específico probado en humanos, pero si hay varias líneas de investigación muy interesantes que han conseguido hacer grandes avances.

Con la terapia génica CRISPR/Cas9 se puede modificar el código genético para erradicar las mutaciones que se producen en los genes que sintetizan las laminas. Se están desarrollando algunos fármacos que pueden inhibir el proceso de farnesilación lo cual podría ayudar a erradicar laminopatías como la progeria infantil. La mayoría de estas investigaciones se encuentran en fases experimentales, pero ya suponen grandes logros y un camino por el que seguir avanzando.

Para este tipo de investigaciones, resultan de gran utilidad los modelos animales de laminopatía. Estos son empleados para tratar de dar solución a dichas mutaciones genéticas a través de estudios de laboratorio con células animales para después poder interpolar los resultados al código genético humano y tratar de erradicar las mutaciones genéticas en LMNA. En este contexto, las C2C12, línea celular de mioblastos de ratón, suelen ser de las más empleadas debido a su alta similitud con el genoma humano y a que son fáciles de cultivar y manipular genéticamente.

Con este proyecto, se pretende realizar una investigación exhaustiva acerca de las laminopatías y la CMD asociada a esta, consultando la literatura actual que hay acerca de este contenido y abordando temas muy interesantes como dónde y cómo se producen las laminopatías, síntomas y alteraciones que provocan, tipos principales de enfermedades y avances en estrategias terapéuticas y ensayos clínicos entre otros muchos temas. Además, se relaciona este apartado con una serie de experimentos in vitro con células musculares, con los que se documenta todo el proceso con imágenes y explicaciones precisas. Para ello, se usas células de ratón C2C12 para mostrar la formación de fibras musculares y comparar el proceso con células mutadas. Se aplican conceptos como la curva de crecimiento, se mide el alineamiento de las células y se trata de replicar el entorno del tejido muscular esquelético creando un “organoide”, que permite el crecimiento y diferenciación de las células en suspensión.

Por último, hay que explicar que el fin de estos experimentos no es realizar un descubrimiento que suponga un gran avance sino proporcionar un contexto visual y descriptivo que facilite y ayudé a comprender conceptos acerca de las células musculares y la CMD. En este proyecto, se pretende relacionar, en todo momento, los estudios experimentales con toda la información agrupada en la investigación teórica.

# Capítulo 3. OBJETIVOS

## 3.1 Objetivos generales

El objetivo principal consiste en realizar una serie de experimentos con células musculares de ratón, C2C12, donde se analizan e interpretan los resultados obtenidos acerca de la formación de fibras musculares y combinarlo con una revisión, análisis y recopilación de la literatura científica acerca de laminopatías y CMD. En todo momento, se busca que ambas partes vayan enlazadas y se complementen la una con la otra.

Objetivos generales del proyecto:

- Elaborar un apartado teórico acerca de laminopatías y CMD con la intención de que ayude al entendimiento y conocimiento de esta enfermedad de manera sencilla.
- Realizar un procedimiento experimental con mioblastos de ratón y documentar el proceso proporcionando un contexto visual y descriptivo.
- Correlacionar los hallazgos, conocimientos y análisis experimentales con la información teórica recopilada para que el proyecto sea más completo.

Es importante recalcar que el objetivo de la parte experimental no es lograr un descubrimiento o gran avance sino explicar de forma detallada el procedimiento que se ha seguido e interpretar y evaluar los resultados y conclusiones a las que se llegan.

## 3.2 Objetivos específicos

A continuación, se recogen objetivos concretos en referencia a los dos apartados principales del proyecto: la parte de recopilación teórica y la parte experimental.

Objetivos teóricos específicos del proyecto:

- Explicar las manifestaciones clínicas, mecanismos fisiopatológicos, origen, principales tipos y motivos que provocan la enfermedad.
- Exponer las mutaciones y patología asociada que afectan al tejido musculoesquelético en relación con laminopatía.
- Describir los principales tratamientos, métodos, y aproximaciones terapéuticas actuales y en desarrollo para poder combatir la enfermedad de laminopatía.

Objetivos experimentales específicos del proyecto:

- Documentar el proceso de crecimiento y diferenciación de células C2C12 sanas y mutadas.
- Comparar como es la formación de fibras musculares dependiendo de si las C2C12 están sanas o mutadas.
- Realizar una curva de crecimiento de 7 días para células sanas y mutadas y calcular el número medio de generaciones.
- Analizar parámetros clave de las células musculares como el alineamiento o la viabilidad.

- Crear un "organoide" que replique el entorno y características del tejido muscular esquelético y estudiar el comportamiento de las células en él.
- Discutir, evaluar e interpretar los resultados obtenidos y como estos se pueden interpretar en función al diagnóstico y patología actual de las laminopatías musculares.
- Cumplir con algunos de los objetivos de desarrollo sostenible.

## 3.3 Beneficios del proyecto

Con la elaboración de este proyecto, se aportan una serie de conocimientos y bases acerca de las laminopatías y la CMD que permiten una mayor compresión y entendimiento de la patología y los riesgos a los que están sometidos los pacientes. Con la parte experimental, la intención principal es exponer las grandes diferencias que existen en la formación de fibras musculares entre células C2C12 normales y C2C12 KO para el gen LMNA, haciendo referencia a ratones sanos y ratones que padecerían algún tipo de laminopatía muscular respectivamente. Con esto, se comprueba experimentalmente que la ausencia de la proteína lamina A, presente en LMNA, afecta a la formación de fibras musculares y la contracción y relajación de los músculos, lo cual refleja defectos parecidos a los que sufren los pacientes de laminopatías musculares. Además, se exploran otras aproximaciones tecnológicas que pueden ser de ayuda en la lucha contra las laminopatías, como los cultivos 3D que replican las condiciones del músculo combinando células C2C12, agente intercalante y gelatina metacrilada. Estas herramientas tienen un gran potencial en el campo de la medicina regenerativa y podrían ser empleadas en futuras terapias para tratar laminopatías. Por último, el proyecto sirve para destacar el potencial que tienen los modelos in vitro de células animales para investigar acerca de la CMD en laminopatía.

# Capítulo 4. MARCO TEÓRICO

## 4.1 Introducción a la enfermedad de laminopatías

### 4.1.1 Componentes de la envoltura nuclear

La mayoría de las células eucariotas cuentan con envoltura nuclear. Esta es una estructura formada por una doble capa lipídica que separa y, a la vez, relaciona el núcleo y el citoplasma de las células. La envoltura nuclear está integrada por la membrana nuclear externa, la membrana nuclear interna, los poros nucleares y la lámina nuclear. (8)

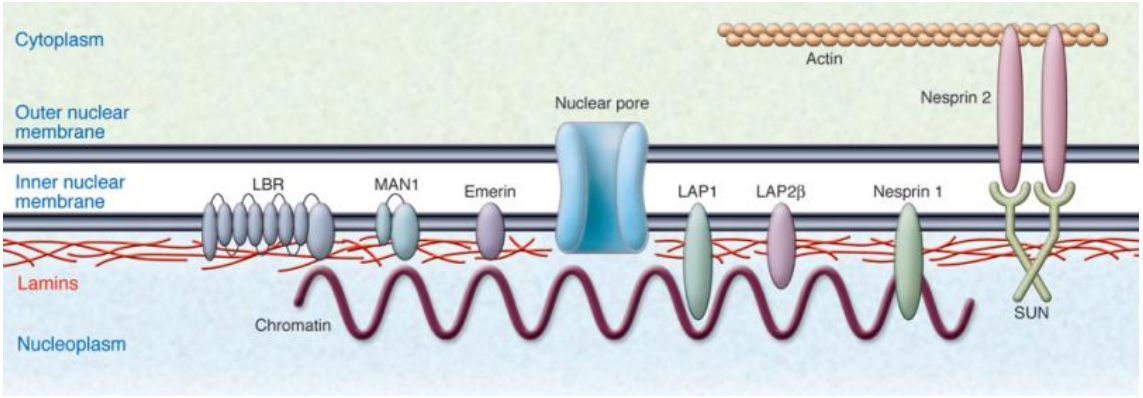



*Ilustración 1. Organización de la envoltura nuclear (5)*

La membrana nuclear externa, situada entre citoplasma y espacio intermembranoso, se encuentra en continuidad con el retículo endoplasmático rugoso (RER), es decir ambas estructuras se encuentran interconectadas y no se distingue una separación física entre ambas. Al estar adheridas, la membrana nuclear interna contiene ribosomas y una serie de proteínas de membrana. Entre ambas membranas se encuentra el espacio intermembranoso o perinuclear, tiene una longitud aproximada de 25 a 40 nm, en el que se encuentran las cisternas nucleares que están interconectadas con el lumen del retículo endoplasmático.

Al otro lado del espacio intermembranoso se encuentra la membrana nuclear interna que se encuentra en contacto directo con la lámina nuclear y está situada entre el espacio intermembranoso y el nucleoplasma. En ella, hay una serie de proteínas transmembranales que interaccionan con la lámina nuclear y la cromatina. Algunas de las más destacadas son la MAN1, la proteína SUN, el receptor de la lámina B, el polipéptido asociado a la lámina tipo 1 (LAP1), el LAP2 y la emerina. Estas proteínas están involucradas en la detección del núcleo, la configuración

de la cromatina, la transcripción genética, la regulación de la síntesis y respuesta al daño del ADN, la diferenciación y migración celular y la progresión del ciclo celular. (8)

La doble cubierta nuclear no es continua, sino que esta se ve interrumpida por poros nucleares, los cuáles permiten la comunicación y transporte entre el citoplasma y el nucleoplasma mediante transporte selectivo pasivo facilitado entre ambos compartimentos.

Los poros nucleares, también, son importantes en la respuesta a señales externas y en la diferenciación de las células determinando fenómenos como la salida del $ARN_m$ al citoplasma o la llegada al núcleo de los factores de transcripción que afectan a la expresión génica. (9)

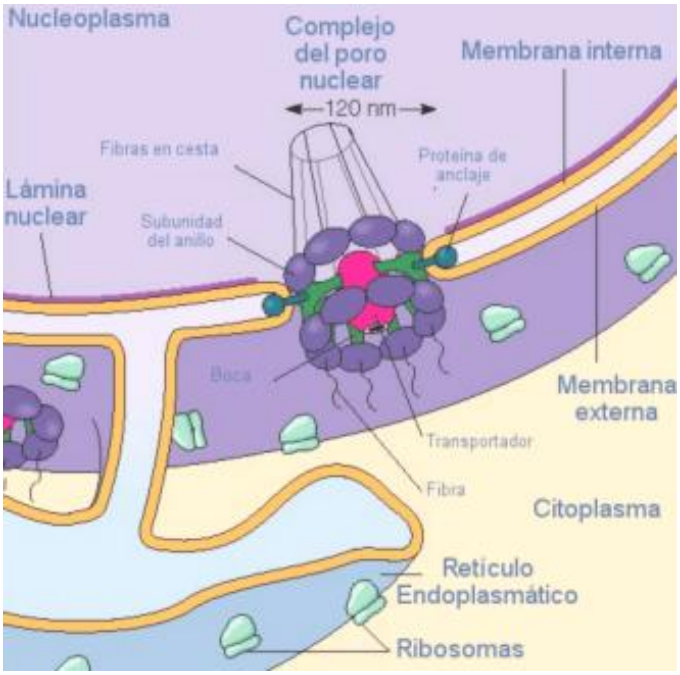



*Ilustración 2. Esquema de la estructura del núcleo (10)*

Según el Atlas de Histología de la Universidad de Vigo (2021), "Se estima que en una célula promedio puede haber unos 11 poros por $\mu m^2$ de envoltura nuclear, lo que equivale a unos 3000 a 4000 poros por núcleo" (9). El complejo del poro nuclear está formado por un conjunto de proteínas denominadas nucleoporinas, las cuáles se clasifican principalmente atendiendo a su función. Existen proteínas que se anclan a la membrana, que forman el andamiaje, que forman el canal, y las que integran los filamentos y la cesta nuclear. Las que se anclan a la membrana se caracterizan por sujetar todo el complejo, las de andamiaje forman anillos, las de canal conforman el interior del poro nuclear y se encargan de regular el paso de moléculas a través del poro y en cuanto a las nucleoporinas que constituyen los filamentos su función es reconocer cuáles son las proteínas que tienen que transportarse a través del poro. (9)

Las nucleoporinas destacan por regular el transporte selectivo de sustancias como proteínas y moléculas, dar estabilidad al complejo del poro y por interactuar con la cromatina.

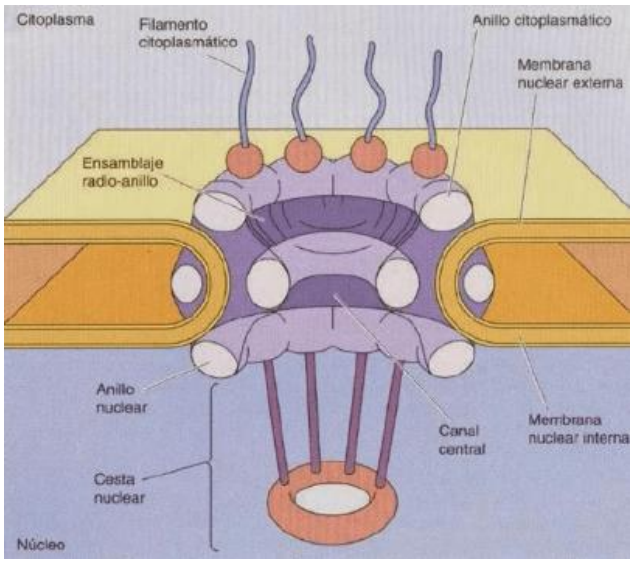



*Ilustración 3. Estructura del complejo poro nuclear (11)*

Finalmente, el último elemento primordial que forma parte de la envoltura es la lámina nuclear. Mutaciones en esta estructura es lo que provoca la enfermedad de laminopatía. La lámina nuclear consiste en una estructura formada por una red de proteínas fibrosas situada entre la membrana nuclear interna y el nucleoplasma. Las proteínas que conforman la lámina nuclear se denominan laminas y se clasifican en lamina A, lamina C y lamina B, esta última subdividida en B1, B2 y B3.

La función principal de la lámina nuclear es mantener la estructura de la envoltura nuclear dando estabilidad y permitiendo conservar la forma del núcleo. También, sirve para conectar el núcleo de la célula con el citoesqueleto a través de una serie de proteínas de membrana como las emerinas y las nesprinas. Interactúa con la cromatina facilitando su organización, participa en la regulación de la expresión génica y es vital en el proceso de mitosis durante la desorganización y la organización de la envoltura nuclear.

### 4.1.2 Clasificación, localización y expresión de las laminas

Existen tres tipos de proteínas laminas, las A, B y C, que están codificadas por tres genes diferentes. Las laminas A y C provienen del procesamiento alternativo del gen LMNA, situado en la región 1q21.3 del cromosoma 1 humano, y formado por 12 exones y 11 intrones. Las

proteínas laminas sintetizadas por el gen LMNA se puede clasificar en 4 subtipos que son las laminas A, C, AΔ10 y C2. (2)

Por otro parte, las proteínas laminas B son sintetizadas por dos genes diferentes. Las laminas B1 están codificadas por el gen humano LMNB1, localizado en el locus 5q23.2 del cromosoma 5 y las laminas B2 y B3 son sintetizadas por procesamiento alternativo por el gen LMNB2, que se encuentra en el locus 19q13.2 del cromosoma 19. (2)

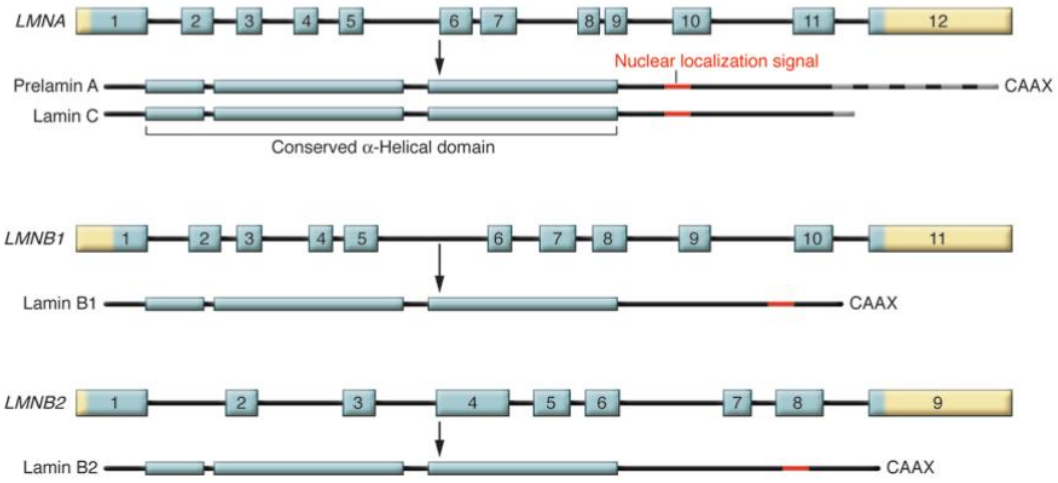



*Ilustración 4. Genes que codifican las laminas A, B y C (5)*

Las proteínas lamina A, C y B están formadas por filamentos intermedios (IF) de tipo V. Su estructura se divide una región de cabeza en el extremo N-terminal, o dominio central de bobina enrollada α-hélicoidal y una región de cola larga en el extremo C-terminal. El dominio central alfa-helicoidal de las laminas se divide en los subdominios hélice 1a, hélice 1b, hélice 2a y hélice 2b, que están interrumpidos por enlaces L1 y L12. Este dominio central es el responsable de la formación de los dímeros. La región de la cola C-terminal contiene una señal de localización nuclear, un dominio globular tipo Ig y un motivo CaaX, específico de la lamina A. (12)

Al extremo C-terminal se une una molécula llamada farnesilo que provoca una modificación postraduccional en el dominio de cola llamada farnesilación que se encarga de que las laminas se adhieran a la membrana nuclear interna. Este proceso solo ocurre en las laminas A y B y, en ocasiones, se producen mutaciones que impiden que la molécula farnesilo se una al extremo terminal lo cual deriva en laminopatías.

En cuanto al ensamblaje estructural de la red de filamentos intermedios estos se forman a partir de dímeros que están formados por 2 monómeros que se asocian en paralelo gracias a los segmentos α-helicoidales. Los dímeros se alinean de forma antiparalela y forman tetrámeros y protofilamentos. El ensamblaje de 8 protofilamentos da lugar a un filamento intermedio. Estos constituyen la red de filamentos que forma la lámina nuclear.

### 4.1.3 Enfermedades principales asociadas a laminopatías

Las mutaciones en las proteínas laminas reciben el nombre de laminopatías. Estas enfermedades son de carácter grave debido a que se producen por mutaciones en los genes que codifican las proteínas laminas. Dependiendo del tipo exacto de laminopatía, las patologías resultantes serán distintas. De forma global, las laminopatías se pueden clasificarse en dos grandes grupos que son las laminopatías sistémicas y las localizadas. En las sistémicas, las mutaciones en las laminas se caracterizan por afectar a varias partes diferentes del organismo. En cambio, las localizadas se producen en un órgano o tejido específico y suelen estar asociadas al envejecimiento temprano.

Algunas de las principales laminopatías codificadas por el gen LMNA son las siguientes:

- **Distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD)**: esta laminopatía se produce debido a mutaciones en las laminas de tipo A (A y C). Consiste en una miopatía que ataca al músculo estriado esquelético y cardiaco. Los síntomas aparecen en los primeros años de vida y provocan atrofia y debilidad muscular peroneoescapulohumeral, contracturas precoces en codos, tobillos, tendón de Aquiles, y zona posterior cervical y miocardiopatía dilatada. La cardiopatía comienza con trastornos en la conducción cardíaca, lo que lleva a un fracaso ventricular progresivo. Esta laminopatía condiciona la vida de los enfermos y con el paso del tiempo acaba provocando la muerte. (8)

  Actualmente, los únicos tratamientos disponibles para combatir la EDMD se centran en la fisioterapia muscular, la implantación de desfibriladores para los trastornos de conducción y el trasplante cardíaco en casos de insuficiencia ventricular. (8)

- **Distrofia Muscular de Cinturas asociada con Trastornos de Conducción Auriculoventricular (LGMD1B)**: las distrofias musculares de cinturas (LGMD) corresponden con un grupo de trastornos miogénicos genéticos que se caracterizan por la debilidad en la distribución de la cintura escapular y pélvica. El patrón de herencia en LGMD es heterogéneo. En la actualidad, se conocen cuatro formas dominantes (LGMD1) y ocho formas recesivas (LGMD2). (13)

  Estas enfermedades son muy parecidas y tienen síntomas parecidos a la EDMD, pero la aparición tardía o directamente ausencia de contracturas permite establecer que se trata de enfermedades diferentes.

- **Cardiomiopatía dilatada (DC)**: las miocardiopatías son enfermedades músculo cardiaco relacionadas con problemas en el bombeo de la sangre. La DC se caracteriza por dilatación y deterioro de la contracción del ventrículo izquierdo o de ambos ventrículos e insuficiencia cardiaca. La histología es inespecífica. La DC puede provocar fatiga extrema, falta de aire, arritmias, tromboembolismo y muerte súbita en cualquier etapa de la enfermedad. (13)

Al igual que para el resto de laminopatías, no existe una terapia específica para tratar esta enfermedad. Sin embargo, acciones como realizar un seguimiento continuo, implantar desfibriladores en caso de arritmias tempranas, exámenes cardiacos y evaluaciones a toda la familia del afectado pueden ayudar a aumentar la esperanza de vida de los enfermos.

- **Lipodistrofia Familiar Parcial de Dunnigan (FPLD2**): las lipodistrofias representan un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por una distribución inusual de la grasa corporal y oponer gran resistencia a la insulina. (13)

  Concretamente la FPLD2, es producida por mutaciones en el gen LMNA y se hereda de forma autosómica dominante. Los primeros síntomas suelen aparecer en la segunda década de la vida y comienza con la pérdida de tejido adiposo en extremidades, y tronco y la posterior aparición de grasa en el cuello y la cara. También, la FPLD2 provoca trastornos metabólicos como la diabetes tipo 2, hipertensión arterial y una resistencia inusual a la insulina. Realizar actividad física diaria y llevar una dieta de baja ingesta de grasas y carbohidratos puede ser beneficioso para los enfermos.

- **Progeria o síndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS)**: consiste en un tipo de laminopatía provocado por una mutación en el gen LMNA, que presenta un modelo de herencia autosómico dominante y tiene una prevalencia muy inusual en la población, al igual que el resto de las enfermedades de las que se hablan. Esta enfermedad se conoce como progeria infantil, ya que comienza a manifestarse en los enfermos cuando tienen poco más de un año de vida.

  Los niños con HGPS tienen un desarrollo fetal normal durante el embarazo y tienen un primer año de vida igual que el de la mayoría de neonatos. Sin embargo, entre los 18 y 24 meses de edad aproximadamente, empiezan a aparecer indicadores de un envejecimiento temprano impropio de un recién nacido. Se producen cambios en la integridad del tejido conectivo, que forma parte de muchos órganos y tejidos. Algunos de los síntomas de la progeria son la falta de crecimiento, ojos saltones, nariz picuda, pérdida de peso, alopecia temprana, arrugas y manchas en la piel… (14)

  Los enfermos afectados tienen una forma mutada de la lámina A farnesilada conocida progerina, que es la que da nombre a esta laminopatía. Habitualmente, el grupo farnesilo que se ha unido a la lamina es removido, pero en la progeria infantil esto no sucede. Esto provoca el envejecimiento temprano de los niños y la muerte prematura. Hay algunos estudios y ensayos terapéuticos que han probado el uso de algunos fármacos para inhibir el proceso de farnesilación de la progerina y que así no se mantenga unida a la lamina pero estas investigaciones aún se encuentran en fases experimentales y no han llegado a conclusiones sólidas. (14)

Aunque la mayoría de las laminopatías son codificadas por el gen LMNA, en los últimos años se han descubierto enfermedades asociadas a los genes LMNB1 y LMNB2. Este menor número de enfermedades se debe a que las laminas B, las codificadas por estos genes, están presentes en el desarrollo embrionario y en estas etapas la mayoría de las mutaciones suelen ser mortales.

Algunas de las enfermedades son las siguientes:

- **Leucodistrofia autosómica dominante (ADLD)**: es un tipo de laminopatía producido por mutaciones en el gen LMNB1. La ADLD es una leucodistrofia, es decir, un trastorno que afecta a la sustancia blanca del sistema nervioso central (SNC) provocando disfunción autonómica que más tarde es seguida de anomalías piramidales y cerebelosas. Los principales síntomas de esta afección son la disfunción de la vejiga, el estreñimiento, alteración de la sudoración, espasticidad muscular, ataxia de la marcha y otros problemas relacionados con el SNC. (15)

  La patología vinculada a este gen aparece más tarde que en las enfermedades asociadas a LMNA, y para esta laminopatía en concreto los síntomas comienzan a aparecer a partir de los 30 o 40 años. Es una enfermedad que sigue un modelo de herencia autosómico dominante y hace que las personas que sufren este trastorno empeoren rápidamente y tengan que verse obligados, en muchas ocasiones, a usar andadores específicos y sillas de ruedas. A pesar de no tener cura o tratamiento específico, la enfermedad no es tan agresiva como otras vistas anteriormente y los enfermos pueden sobrevivir varias décadas. (15)

  En cuanto al tratamiento, lo único que se puede hacer son evaluaciones de neurología y de las disfunciones que tenga el paciente en concreto. También, es recomendable la rehabilitación supervisada por expertos para tratar de mantener las habilidades motoras básicas. (15)

- **Lipodistrofia parcial adquirida o síndrome de Barraquer-Simons (LPA)**: enfermedad provocada por mutaciones en la lamina B2, sintetizada por el gen LMNB2**.** Esta laminopatía comienza a manifestarse en la niñez y tiene los síntomas característicos de la mayoría de las lipodistrofias. Consiste en la pérdida de tejido adiposo en el tronco, abdomen y extremidades superiores. (16)

  En ocasiones, la LPA es de carácter autoinmune y tampoco existe una terapia específica. Se diferencia de la mayoría de las lipodistrofias en que afecta principalmente a las mujeres y en que no provoca los trastornos más comunes como la resistencia a la insulina y los desórdenes metabólicos.

- **Cáncer**: varias investigaciones han relacionado mutaciones en las proteínas laminas B con el desarrollo del cáncer. Tanto las laminas B1 como las B2, proporcionan estabilidad y rigidez al núcleo y las células cancerosas provocan cambios muy pronunciados en la forma y estructura de dichos núcleos, lo cual promueve la metástasis. Esta y otras afirmaciones hacen que se crea que determinadas anomalías en las laminas B puedan inducir diversas formas de cáncer. Por esta razón, actualmente hay varios estudios en curso que tratan de determinar el papel que desempeñan estas proteínas en algunas formas de cáncer. (17)

Todas estas enfermedades son algunas de las principales laminopatías que afectan a las lamina A, C o B y, hasta el momento, no existe ningún tratamiento que permita curar a los enfermos

de algún tipo de laminopatía. Cada vez hay más estudios y terapias clínicas, pero aún no se conoce mucho acerca de los mecanismos internos que provocan las mutaciones de las laminas.

### 4.1.4 Historia y evolución de las laminopatías

Las laminopatías son un conjunto de enfermedades muy complejas las cuáles se conoce de su existencia desde hace unas pocas décadas. En 1986, se descubrió la presencia del gen LMNA y esto supuso un gran avance, ya que, aunque en ese momento se desconocía, es en este gen donde se producen la mayor parte de las mutaciones que provocan las laminopatías. Unos años más tarde, concretamente en 1999, el investigador Bonne descubrió que la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, EDMD-AD, era ocasionada por mutaciones en LMNA. Se puede decir que es a partir de este momento que se tiene conocimiento de las laminopatías. (18)

En los años posteriores, empezaron a surgir enfermos alrededor del mundo que presentaban enfermedades relacionadas con el gen LMNA y se dieron a conocer varias enfermedades nuevas. Las primeras laminopatías identificadas estaban ligadas a anomalías en tejidos del músculo esquelético. A pesar de que estas primeras enfermedades atacaban principalmente a células musculares, el espectro de manifestaciones clínicas que presentaban los enfermos era muy amplio con afecciones cardiacas e insuficiencias respiratorias, además de los problemas musculares que incluían debilidad generalizada, atrofia e hipotonía.

Al poco tiempo del descubrimiento de Bonne, se identificaron 5 enfermedades más originadas en LMNA como una forma de distrofia muscular de cinturas asociada a defectos de la conducción cardíaca (LGMD1B) o una miocardiopatía dilatada con defectos de conducción (DCMCD). Posteriormente, aparecen enfermedades en LMNA que no están relacionadas con el tejido del músculo esquelético como la lipodistrofia familiar parcial de tipo Dunningan (FPLD2), la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, que consiste en una neuropatía axonal con herencia autosómica recesiva, o el síndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS), más conocido como progeria infantil, que se caracteriza por un envejecimiento acelerado desde una edad muy temprana y que también se identificó que se debía a mutaciones en el gen LMNA. (19)

En 2006, se descubre que mutaciones en los genes LMNB1 y LMNB2 provocan anomalías en la lamina B y esto deriva en nuevos tipos de laminopatías. Las laminas B tienen una gran importancia funcional y están presentes en el desarrollo embrionario, por eso hay un menor número de enfermedades relacionadas ya que anomalías en estas proteínas suelen ser de carácter mortal. Aun así, poco a poco se fueron identificando algunas como la leucodistrofia autosómica dominante (ADLD), trastorno que afecta a la sustancia blanca del SNC y genera disfunción autonómica. En la actualidad, se han identificado más de 15 tipos diferentes de laminopatías. (20)

Una vez se conocía más la enfermedad, se empezaron a realizar ensayos clínicos con grupos de pacientes de laminopatía con la intención de profundizar en la enfermedad y llegar a tratamientos terapéuticos específicos que pudiesen ayudar a los pacientes. Aún no se tiene una forma de curar la enfermedad, pero se han realizado grandes avances en los últimos años que permiten proporcionar cuidados a los pacientes, para que tengan vidas algo más plenas. Investigaciones con modelos de células animales (de ratón o pez cebra principalmente), el sistema de edición

genética CRISPR/Cas9 y el desarrollo del fármaco "Lonafarnib" para la progeria infantil son algunos de los principales avances que se han conseguido últimamente y que permiten dar esperanza a enfermos y familiares de las laminopatías. En los años venideros, se pretende acelerar el desarrollo de nuevos tratamientos específicos o incluso una cura.

## 4.2 Distrofia muscular congénita asociada a laminopatía

### 4.2.1 Distrofia muscular congénita (CMDs)

Las distrofias musculares congénitas (CMDs) son un conjunto de enfermedades hereditarias que provocan debilidad muscular y retraso del desarrollo motor desde una edad muy temprana. Estas enfermedades tienen un amplio espectro de fenotipos posibles y son causadas por diversas mutaciones genéticas. Las CMDs son enfermedades raras que se caracterizan por tener una incidencia extremadamente baja en la población, lo que suele conllevar a la falta de información y familiaridad con este tipo de enfermedades. Además, aún no se dispone de ningún tratamiento específico que permita curar a los enfermos de CMDs.

Al tratarse de una enfermedad tan compleja donde queda mucho por investigar y cada vez van apareciendo nuevas variables, las CMDs se clasifican de varias formas distintas atendiendo a diferentes parámetros como si la distrofia afecta al SNC o no, o si la enfermedad va acompañada de un retraso cognitivo significativo o no. Actualmente, la clasificación más utilizada para las CMDs es en base a las características fenotípicas, y atendiendo a estas podemos diferenciar 5 tipos de enfermedades.

La CMD por déficit primario en merosina (MDC1A) o merisinopatías corresponde con el 20-40% de las CMDs. Esta enfermedad se debe a mutaciones en el gen LAMA2 (en 6q22) que sintetizan la cadena alfa 2 de la proteína merosina. Los pacientes pueden presentar un déficit parcial o total de merosina, implicando este último síntoma más graves. Es una miopatía que provoca problemas respiratorios, fatiga y hipotonía con debilidad global. (21)

Las colagenopatías VI o CMD de tipo Ullrich (UCMD) son provocadas por mutaciones en los genes del colágeno VI y corresponden con el 20% de las CMDs. Los síntomas concuerdan con los síntomas habituales de las CMDs, que incluyen debilidad y fatiga muscular desde los primeros años de vida. (21)

Las selenoproteinopatías o síndrome de la columna rígida de tipo 1 (RSMD1) son provocadas por mutaciones en el gen de la selenoproteína N1 (SEPN1), que se encuentra en el RE. Es una enfermedad con un modelo de herencia autosómico recesivo que, al igual que sus DCMs hermanas, aparece en los primeros años de vida ocasionando rigidez en la columna cérvico-dorsal, problemas respiratorios, hipotonía y debilidad muscular. (21)

Las distroglicanopatías es una CMD muy heterogénea, que incluye varios subtipos con distintas afecciones como distroglicanopatías tipo Fukuyama, tipo Muscle-Eye-Brain o tipo Walker-Warburg entre otras. Esta enfermedad concreta, recoge el 15% de todas las CMDs y está asociada a síndromes cerebro-musculares, distrofias de cinturas con o sin retraso cognitivo y mialgias. Las

distroglicanopatías se deben a mutaciones en el gen DAG1 que provocan un trastorno asociado a la glicosilación de la proteína α-distroglicano. (21)

Por último, se encuentra la distrofia muscular congénita asociada a laminopatía (L-CMD) que es causada por mutaciones en el gen LMNA. (21)

Las CMDs son enfermedades muy heterogéneas y que en muchas ocasiones están asociadas a otras enfermedades lo que da lugar a que la patología sea muy amplia. No se conoce un tratamiento específico pero cada vez se sabe más acerca del diagnóstico y detección de estas DCMs. En la actualidad, ya hay identificados cerca de 30 genes en los que ciertas mutaciones provocan CMDs y se cree que puede haber más. (21)

Uno de ellos es el gen LMNA, y ciertas anomalías en proteínas del gen provocan un tipo concreto de CMD asociada a laminopatías. A continuación, se habla de forma extendida acerca de este trastorno.

### 4.2.2 Distrofia muscular congénita asociada al gen LMNA (L-CMD)

La distrofía muscular congénita ligada al gen LMNA, o L-CMD, es una miopatía genética ocasionada por mutaciones en el gen LMNA, que codifica las proteínas laminas A y C. Es una enfermedad hereditaria que sigue un modelo de herencia autosómico dominante y al igual que el resto de laminopatías es una enfermedad muy rara que tiene una prevalencia aproximada de 1 entre cada 1.000.000 de habitantes. Las primeras manifestaciones aparecen a lo largo del desarrollo embrionario o, a más tardar, durante las primeras semanas o meses de vida. La L-CMD se caracteriza por afectar al tejido del músculo esquelético provocando debilidad muscular generalizada, hipotonía y atrofia muscular. La enfermedad destaca por ser la CMD más agresiva y una de las laminopatías con peor pronóstico (dentro de la gravedad que implican todas) ya que los síntomas aparecen antes que en cualquier otra enfermedad relacionada y la esperanza de vida se ve aún más reducida. Además, la L-CMD es de índole degenerativa, lo que implica que el estado de los pacientes puede empeorar de forma muy acelerada y, aparte, las manifestaciones clínicas son muy individualizadas, lo que hace que la evolución de la enfermedad pueda variar mucho de un paciente a otro, dificultando ampliamente las líneas de investigación que tratan de establecer patrones similares que se repitan.

Aparte de las afecciones que atacan al tejido del músculo esquelético, la L-CMD es una enfermedad que implica un amplio espectro de síntomas y manifestaciones. En los dos primeros años de vida, aparece la mayoría de las patologías relacionadas con problemas motores. Se produce lo que se conoce como “síndrome de cabeza caída” que consiste en no tener control cefálico y, por tanto, no ser capaz de mantener o sostener la cabeza uno solo. En casos muy graves se puede producir la pérdida del control troncal o no llegar a conseguir el dominio de la deambulación independiente, es decir, no se capaz de aprender a gatear y andar como cualquier recién nacido, lo que podría derivar a mecanismos de asistencia como sillas de ruedas o exoesqueletos para poder desplazarse. Por lo tanto, en la L-CMD un síntoma muy común es el retraso motor en los primeros meses de vida. Con relación a las manifestaciones musculares, con el paso del tiempo estas acaban derivando en problemas en la columna vertebral, siendo frecuentes

las contracturas en el cuello, la escoliosis y la lordosis. También, pueden aparecer contracturas en articulaciones muy importantes como rodilla, tobillo, codos y muñecas entre otras. (2,22)

La L-CMD también implica otras graves afecciones. A pesar de todas las manifestaciones dichas previamente, la principal causa de muerte de esta enfermedad en la primera década de vida son los problemas respiratorios. La insuficiencia respiratoria en los pacientes de L-CMD es muy seria y puede conllevar a grandes dificultades como que tengan que dormir con ayuda de métodos de ventilación no invasiva o invasiva, e incluso puede llegar a provocar la muerte. Otras manifestaciones de esta enfermedad son los problemas cardiacos como las arritmias o disfunciones cardiacas que suelen consistir en la dilatación del ventrículo izquierdo y la disfunción sistólica. Estas cardiopatías son, también, una de las principales causas de muerte de la L-CMD. Por último, hay pacientes que pueden desarrollar complicaciones gástricas o dificultad para deglutir ciertos alimentos. (2,22)

La L-CMD se conoce de su existencia desde hace muy pocos años. A partir de finales de la década de los 90s, se empezaron a descubrir varias enfermedades que debido a mutaciones en el gen LMNA provocan algún tipo de CMD como es el caso de la distrofia muscular congénita de Emery-Dreifuss (EDMD2), la distrofia muscular de cinturas asociada con trastornos de conducción auriculoventricular (LGMD1B) o una forma de distrofia muscular de cinturas dilatada DCM-CD.

En el año 2008, la doctora Susana Quijano-Roy junto con su equipo realizó un estudio clínico donde se llevaron a cabo exámenes histopatológicos e inmunohistoquímicos a un grupo de 15 pacientes que padecían CMDs relacionadas con LMNA, pero con unas manifestaciones clínicas algo diferentes que las conocidas hasta la fecha. Los pacientes que sufrían está patología presentaban síntomas más graves y de forma más precoz que en el resto de CMDs, lo que hizo que el equipo de investigación se diese cuenta de que se trataba de una nueva variación de la enfermedad que más tarde se conocería como distrofia muscular congénita asociada al gen LMNA (L-CMD). El equipo de investigación diferenció entre dos variantes de L-CMD. La primera de ellas era la del síndrome de cabeza caída que consistía en que los niños perdían el control cefálico pero la mayoría de ellos eran capaces de caminar de forma independiente. El otro grupo de enfermos tenían un pronóstico de mayor gravedad, donde las afecciones aparecían de forma más temprana. Ya durante el embarazo, el feto no realizaba prácticamente movimientos fetales y en los dos primeros años de vida los problemas musculares como hipotonía, debilidad generalizada y atrofia se veían muy acentuados. En cuanto al estado ambulatorio de estos pacientes, carecía de un correcto desarrollo motor y no eran capaces de caminar de forma autónoma. Otro gran descubrimiento de este ensayo clínico fue detectar que la mayoría de las mutaciones que derivan en L-CMD son variantes de novo, que consiste en mutaciones que no son heredadas de los progenitores, sino que se producen por una alteración genética espontánea en algún lugar del gen LMNA. Gracias a este estudio se estableció esta nueva forma de laminopatía que produce CMD y que está caracterizada por ser la más grave y precoz de todas ellas. (3)

En cuanto a la etiología de estas mutaciones en LMNA, una gran mayoría son variantes de novo pero también, aunque sea menos común, dichas anomalías se puedan heredar porque se trata de una enfermedad autosómica dominante y, por tanto, con que uno de los dos progenitores padezca la L-CMD podría producir que su herencia sufriese dicha enfermedad. Las mutaciones registradas ocurren principalmente en los exones 1, 4, 6 y 7 y, además, hay tres variantes que son siempre las más frecuentes que son las mutaciones en las proteínas K32del, L35P y R249W, codificadas las

dos primeras por el exón 1 y la última por el exón 4. K32del y L35P se encuentran en el dominio de la cabeza concretamente en la bobina 1a y respecto a R249W se localiza en el dominio central específicamente en la bobina 2, donde esta el dominio de unión ERK ½. (2,23)

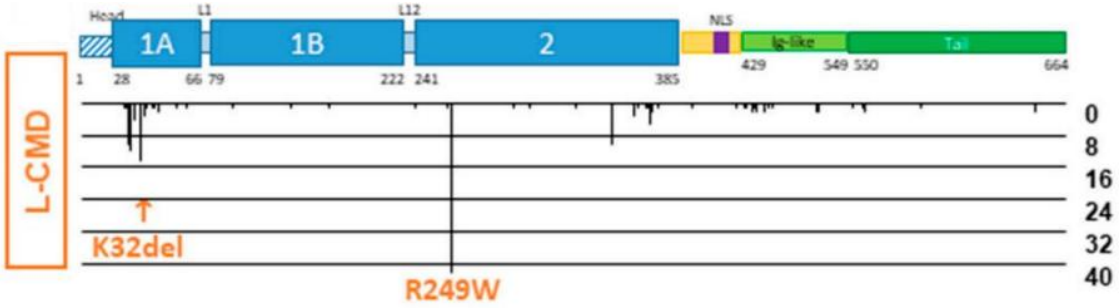



*Ilustración 5. Índice de incidencia de principales mutaciones en el gen LMNA (24)*

A nivel celular, una de las principales formas de averiguar que ciertas células se encuentran mutadas es analizando su morfología nuclear. Los niveles de circularidad de una célula sana rondan el 95% pero cuando está se encuentra mutada se pierde gran parte de la estabilidad estructural y esto se refleja en células que presentan muchas más irregularidades y, por lo tanto, en menores porcentajes de circularidad nuclear.

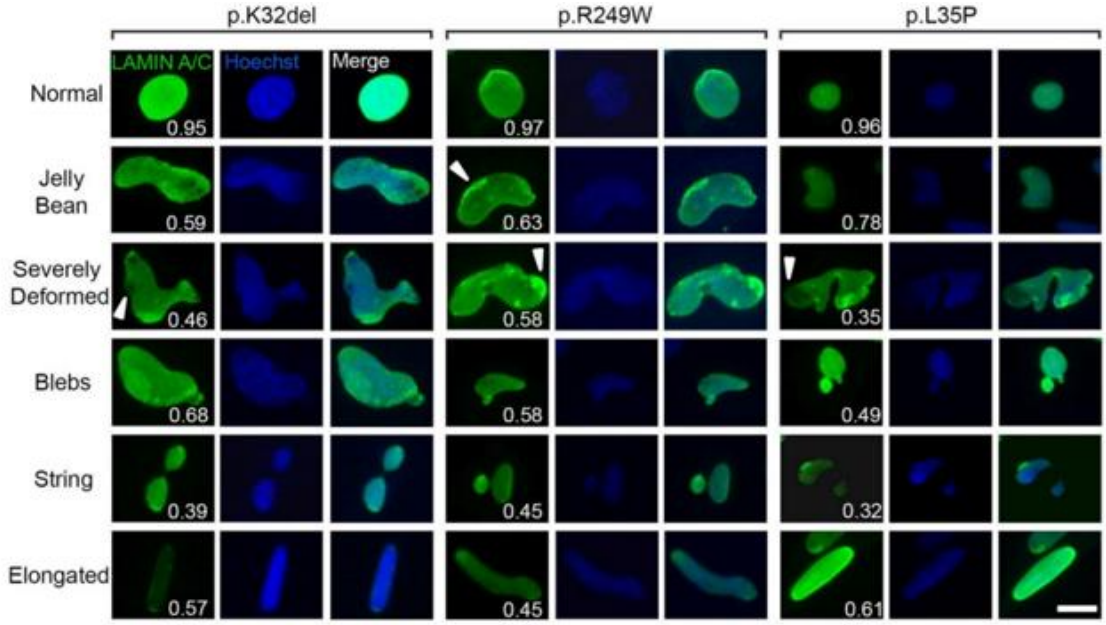



*Ilustración 6. Morfología Nuclear para líneas celulares mutadas (23)*

Para poder medir la circularidad de las células de una forma tangible, y así poder ver la estabilidad estructural de las células determinando si están mutadas o no es necesario hacerlo de una manera específica ya que a simple vista es casi imposible determinar si las células se encuentran mutadas o no.

En primer lugar, es necesario tintar las células para así poder diferenciarlas mejor y que sea más fácil el proceso. Después, hay que tomar imágenes de las células a microscopios e introducirlas a un software de análisis de imágenes que se encargue de la segmentación de las imágenes. A continuación, en las imágenes segmentadas hay que calcular la circularidad de las células mediante el uso de algoritmos que de forma rápida determinen la circularidad de las células segmentadas dándoles un valor entre 0 y 1, correspondiendo el 1 con el 100% de circularidad. Estos algoritmos aplican la siguiente fórmula matemática para conocer la circularidad exacta de las células:

$$C = \frac{4\pi \, x \, A}{P^2}$$

"C" es la circularidad de la célula, "A" corresponde con el área de la célula y "P" con el perímetro de la célula.

Gracias a herramientas tan útiles como esta, podemos hacer una comparación entre la circularidad de células sanas y mutadas. Como los algoritmos trabajan de forma muy rápida, en poco tiempo se puede realizar un análisis estadístico con el suficiente número de muestras para poder cuantificar de manera objetiva el grado de circularidad que presenta cada tipo de células. Este mecanismo o alguno muy similar se empleó para obtener las imágenes de la ilustración 6.

Por último, en relación con la L-CMD, no hay un tratamiento específico que permita a los pacientes curarse o revertir la enfermedad, sino que el tratamiento se centra en aliviar los dolores que pueden presentar los pacientes mediante fisioterapia muscular y cuidados paliativos, y en prevenir que la enfermedad provoque daños mayores a futuro. Para esto, se suele recomendar la implementación de desfibriladores para evitar la muerte súbita o alguna afección cardiaca similar y dormir con ayuda de ventiladores o respiradores si los enfermos de sufren problemas respiratorios graves. En determinadas ocasiones, los pacientes también se pueden beneficiar del uso de dispositivos de ortopedia y de cirugías para corrección de escoliosis en caso de que esta se encuentre muy acentuada.

## 4.3 Posibles terapias y tratamientos para laminopatías

### 4.3.1 Tratamientos y cuidados actuales para enfermos de laminopatía

Hoy en día, las laminopatías no tienen una cura o tratamiento específico que permita revertir los síntomas que esta enfermedad provoca en los pacientes. Esto se debe principalmente a que este conjunto de enfermedades tiene un origen genético, provocado por mutaciones en las proteínas laminas, y resulta muy complicado realizar cambios en el ADN que corrijan dichas mutaciones.

Existen muchas enfermedades genéticas las cuales son heredadas y no se pueden curar, pero con un tratamiento específico los enfermos pueden realizar vidas normales y vivir muchos años. Por ejemplo, la hemofilia es una enfermedad genética complicada, pero teniendo ciertas precauciones y con ayuda de terapias y medicamentos como la desmopresina, los pacientes pueden salir adelante. Esto ocurre incluso con enfermedades de una mayor gravedad como es el caso de la fenilcetonuria, que puede provocar problemas neurológicos y retraso mental, pero si desde el comienzo de la vida se lleva una dieta muy estricta baja en fenilamina se pueden vivir muchos años y no manifestar los síntomas mencionados.

Sin embargo, esto no ocurre con las laminopatías porque las terapias y cuidados que se le pueden proporcionar a los pacientes no evitan que sufran dolores y que acaben pereciendo de forma prematura. Además, es una patología con una prevalencia extremadamente baja en la población, catalogada como enfermedad rara. Esto provoca que no sea tan urgente e importante encontrarle un remedio a este trastorno y, además, hace que la financiación económica que pueda impulsar investigaciones y ensayos clínicos, que lleven a resultados sólidos, sea muy escasa y reducida.

Debido a la falta de alternativas terapéuticas específicas que permitan dar con alguna solución para curar el conjunto de enfermedades o conseguir tratamientos que realmente aumenten la esperanza de vida de los afectados, el enfoque médico de esta patología está principalmente enfocado en cuidados paliativos que alivien el dolor y el sufrimiento, en mejorar la calidad de vida en la medida de lo posible y en el apoyo familiar para manejar el impacto de la enfermedad, con ayuda de especialistas.

Para mejorar la calidad de vida y aumentar la esperanza de vida se introducen algunas de las siguientes medidas. En primer lugar, a pesar de ser una enfermedad que presenta síntomas muy heterogéneos, principalmente los problemas respiratorios y afecciones cardiacas aparecen en la mayoría de los casos. Para poder prevenir enfermedades respiratorias se recomienda la vacunación periódica frente a virus respiratorios y en aquellas personas que sufren graves problemas respiratorios pueden dormir conectados a respiradores o ventiladores para una mejor calidad de sueño y evitar riesgos. También, es conveniente hacer revisiones con todo tipo de especialistas como neumólogos.

En cuanto a los problemas cardiacos, es importante hacer revisiones periódicas con cardiólogos y hacer pruebas como electrocardiogramas. Además, la implantación de dispositivos como marcadores o desfibriladores ayuda a protegerse de arritmias y ataques al corazón. (2)

Otra manifestación muy común de las laminopatías, son los problemas que afectan al músculo esquelético provocando debilidad, atrofia e hipotonía. Para ello, es importante la fisioterapia muscular regular incluyendo todo tipo de estiramientos para evitar contracturas. En casos muy

avanzados de escoliosis o lordosis lumbar los pacientes se pueden ver beneficiados de cirugías de corrección. El uso de analgésicos para aliviar dolores también es recomendable.

En enfermos con problemas motores serios, los dispositivos de ortopedia pueden ayudar a mejorar su calidad de vida. Mecanismos como sillas de ruedas, andadores, gateadores, férulas o exoesqueletos pueden brindar una mayor independencia y autonomía a los pacientes mejorando su estado anímico.

Por último, revisiones con médicos especialistas, vacunaciones regulares, suplementación alimentaria y cuidados paliativos son medidas fundamentales que pueden suponer una ayudar extra para la lucha contra las laminopatías.

A pesar de no haber una forma de revertir la enfermedad o tratamientos específicos que ayuden considerablemente a controlar la manifestación y desarrollo de los síntomas, todo este tipo de medidas mencionadas son vitales para el bienestar de los enfermos y por eso, en la actualidad, se siguen explorando nuevas líneas de investigación para proporcionar la mejor atención posible.

### 4.3.2 Fármacos que inhiben la farnesilación de la progerina

Existen una serie de laminopatías que son síndromes progeroides, siendo el más conocido de todo el síndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS), más conocido como progeria infantil. Este grupo de síndromes puede llegar a tener un espectro de patologías muy amplio, pero principalmente se caracteriza por un envejecimiento prematuro y acelerado a partir del primer año de vida. La enfermedad es tan agresiva y precoz que la esperanza de vida de los niños que padecen progeria infantil no supera los 15 años.

Como cualquier otra laminopatía se trata de una enfermedad que no tiene cura y que es muy rara, con una prevalencia de 1 entre cada 4.000.000 millones de habitantes. Sin embargo, estudios recientes han desarrollo un tratamiento específico y efectivo que ayuda a los niños que padecen progeria infantil. (14)

Los enfermos sufren una mutación en el gen LMNA, concretamente en la proteína lamina A. Esta proteína mutada se encuentra farnesilada y recibe el nombre de progerina. De forma habitual, el grupo farnesilo es separado de la lamina pero en la HGPS se produce una mutación que impide esta separación. El hecho de que el grupo farnesilo permanezca unido a la lamina A tiene consecuencias negativas, provocando alteraciones en las funciones básicas y morfología nuclear de la célula, lo cual se manifiesta en los enfermos provocando un envejecimiento prematuro. (14)

A partir de 2005, grupos de investigadores empezaron a desarrollar un fármaco que, en primera instancia, era para tratar de inhibir la expansión del cáncer pero que rápidamente se dieron cuenta que el fármaco diseñado tenía unas propiedades que eran beneficiosas para combatir la progeria infantil. El fármaco era capaz de frenar y revertir el avance de las deformidades a nivel celular devolviendo estabilidad a la célula. (25)

En 2007, se realizó el primer ensayo clínico con pacientes humanos de HGPS que tomaban este fármaco y en 2012 se publicaron los resultados, donde figuraban que los enfermos de progeria infantil experimentaban mejoras sustanciales gracias a la ingesta del fármaco. Este se conoce

como “Zokinvy” o inhibidor de la farnesiltransferasa (FTI). Lonafarnib es el principio activo, es decir, el compuesto químico principal responsable del efecto terapéutico. (25)

El FTI resulta muy efectivo para la progeria, debido a que inhibe que el grupo farnesilo permanezca herido a la progerina. Esto impide que las células pierdan su estructura y organización celular y así se bloquea el avance del síndrome de envejecimiento prematuro. (25)




*Ilustración 7. "Zokinvy" fármaco inhibidor de la farnesiltransferasa que sirve como tratamiento para la progeria infantil (26)*

Finalmente, en noviembre de 2020, el fármaco lonafarnib (comercializado bajo la marca “Zokinvy”) fue aprobado y regulado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) convirtiéndose en el primer y único tratamiento específico que existe para tratar la HGPS y el resto de los síndromes progeroides. Más tarde, en 2022, el lonafarbib fue aprobado en Europa. El fármaco es fácil de tomar ya que se ingiere de forma oral pero debido a su reciente descubrimiento, el lonafarnib es poco accesible debido a sus precios desorbitados. (25)

Este fármaco no representa una cura para la enfermedad, pero queda probado que sirve para paralizar y ralentizar el avance de la progeria, dando fuerza a los pacientes y aumentado su esperanza de vida. Este supone uno de los mayores avances hasta la fecha, en la lucha contra las laminopatías.

### 4.3.3 Edición del genoma humano con CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 es una tecnología de edición genética que nos permite identificar y modificar el ADN exógeno. Este sistema tiene múltiples aplicaciones en el entorno de la genética y es una de las herramientas que tiene mayor potencial de evolución para los próximos años, pudiendo ser fundamental para la cura de muchas enfermedades. La tecnología CRISPR/Cas9, también, sirve para combatir las laminopatías y hay estudios que indican que puede ser clave para eliminar la mutación p.R249W, que reside en el gen LMNA y es una de las mutaciones más frecuentes que provocan la L-CMD.

En 1993, en la investigación dirigida por Francisco Juan Martínez Mojica, reconocieron unas secuencias repetidas que se encontraban en grupos de bacterias y arqueas. Más tarde, denominaron a estas secuencias como "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", más conocido como CRISPR. Este sistema se puede definir como una serie de secuencias repetitivas que se encuentran en el genoma de bacterias y arqueas. (27)

En 2005, se identificó la endonucleasa Cas9 y el dominio PAM. Pocos años después, en 2010, se demostró que el sistema inmune adaptativo CRISPR junto con la endonucleasa Cas9 se podía utilizar para realizar roturas en posiciones precisas del ADN diana. Además, se concluyó que Cas9 es la única proteína requerida para realizar escisiones concretas en el ADN. (27)




*Ilustración 8. Sistema CRISPR/Cas9 (28)*

El sistema CRISPR/Cas9, está integrado por el operón cas, que contiene información genética para codificar las endonucleasas Cas9, y la región CRISPR, formada por secuencias repetitivas.

La combinación de un ARN guía y la endonucleasa Cas9 permite identificar, añadir y cortar secuencias concretas de ADN vírico. En cuanto al funcionamiento, el ARN guía permite reconocer y unirse a la secuencia específica de ADN que se quiere modificar. A través de la nucleasa Cas9, se realizan escisiones precisas en el ADN, que se conocen como roturas de doble cadena. Por último, se produce la reparación del ADN, que puede ser por medio de la unión entre extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación homóloga (HDR).

Este sistema inmune adaptativo, nos permite activar o inactivar la expresión de genes específicos. Esta propiedad presenta múltiples aplicaciones y al igual que para muchas otras enfermedades con origen genético, para las laminopatías, también, existen muchas líneas de investigación muy interesantes que nos pueden llevar a dar con un método que nos permita revertir las mutaciones que provocan esta enfermedad tan nociva. Concretamente, en el momento que se consiga utilizar el sistema CRISPR/Cas9 para eliminar las mutaciones en los genes LMNA, LMNB1 y LMNB2 que provocan las mutaciones en las proteínas laminas A, B y C se podría estar muy cerca de acabar con este conjunto de enfermedades.

A continuación, se habla acerca de los principales estudios e investigaciones que se han desarrollado sobre la tecnología CRISPR/Cas9 en relación con las laminopatías. En la mayoría de los estudios se utilizan células de modelos de animales para tratar de eliminar mutaciones y explorar nuevos métodos de investigación. En el futuro, si se consigue avances sólidos se pretende extrapolarlo a células humanas para poder optar a una solución real para los pacientes de laminopatías.

En un estudio español publicado en 2020, se trabaja con mioblastos de ratón, C2C12, y se investiga acerca de una de las mutaciones más frecuentes para la L-CMD. Está se encuentra en el exón 4 del gen LMNA y la mutación se conoce como R249W. Con el sistema CRISPR/Cas9, se crearon líneas celulares C2C12 mutadas, con diferentes deleciones del exón 4 y con la mutación R249W. La investigación llegó a la conclusión de que las mutaciones en el exón 4 provocan una morfología anormal, lo cual es síntoma de poca estabilidad e integridad celular. Además, las células C2C12 del mutante p.R249W en LMNA presentaban daños en el ADN. Estos resultados son muy útiles para futuras investigaciones y para que se pueda establecer un tratamiento específico para L-CMD. (6)

En otro estudio, publicado en 2021 por la universidad de Ottawa, se desarrolló un modelo mutante de pez de cebra con la implementación de CRISPR/Cas9, enfocado a investigar acerca de las laminopatías que afectan al músculo esquelético en el gen LMNA. Las más comunes, son la L-CMD, la EDMD y la LGMD1B. El modelo mutado de pez de cebra en LMNA reproduce muy bien varias características de las laminopatías humanas, por eso al igual que los mioblastos de ratón son algunas de las células más empleadas en este tipo de estudios. (29)

En las células de pez cebra, con la ayuda del sistema CRISPR/Cas9 se integró una deleción de cinco pares de bases (5 pb Δ) en el segundo exón codificante de LMNA. Esta deleción provoca que se cree una proteína truncada que da lugar a anomalías en las proteínas lamina A y C. Una vez hecho esto, se realizó una caracterización de las células mutadas dividiéndolas en homocigóticas y heterocigóticas para la mutación del músculo esquelético. (29)

Las conclusiones de este segundo ensayo fueron que los modelos mutantes de pez de cebra para LMNA, presentaban anomalías en el tejido del músculo esquelético y cardiaco en la primera semana de desarrollo, independientemente de si eran homocigotos o heterocigotos para la mutación. Un descubrimiento del estudio fue la aparición de la proteína quinasa C alfa en la patogénesis de las laminopatías, lo que induce a nuevas líneas de investigación relacionadas con esta proteína. Por último, el sistema CRISPR/Cas9 resultó ser muy preciso para realizar escisiones concretas en el genoma de los peces cebras, quedando una vez más demostrado su eficacia. (29)

El siguiente estudio es de la universidad de Tongii, en Shangai, y fue publicado en el año 2021. La novedad de esta investigación es que se trata de uno de los pocos estudios que emplea células de origen humano para investigar acerca de laminopatías. Al trabajar con células humanas, el grupo de investigación tuvo que cumplir con una serie de normativas bioéticas que fueron aprobadas por comités de revisión institucional. (30)

En el artículo científico, se utiliza el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 para investigar acerca de la CMD, concretamente, la enfermedad EDMD. Se emplea una línea de células progenitoras pluripotentes inducidas de origen humano, específicamente la línea iPSC EHTJUi005-A de tipo silvestre, la cuál es muy adecuada para estudiar laminopatías. Con CRISPR/Cas9 se editaron las células embrionarias, generando la variante EHTJUi005-A-3 con knockout homocigótico para el gen LMNA, provocado por una deleción. El término "knockout" se refiere a una técnica que consiste en inhibir el funcionamiento de un gen, en este caso, se trata de un knockout homocigótico por lo que se inhiben ambos alelos del gen. (30)

Al inhibir el gen LMNA, se pudo estudiar el comportamiento de las células iPSC y se realizó una caracterización donde se sacaron conclusiones como que el cariotipo se mantenía normal, con 46 cromosomas, pero, también, que la supresión del gen provocaba mayor inestabilidad y deformidad de la estructura nuclear. (30)

El descubrimiento principal de la investigación fue demostrar que el knockout homocigótico en LMNA es capaz de suprimir la expresión de las proteínas laminas A y C. El estudio resulta muy novedoso e introduce grandes avances, al trabajar con células embrionarias humanas, y puede ser fundamental para mejorar y poder alcanzar tratamientos específicos o curas para este conjunto de enfermedades. (30)

Estos son algunas de las investigaciones más interesantes que con la implementación del sistema CRISPR/Cas9, han conseguido obtener grandes avances en la búsqueda de tratamientos específicos para laminopatías.

### 4.3.4 Otros posibles métodos para combatir laminopatías

En la actualidad, aparte del fármaco que inhibe la farnesiltransferasa y el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 no se conocen muchas más líneas de investigación que nos puedan proporcionar una herramienta terapéutica útil para enfermos de laminopatías, con la que alcanzar un tratamiento específico, que ralentice o pare los síntomas de la enfermedad, o directamente que la cure.

En muchas enfermedades, el uso de células madre, también conocidas como células progenitoras, es muy positivo porque tienen la capacidad de especializarse en cualquier tipo de célula, se pueden reemplazar por células dañadas de cualquier tejido y presentan propiedades regenerativas. Este cumulo de razones hace que las células madre también se hayan empleado en investigaciones de laminopatías. La combinación de estas células con la tecnología CRISPR/Cas9 ha demostrado tener un gran potencial terapéutico para este conjunto de enfermedades. De esta forma, las células madre pueden llegar a tener una mayor capacidad para regenerar tejidos y ser aún más eficientes a la hora de tratar enfermedades.

Estas células, también, se emplean en modelos in vitro para laminopatías, debido a que nos permite simular las anomalías que se producen en las proteínas laminas y así poder llevar a cabo investigaciones de una forma mucho menos invasiva y con mayor libertad. De esta forma, se pueden seguir líneas de investigación en humanos para laminopatías sin tener que extraer células de los enfermos, mediante biopsias que pueden resultar problemáticas y muy invasivas.

### 4.3.5 Métodos de detección de laminopatía

Las laminopatías son enfermedades genéticas complejas que albergan síntomas inusuales y esto hace que muchas veces no sean fáciles de identificar. Aunque se trate de un grupo de enfermedades que no tiene una cura o un tratamiento específico, en ocasiones el diagnóstico temprano puede resultar fundamental para mejorar la calidad de vida de los pacientes y tomar medidas que prevenga una muerte prematura.

Una gran parte de la laminopatías son heredadas, lo que hace que sea muy importante llevar a cabo una evaluación clínica de los antecedentes familiares, especialmente en aquellos casos donde se detectan anomalías tempranas y ya ha existido alguna situación previa de laminopatía. Este es el procedimiento principal para detectar una laminopatía. Una vez se tienen indicios de esta patología, lo más recomendable es realizar un examen genético en el que secuencian los genes LMNA, LMNB1 y LMNB2 que son los responsables de las anomalías en las proteínas laminas que derivan en esta enfermedad. Con estos estudios, se podrá identificar si existe una mutación y así asegurar si el niño sufre una laminopatía o poder descartar esta opción. Además de efectivo, esta técnica no tiene porque ser invasiva, ya que con una muestra de saliva o sangre sirve para realizar el análisis.

Para identificar laminopatías relacionadas con trastornos musculares se puede proceder con otras técnicas. Una parte de las laminopatías musculares son variante de novo, por lo que los estudios de antecedentes familiares no sirven en estas circunstancias. Para ello, se puede realizar un examen histopatológico, que consiste en un análisis microscópico de la envoltura nuclear de las células musculares, buscando algunos de los síntomas más comunes de laminopatías musculares como la L-CMD o la EDMD. Estos son la pérdida de la estructura y organización del núcleo lo que hace que este sea mucho menos circular. Para poder obtener, estas muestras lo más común es realizar una biopsia, lo cual es muy efectivo, pero más invasivo que algunos de los métodos iniciales. Para la biopsia, hay que hacer una pequeña cirugía, para poder extraer la muestra de tejido necesaria.

Aparte del análisis hispatológico, cuando los exámenes genéticos no son los más conveniente o no llegar a un diagnóstico concluyente, se puede realizar estudios de inmunofluorescencia. Este método, también conocido como técnica de inmunomarcación, permite visualizar una proteína concreta, como las laminas A, B y C, a través de la tinción de células con la ayuda de anticuerpos que se unen a una molécula fluorescente conocida como fluorocromo. Esta técnica avanzada, permite identificar cualquier anomalía en las proteínas que se estudian y, también, necesita de una biopsia previa para obtener la muestra. (31)

En ocasiones, también se pueden realizar pruebas inmunohistoquímicas, que son similares a la anterior, pero en estas se emplean microscopios ópticos de luz como método de visualización en

vez de microscopios de fluorescencia. En este examen, se analizan muestras de biopsias y se utilizan anticuerpos para determinar la presencia de ciertos antígenos en una muestra de tejido. Se pueden identificar ciertas anomalías en la expresión de las proteínas laminas o patrones poco comunes en la formación del núcleo. (32)

La electromiografía (EMG) y los estudios de conducción nerviosa son otra alternativa que permite diagnosticar enfermedades neuromusculares como pueden ser las laminopatías. El EMG consiste en un sistema de monitorización con el que se puede evaluar la salud de los músculos y las neuronas motoras que los controlan. Por lo tanto, es ideal para identificar laminopatías musculares. A través de una serie de electrodos colocados en el músculo a examinar del paciente, los electromiógrafos recogen los impulsos eléctricos responsable de la contracción y relajación. Luego, estos datos son interpretados por neurólogos y fisiatras, y atendiendo a ciertos patrones de activación muscular se puede determinar si se padece algún tipo de trastorno neuromuscular.

Para la detección de cardiomiopatías, con sistemas de monitorización concretos se puede detectar afecciones cardiacas como arritmias o insuficiencias. El uso de electrocardiogramas (ECG) o ecocardiograma permite encontrar anomalías típicas de laminopatías. Una vez detectado el problema, se pueden implantar dispositivos como desfibriladores para prevenir arritmias, o Holters para tener registrada la actividad eléctrica del corazón en todo momento.

Por último, para el diagnóstico de lipodistrofias, se pueden realizar estudios metabólicos y hormonales. Con estos análisis se pueden identificar, problemas como enfermedades hepáticas o relacionadas con la resistencia a la insulina, que en determinadas ocasiones podrían significar graves enfermedades como la lipodistrofia familiar parcial de Dunnigan.

Estas pruebas son para confirmar la existencia de una laminopatía, pero los síntomas que se producen en los primeros meses y años de vida son muy indicativos de este tipo de enfermedades. Por eso, cuando haya sospechas de poder padecer algunos de estos síndromes es importante realizar alguna de las pruebas mencionadas para comprobar si se trata de una laminopatía.

# Capítulo 5. DESARROLLO DEL PROYECTO

## 5.1 Planificación del proyecto y herramientas empleadas

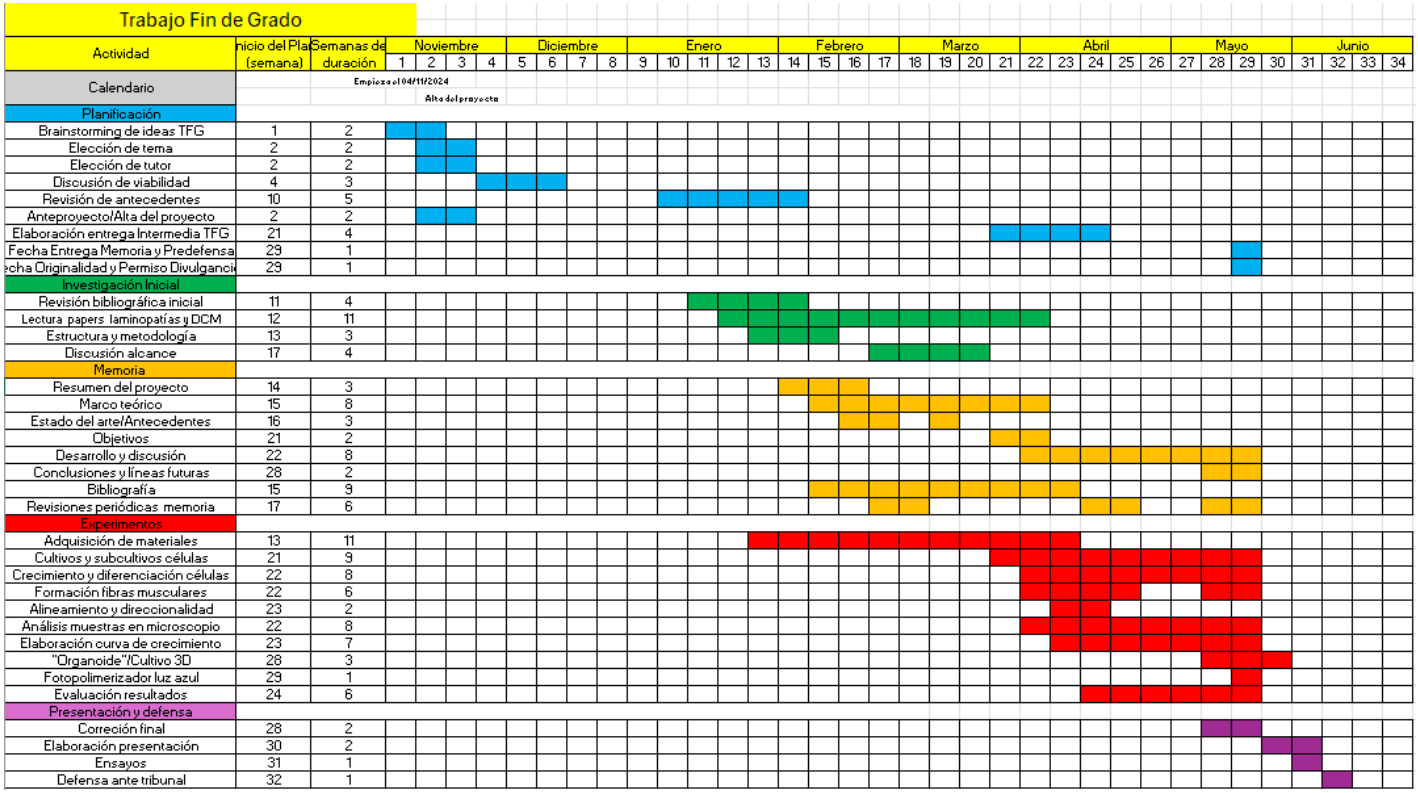



*Ilustración 9. Diagrama de Gantt sobre la cronología del TFG*

Para tener todo estructurado y organizado durante los meses en los que se ha realizado el TFG, se ha utilizado un diagrama de Gantt. Esta herramienta ha sido de gran ayuda para ir controlando los tiempos y la realización de las tareas. El diagrama está dividido en semanas desde noviembre hasta junio, que es el tiempo que ha tomado realizar este proyecto, y las tareas están agrupadas en 5 bloques principales. También, en el cronograma se indica la semana en la que se inicia cada tarea y el número de semanas que se ha tardado en finalizar dicha tarea.

Aparte de esta herramienta, también se ha usado la página web de la biblioteca de la universidad, CRAI Dulce Chacón, para encontrar documentos científicos que siempre fuesen accesibles y para hacerlo de una manera más rápida y precisa, gracias a la función de búsqueda avanzada. Para realizar las citas bibliográficas con mayor facilidad, se ha usado la aplicación Zotero, que es un gestor de referencias bibliográficas. Para mejorar la calidad y contraste de algunas imágenes tomadas a microscopio y para cuantificar parámetros como la direccionalidad o el alineamiento de las fibras musculares se ha empleado la aplicación ImageJ.

**Archivo Diagrama Gantt completo en anexo*

## 5.2 Objetivos de desarrollo sostenible

El desarrollo del TFG busca dar cavidad a algunos de los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) más importantes para proteger el planeta y prosperar como sociedad.

El TFG está comprometido y cumple con algunos apartados del ODS. El principal es el de salud y bienestar debido a que se investiga acerca de laminopatías musculares, enfocado en comprender algunas de las diferencias que existen entre el crecimiento y la diferenciación de las células sanas y mutadas. Aunque el TFG no este destinado a hallar una solución a la enfermedad, se realiza un estudio in vivo con células que tienen inhibido el gen LMNA y el desarrollo de este tipo de investigaciones puede ser beneficioso para futuras terapias y ensayos clínicos de laminopatía.

También, cumple el apartado de industria, innovación e infraestructura. En este proyecto, se involucran técnicas muy novedosas como la creación de un “organoide” que trate de replicar las características y condiciones del tejido muscular esquelético o inducir el entrecruzamiento de la gelatina metacrilada con un fotoiniciador cuando se le irradia con luz azul.

Por último, el proyecto respeta el objetivo de producción y consumo responsables. Se destaca la importancia y utilidad de los estudios in vivo y, además, se promueve la creación de biomateriales o polímeros como el “organoide” que replica el músculo y que busca ser un modelo alternativo a la experimentación con animales. Para este trabajo, se lleva a cabo una investigación exhaustiva con células de ratón, pero en ningún momento es necesario utilizar ratones. Esto no quiere decir que se tengan que dejar de emplear animales en investigaciones, pero sí que se puede reducir el número y encontrar otras alternativas viables como la planteada.

## 5.3 Recursos requeridos

### 5.3.1 Materiales químicos y biológicos

- Alícuota de células C2C12
- Alícuota de células KO
- Medio de cultivo enfocado en el crecimiento (D10F):
  - DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)
  - 10 % FBS (Fetal Bovine Serum)
  - 1% ABS (Antibiotic Solution)
  - 1% Penicilina
- Medio de cultivo enfocado en la diferenciación (D3H):
  - DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)
  - 3% HS (Horse Serum)
  - 1% ABS (Antibiotic Solution)
  - 1% Penicilina
- Azul de tripano
- Gelatina
- Tripsina
- PBS (Phosphate-Buffered Saline)
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide)
- Gelatina metacrilada
- Fotoiniciador LAP (Fosfinato de litio fenil-2,4,6-trimetilbenzol)

### 5.3.2 Equipos y dispositivos

- Cabina de flujo laminar vertical
- Frascos de cultivo T-25
- Pipetas
- Micropipetas
- Pipeteador o ayudante de pipeteo
- Microscopio
- Hemocitómetro
- Centrifugadora
- Tanque de nitrógeno
- Tubos Falcon
- Puntas para pipetas
- Placa de 24 pocillos (P24)
- Placa de 6 pocillos (P6)
- Limpiador ultrasónico
- Bomba de vacío
- Citometro de flujo
- Cámara Motic microscopio
- Tubos Eppendorf
- Fotopolimerizador de luz azul

## 5.4 Procedimientos de los experimentos

La parte práctica de este proyecto consiste en una secuencia de ensayos de laboratorio, en los que se trabaja con células C2C12, que son una línea celular de mioblastos de ratón. La elección de este tipo de células se debe a que presentan una alta similitud con el genoma humano y a que son fáciles de cultivar y manipular genéticamente. Este ciclo de prácticas se utiliza para analizar la formación de fibras musculares bajo diferentes condiciones y atendiendo a la naturaleza de las C2C12, sanas o mutadas, reflejando estas últimas, síntomas de laminopatías musculares. También, se cuantifica o estima como es el alineamiento y direccionalidad de las fibras en cada caso y se realiza una curva de crecimiento para células sanas y mutadas. Por último, se crea un "organoide" o tejido artificial que consiste en un cultivo 3D que replica las características y condiciones del tejido muscular esquelético y se cultivan y diferencian en él las células de mioblastos murinos.

### 5.4.1 Formación de fibras musculares

Se tienen dos alícuotas de mioblastos murinos conservadas en un tanque de nitrógeno, a temperaturas cercanas a los -196ºC. La primera de ellas es de células C2C12 sanas y la segunda son C2C12 con knockout para el gen LMNA, conocidas también como células KO. Esto quiere decir que se ha desactivado el funcionamiento de LMNA de forma intencionada a través de la tecnología de edición genética conocida como CRISPR/Cas9. Al carecer del funcionamiento de este gen, no hay lámina nuclear y, por tanto, no se expresan ni se sintetizan las proteínas laminas por lo que se puede asegurar que el modelo celular generado mediante knockout permite reproducir fenotipos asociados a laminopatías musculares, facilitando su estudio in vitro. Lo que les ocurra a estas células en el proceso de formación de las fibras musculares puede ser beneficioso para estudiar acerca de estas enfermedades.




*Ilustración 10. Alícuotas de células C2C12 sanas y C2C12 con Knockout para el gen LMNA*

En primer lugar, las alícuotas se encuentran en el tanque de nitrógeno, donde las células se encuentran vivas y conservan sus propiedades gracias a que fueron congeladas en medio de cultivo y con un crioprotector, el cual evita en todo momento que la membrana celular se dañe. El proceso de descongelación tiene que ser rápido ya que el crioprotector, dimetilsulfóxido (DMSO), es tóxico y puede dañar las células. Por esta razón, primero se prepara el medio de cultivo donde se van a colocar las células, que es el mismo para las C2C12 sanas y las KO.

El medio que se prepara se conoce coloquialmente como "D10F" y consiste en DMEM, 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de ABS (antibióticos), 1% de glutamina y se mezcla todo en un tubo Falcon con ayuda de pipetas y micropipetas. El DMEM es el medio base que proporciona los nutrientes necesarios, el FBS incluye factores de crecimiento que favorecen la duplicación celular, el ABS es un combinado de estreptomicina y penicilina y su función es prevenir la contaminación bacteriana y la glutamina favorece la proliferación celular. El "D10F" se prepara dentro de una cabina de flujo laminar vertical, la cual permite proteger en todo momento las muestras y evitar que se contaminen.

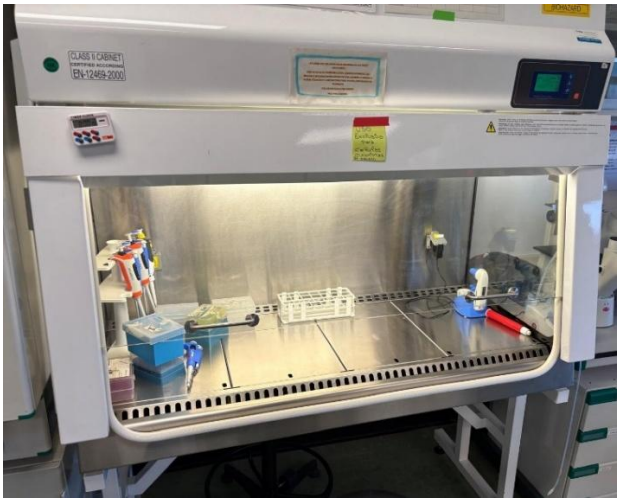



*Ilustración 11. Cabina de flujo laminar vertical*

Una vez que se tiene preparado el medio de cultivo se introduce en una centrifugadora durante 5 minutos a 300g. Por último, se pone en un baño maría a conservar a temperatura de 37ºC.

A continuación, ya se puede sacar las alícuotas del tanque de nitrógeno y se ponen las muestras a 37ºC entre 1 y 2 minutos. Las células no se pueden exponer al DMSO durante mucho tiempo ya que es tóxico. Después, dentro de la cabina de flujo laminar vertical con la ayuda de una pipeta se mezcla en un frasco de cultivo celular T-25 las células C2C12 sanas con medio de cultivo "D10F", que se había creado previamente. Se repite el mismo proceso para las C2C12 KO utilizando otro frasco de cultivo celular T-25.

Los frascos que contienen las células y el medio de cultivo, los vaciamos porque las C2C12 se adhieren a las paredes del frasco y el medio es necesario tirarlo para acabar con cualquier resto de DMSO. Las C2C12 no se pierden ya que son células adherentes y necesitan de una superficie sólida para crecer y diferenciarse. De esta forma, se ha eliminado el crioprotector.

Después, se vuelve a poner medio de cultivo D10F fresco en los frascos, que ya no está contaminado por DMSO y se realizan subcultivos de ambos grupos de células en 2 T25. De forma

que se obtienen 4 frascos de células con 5mL de disolución, con las células correspondientes y un medio de cultivo fresco. De estos frascos, 2 contienen C2C12 sanas y 2 C2C12 KO.

Una vez subcultivadas, se realiza un examen de viabilidad donde comprueba el número de células que han sobrevivido al proceso de descongelación. Para ello, se utiliza un hemocitómetro o Cámara de Neubauer que es un dispositivo de laboratorio de cristal que a partir de una pequeña muestra de un cultivo celular permite contar el número de células vivas y muertas que hay en un determinado volumen. Integra un diseño microscópico con dos cámaras que se dividen en 4 celdas válidas para contar cada una, dentro de las cuales hay una retícula que se divide a su vez en 4 secciones y contando el número de células en estos cuadrados se puede realizar una estimación muy precisa del número de células que han sobrevivido al proceso de descongelación.

Se extrae con una micropipeta una muestra de unas micras de células y se le añade la misma cantidad exacta de azul de tripano y se coloca en el borde del hemocitómetro. La gota penetra por capilaridad entre el porta y el cubre rellenando por completo una de las cámaras. Este proceso se hace para ambas disoluciones de células.

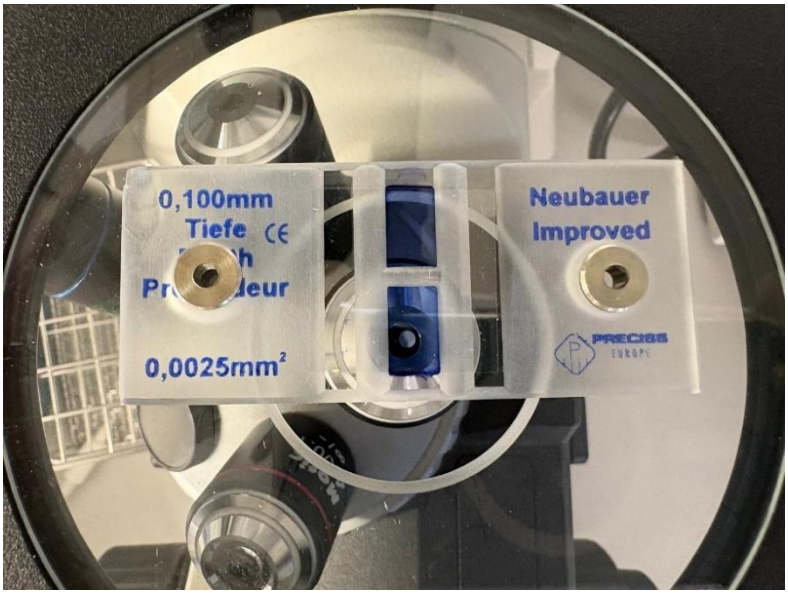



*Ilustración 12. Hemocitómetro con células C2C12 sanas en la parte superior y C2C12 KO en la parte inferior*

La cámara de Neubauer permite calcular el número de células vivas y muertas para saber que balance podemos hacer del periodo de conservación y descongelación. Al añadir azul de tripano, este tiñe las células que están muertas, ya que estas son porosas y el tinte penetra en su membrana, lo que hace que se vean azules en el microscopio. En cambio, en las células C2C12 que están vivas el azul de tripano no penetra en ellas y se ven brillantes, como de color blanco.

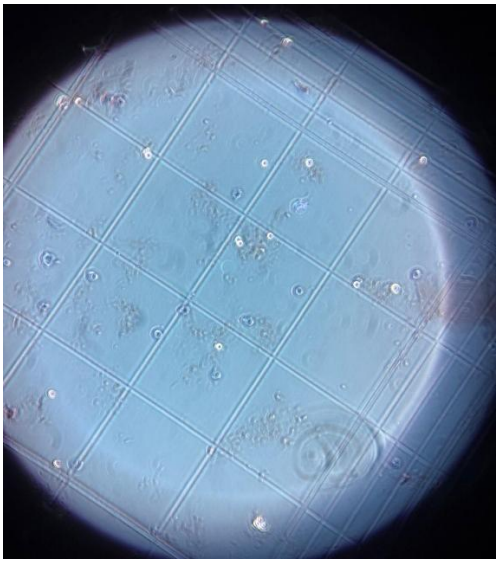


*Ilustración 13. Cámara de hemocitómetro vista a microscopio*

Para poder realizar el conteo, se coloca el hemocitómetro en un microscopio y se cuenta el número de células brillantes y azules que hay en cada cuadrante. El método puede parecer muy simple, pero es muy efectivo y fácil de aplicar. En la siguiente imagen se puede observar cómo se ve la cámara de Neubauer en el microscopio y hay que contar el número células brillantes y azules en el recuadro de 4x4.

Para calcular el número de células murinas supervivientes y muertas se calcula un promedio de las células en los 4 cuadrantes y se aplica la siguiente fórmula:

$$Número\ de\ células/mL = Recuento\ celular\ x\ Factor\ de\ dilución\ x\ Volumen$$

$$Número\ de\ células/mL = \frac{Células\ contadas}{Nº\ de\ cuadrados}\ x\ Factor\ de\ dilución\ x\ 10^4$$

Tras contar, las células vivas y muertas que había en cada una de las dos cámaras se obtuvieron los siguientes resultados:

*Tabla 1. Resultados conteo hemocitómetro para C2C12 sanas*

| C2C12 sanas | Cuadrante 1 | Cuadrante 2 | Cuadrante 3 | Cuadrante 4 |
|---|---|---|---|---|
| Nº células vivas | 6 | 4 | 5 | 8 |
| Nº células muertas | 2 | 8 | 1 | 2 |

Hubo un total de 23 células vivas y 13 muertas para las C2C12 sanas.

*Tabla 2. Resultados conteo hemocitómetro para C2C12 KO*

| C2C12 KO | Cuadrante 1 | Cuadrante 2 | Cuadrante 3 | Cuadrante 4 |
|---|---|---|---|---|
| Nº células vivas | 14 | 14 | 18 | 9 |
| Nº células muertas | 8 | 7 | 14 | 5 |

Hubo un total de 55 células vivas y 34 muertas para las C2C12 KO.

Para las células C2C12 sanas, hubo un total de 64% de células vivas y 36% de células muertas. En cada frasco de células sanas, hay aproximadamente 575.000 células y por cada $cm^2$ un total de 23.000 células. Para las KO, hubo un 62% de células vivas y un 38% de células muertas. Por cada frasco T25 se estima un total de 1.375.000 células y 55.000 células vivas por cada $cm^2$.

Los porcentajes de células vivas son cercanos al 60% y hubiera sido algo mejor que los porcentajes estuvieran por encima del 80%, pero se puede entender porque las células fueron congeladas en 2016 (C2C12 sanas) y 2019 (C2C12 KO) y han podido pasar por momentos en los que no se cumplían las condiciones óptimas para su conservación en los tanques de nitrógeno.

A las 36 horas de haber sembrado los cultivos, las células KO empezaban a esta cerca del 100% de confluencia y las C2C12 estaban aproximadamente entre un 10-20% de confluencia. En este momento, se cambió el medio actual por uno nuevo que estaba fresco. El tipo de medio era el mismo, pero es importante ir cambiándolo pasado el tiempo, para eliminar los desechos y aportar nuevos nutrientes. Sino se cambia el medio, las células carecen de nutrientes y no serían capaces de llegar a la confluencia máxima.

Con el paso de los días, se fue revisando los cultivos y cambiando el medio "D10F" por uno fresco cuando era necesario. También, se volvieron a realizar subcultivos llegando a tener 4 frascos de cultivo T25 con células C2C12 sanas y 4 con células C2C12 KO.

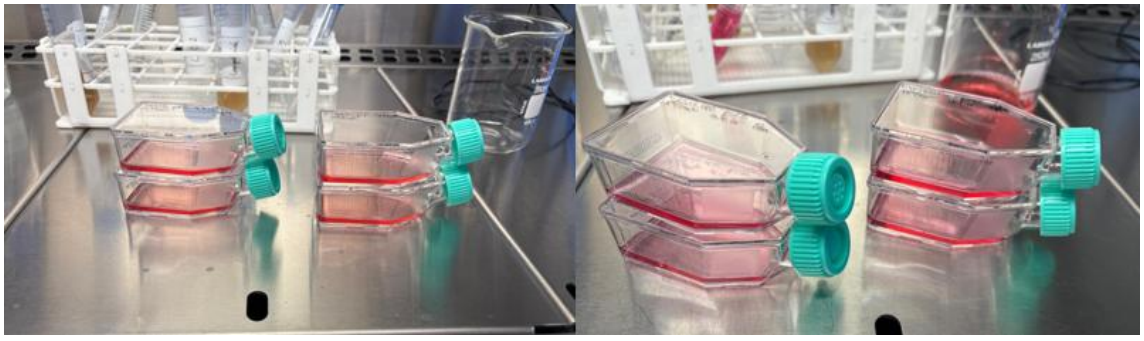


*Ilustración 14. Frascos T25 con C2C12 sanas/ Frascos T25 con C2C12 KO*

Pasadas aproximadamente 96 horas del comienzo, se trasplantan los cultivos de los frascos T25 a una placa de cultivo de 24 pocillos conocida como "p24". Se quiere sembrar 6 pocillos con

C2C12 sanas y otros 6 con C2C12 KO, de los cuales 3 pocillos irán sembrados con medio de cultivo, y otros 3 pocillos llevarán aparte un tapizado de gelatina.

Para poder realizar el tapizado con gelatina, se prepara gelatina al 0,1% y se le añade el mismo medio de cultivo que estábamos usando hasta el momento, "D10F", para que favorezca a la correcta adhesión de la gelatina a la superficie del pocillo.

Después, se preparan las células para poder moverlas del frasco T25 a la placa p24. Para ello, vertemos el medio de cultivo antiguo y realizamos dos lavados con PBS. La función de este es acabar de eliminar el medio de cultivo previo para poder poner el siguiente y que ambos no se mezclen. Luego, se añade tripsina, la cual desempeña un papel fundamental. Esta es necesaria para poder despegar las C2C12, que son células adherentes pegadas a la superficie del frasco para luego poder trasplantarlas. La tripsina es una encima proteolítica que es capaz de romper las proteínas de adhesión y de esta forma permite poder liberar y transportar las células. En este paso, es recomendable mezclar con la micropipeta la tripsina con las C2C12 para que así no se queden juntas y luego sea más fácil contarlas correctamente. Una vez realizada la mezcla, se añade medio de cultivo D10F con el objetivo de neutralizar la tripsina y ya no se rompan más proteínas de adhesión ya que los mioblastos murinos ya han sido despegados de los frascos. Para conseguir neutralizar la tripsina correctamente, es necesario que se añada un mayor volumen de medio que de tripsina.

A continuación, se extrae una pequeña muestra de cada uno de los dos grupos de mioblastos murinos, de unas pocas micras, para realizar un conteo celular en un hemocitómetro. El procedimiento es el mismo que el realizado previamente, se mezcla con azul de tripano y así se puede realizar una estimación del número de células vivas que se tienen. Se obtuvieron 53.000 células C2C12 sanas por $cm^2$ y 110.000 C2C12 KO por $cm^2$.

Cada pocillo de la p24 tiene un área de superficie de 2 $cm^2$ y se quiere que haya un total de 50.000 células musculares por pocillo, es decir 25.000 por $cm^2$. Sabiendo esto, se colocan las células suspendidas con el "D10F" en los pocillos de la p24, de forma que quedan 3 pocillos con C2C12 normales sin gelatina, 3 con C2C12 normales con gelatina, 3 con KO sin gelatina y 3 con KO con gelatina.

Para favorecer la formación de fibras musculares, es muy conveniente cambiar el medio de cultivo "D10F" por un medio de diferenciación que se conoce como "D3H". La principal diferencia radica en el tipo de suero que se emplea. En el "D10F" se usa FBS que es suero fetal bovino y favorece la proliferación celular. En cambio, en el "D3H" se utiliza Horse Serum (HS) que sirve para inducir la diferenciación celular, es decir, que fomenta la formación de fibras musculares.




*Ilustración 15. Limpiador ultrasónico con medios de cultivo "D10F" y "D3H"*

Para elaborar el medio “D3H”, se necesita un 3% de HS, un 1% de glutamina, un 1% de ABS (mezcla de estreptomicina y penicilina) y el resto es el medio DMEM.

El siguiente paso, consiste en cambiar el medio de cultivo “D10F” de la p24 por el “D3H”. Para realizarlo, no se puede verter directamente desde la p24 porque se mezclaría el contenido de los distintos pocillos. Por esta razón, se utiliza una bomba de vacío que va conectada a una punta de aspiración y permite extraer el medio “D10” sin causar complicaciones. Posteriormente, se añade con una micropipeta el “D3H” para favorecer la formación de fibras musculares.



*Ilustración 16. Bomba de vacío con punta de aspiración incorporada*

Tras haber realizado todos los pasos, se disponen de células C2C12 sanas y KO con gelatina y sin gelatina en la p24 y solo queda ir examinando, en el microscopio, la evolución de los mioblastos murinos con el paso de los días.

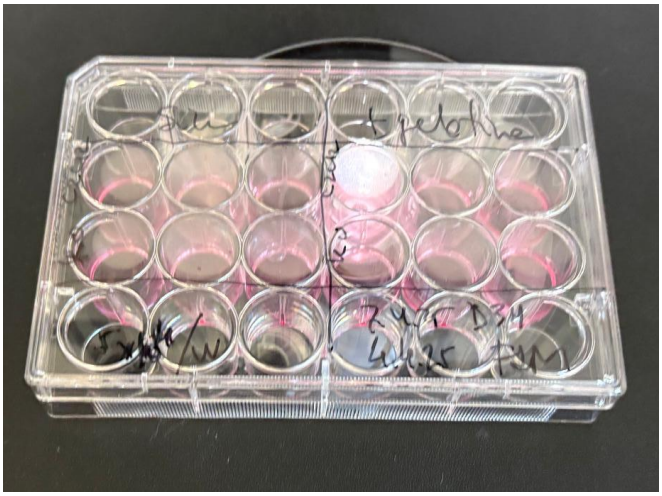


*Ilustración 17. Placa p24 con C2C12 sanas y C2C12 KO con y sin gelatina*

La principal hipótesis reside en que las células C2C12 sanas tendrán una mayor facilidad para formar fibras musculares y las KO es posible que presenten problemas, que es lo que sucede en las enfermedades asociadas a laminopatías musculares.

Tras cultivar todas las células C2C12 en la placa p24, se examinaron a microscopio.

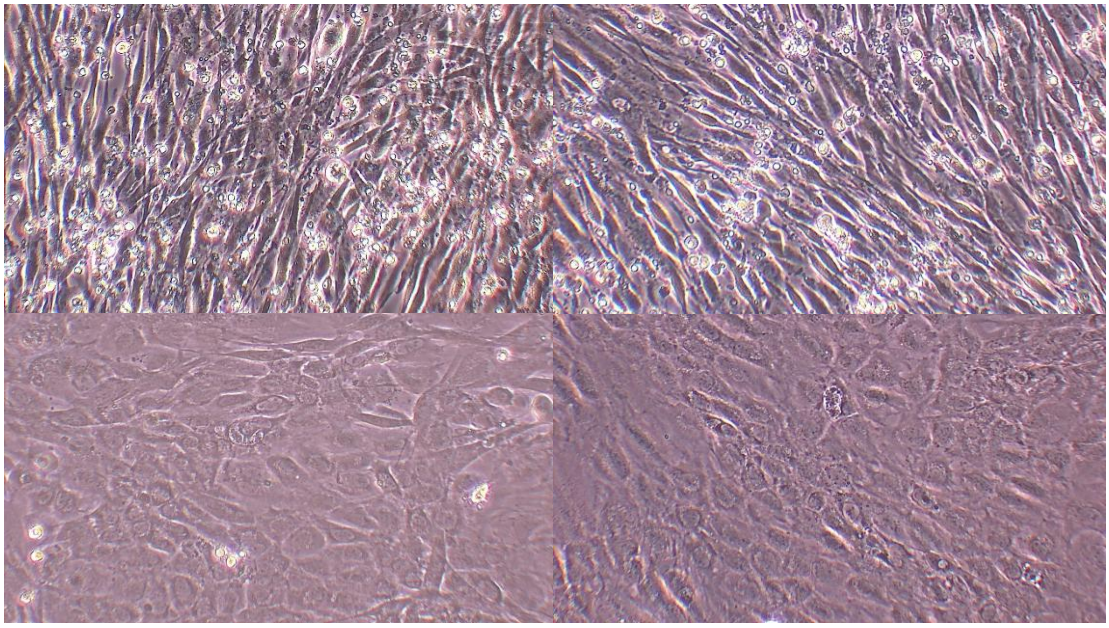


*Ilustración 18. $C2C12_0$ sin gelatina / $C2C12_0$ con gelatina / $KO_0$ sin gelatina / $KO_0$ con gelatina*

Con ayuda de la aplicación ImageJ, se filtran las imágenes obtenidas del microscopio para que tengan una mayor calidad y contraste.

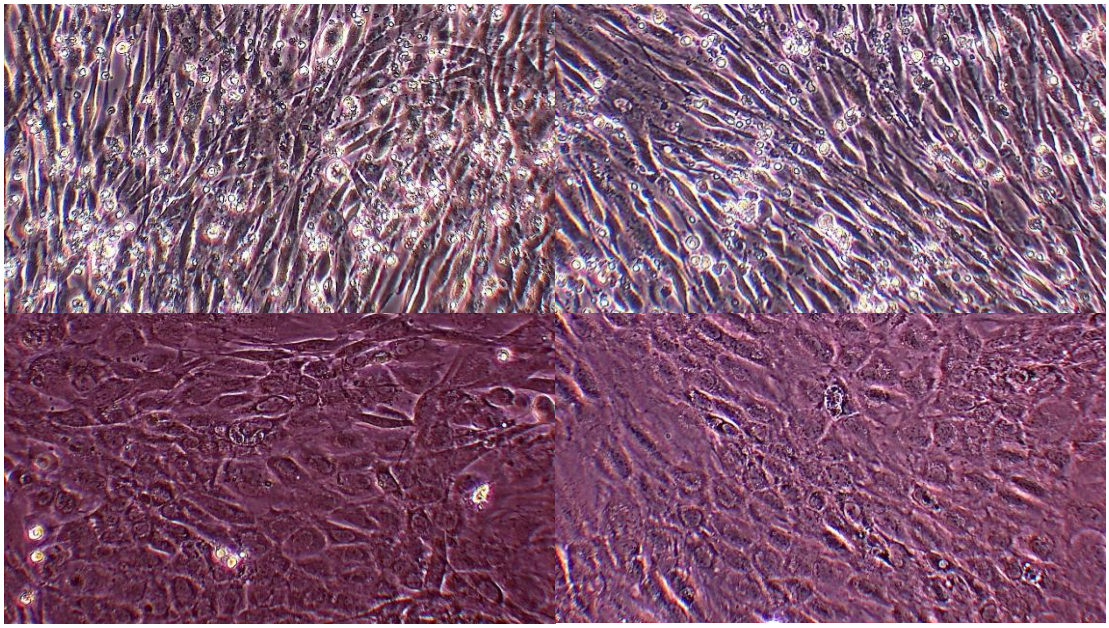


*Ilustración 20. Imagen filtrada $C2C12_0$ sin gelatina / $C2C12_0$ con gelatina / $KO_0$ sin gelatina / $KO_0$ con gelatina*

Pasadas 24 horas, se volvieron a comprobar el estado y evolución de las células.

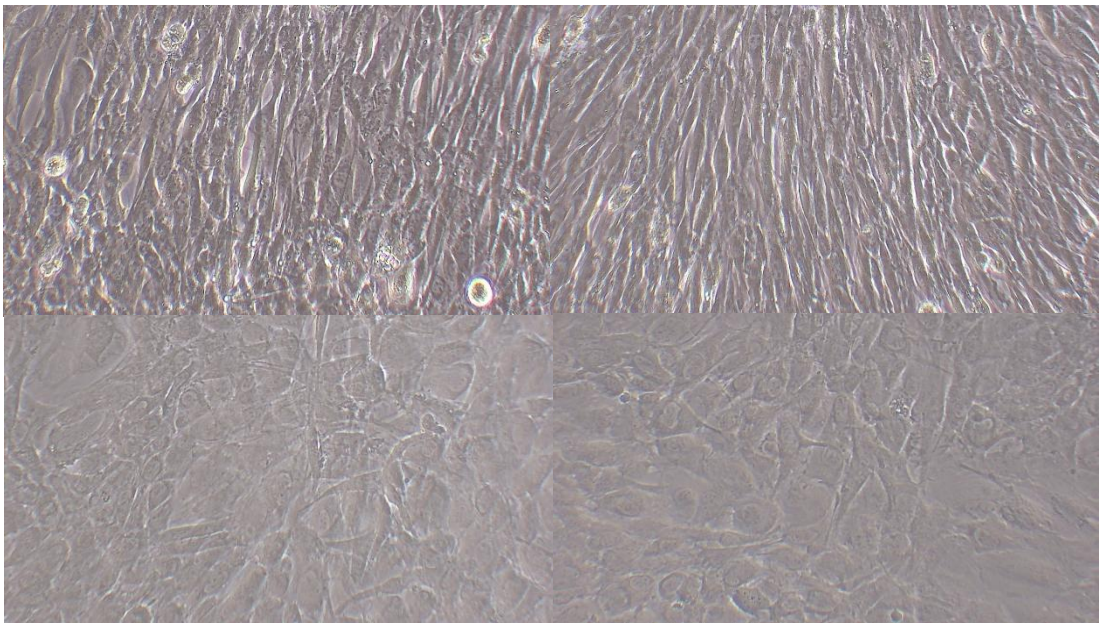


*Ilustración 21. $C2C12_1$ sin gelatina / $C2C12_1$ con gelatina / $KO_1$ sin gelatina / $KO_1$ con gelatina*

Mejorando el contraste de las imágenes, obtenemos lo siguiente.

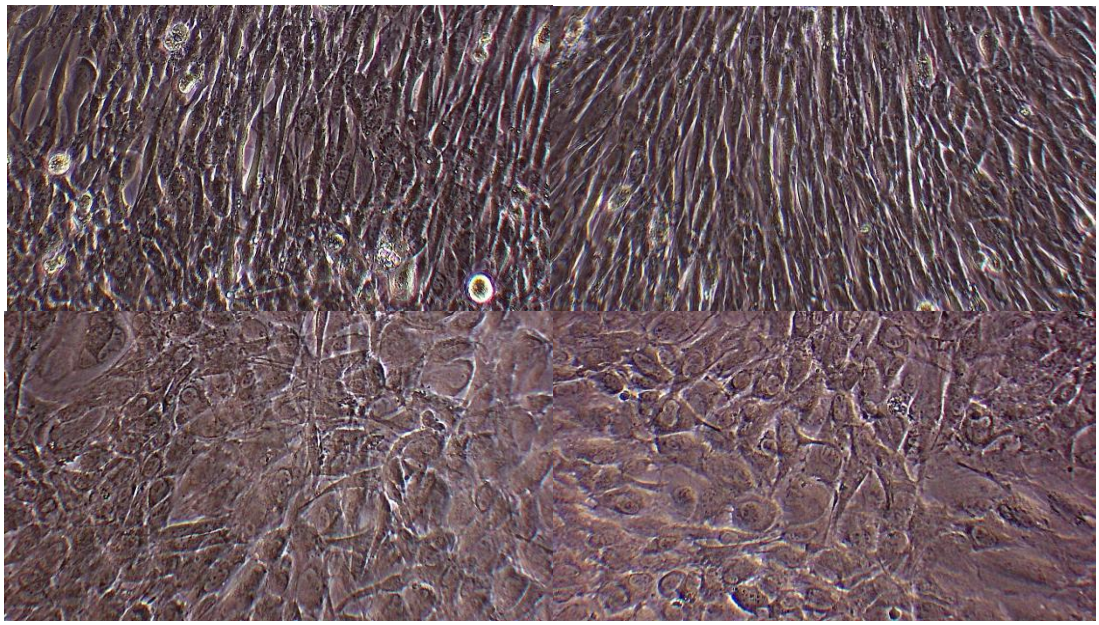


*Ilustración 22. Imagen filtrada $C2C12_1$ sin gelatina / $C2C12_1$ con gelatina / $KO_1$ sin gelatina / $KO_1$ con gelatina*

Normalmente las fibras musculares están completamente formadas a partir del quinto o sexto día. Estos son los resultados que se obtuvieron en el día 6 después de haber introducido el medio de diferenciación "D3F".

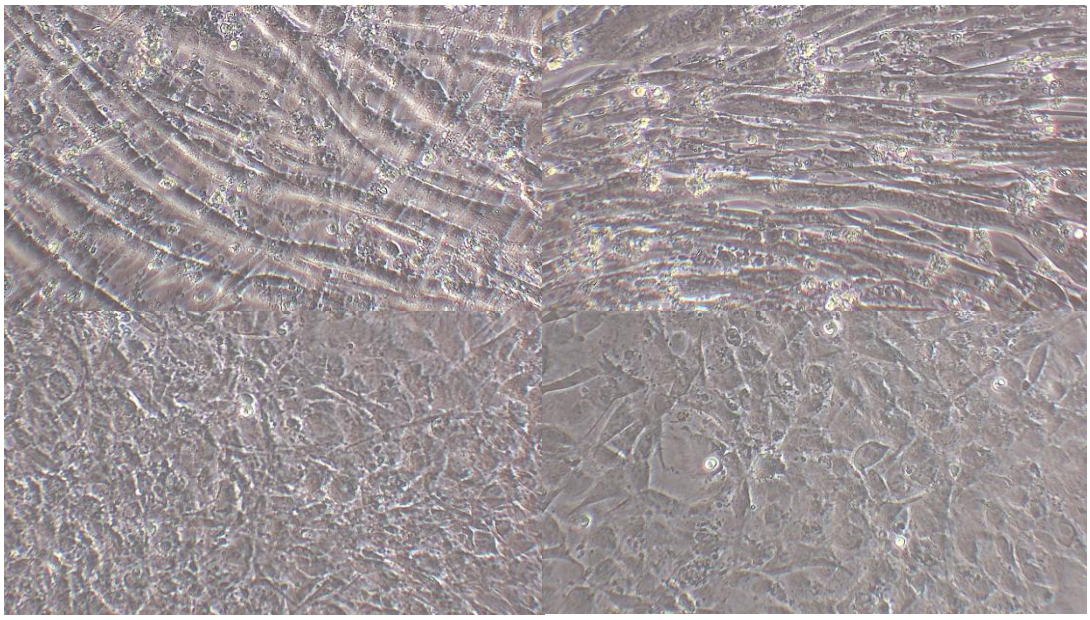


*Ilustración 23. $C2C12_6$ sin gelatina / $C2C12_6$ con gelatina / $KO_6$ sin gelatina / $KO_6$ con gelatina*

Se ajusta el contraste, para tener una mejor calidad de imagen.

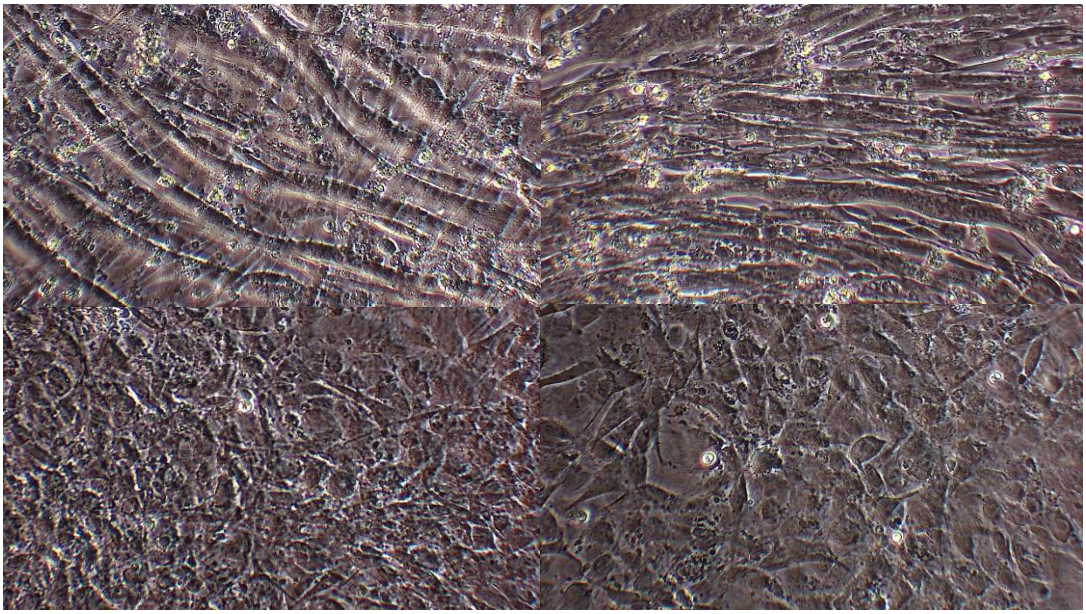


*Ilustración 24. Imagen filtrada $C2C12_6$ sin gelatina / $C2C12_6$ con gelatina / $KO_6$ sin gelatina / $KO_6$ con gelatina*

Como se puede apreciar en las imágenes del día 6 (después de haber introducido el medio de diferenciación) para las células C2C12 sanas se forman fibras musculares integradas que constan de la fusión de células que se han unido formando células multinucleadas. En cambio, para las células C2C12KO no se han formado ningún tipo ni indicio de fibra muscular.

Estos resultados cumplen con la hipótesis inicial. En los mioblastos murinos sanos, se forman fibras musculares con normalidad que se encargan de la relajación y contracción de los músculos. En cuanto a las células mutadas, estas tienen inhibido el gen LMNA lo cual hace que pierdan la expresión y funciones básicas asociadas de las proteínas laminas A y C, tal y como pasa en las laminopatías asociadas a distrofia muscular congénita.

Por lo tanto, como se observa en las imágenes ni aun cuando se trata de favorecer la formación de fibras musculares en las células C2C12KO, estas son capaces de lograrlo lo cual es una clara evidencia de los problemas musculares que presentan los enfermos de laminopatías, los cuales al igual que las C2C12KO tienen mutaciones en el gen LMNA.

Además, también se puede distinguir las diferencias estructurales en ambos tipos de mioblastos. Las C2C12 sanas, tienden a ser muy circulares y las C2C12KO mucho menos debido a la pérdida de la integridad estructural provocado por las mutaciones en las proteínas laminas asociadas. La inestabilidad nuclear de los mioblastos murinos se traduce en una forma más anómala y con una menor circularidad.

Incluso al contar células en el hemocitómetro, era común que hubiese un menor porcentaje de viabilidad en las células C2C12KO, lo cual puede estar asociado al daño nuclear y estrés celular al que estos mioblastos se ven inducidos al estar mutados.

### 5.4.2 Alineamiento y direcionalidad

Utilizando el software ImageJ, se quiere medir distintos parámetros de las C2C12 sanas y mutadas para poder cuantificar mediante un método tangible el alineamiento de las células musculares en distintas fases de la formación de fibras musculares.

Concretamente, se utiliza un plugin del software llamado "OrientationJ Dominant Direction" el cual se basa en un histograma ponderado de orientaciones para establecer la dirección dominante y que porcentaje de las fibras están orientadas en esa dirección. Cuantas más fibras estén orientadas en la misma dirección más favorable resulta la formación de fibras musculares. De esta forma, tenemos un método tangible de poder medir el alineamiento y direccionalidad de las células.

Este método se aplica en tres momentos diferentes. El primero de ellos, es en el mismo día que las células han alcanzado la confluencia máxima y se les cambia el medio de proliferación por el medio de diferenciación. El segundo grupo de imágenes son de 24 horas después del cambio de medio y el tercero corresponde a 6 días después del cambio y con ya todas las células fusionadas formando fibras musculares. El alineamiento se mide para células sanas y células mutadas con y sin recubrimiento de gelatina.

Las imágenes que se emplean son justo las mismas que aparecen en el apartado anterior.

Los resultados obtenidos con el software fueron los siguientes. En el apartado que pone "Orientation(Degrees)" se expresa la dirección en grados en la que hay mayor coherencia de alineamiento y en "Coherency(%)" se refleja el porcentaje de células orientadas en esa dirección, entre 0 y 1, entendiendo 1 como la máxima alineación y 0 como la mínima.

| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
|---|---|---|
| 1 | 78.658 | 0.236 |
| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
| 1 | -56.371 | 0.256 |
| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
| 1 | -6.004 | 0.114 |
| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
| 1 | -40.666 | 0.119 |

*Ilustración 25. Día 0 / Orientación $C2C12_0$ sin gelatina / $C2C12_0$ con gelatina / $KO_0$ sin gelatina / $KO_0$ con gelatina*

| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
|---|---|---|
| 1 | 83.166 | 0.399 |
| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
| 1 | -83.243 | 0.430 |
| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
| 1 | 69.198 | 0.094 |
| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
| 1 | 33.298 | 0.019 |

*Ilustración 26. Día 1 / Orientación $C2C12_1$ sin gelatina / $C2C12_1$ con gelatina / $KO_1$ sin gelatina / $KO_1$ con gelatina*

| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
|---|---|---|
| 1 | -54.231 | 0.060 |
| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
| 1 | -1.172 | 0.152 |
| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
| 1 | -50.624 | 0.047 |
| Slice | Orientation [Degrees] | Coherency [%] |
| 1 | -55.590 | 0.055 |

*Ilustración 27. Día 6 / Orientación $C2C12_6$ sin gelatina / $C2C12_6$ con gelatina / $KO_6$ sin gelatina / $KO_6$ con gelatina*

En el caso de las C2C12KO, se puede observar que el porcentaje de células orientadas en la misma dirección es muy inferior al de las células sanas. Esto tiene sentido, ya que las células C2C12 sí que son capaces de formar fibras musculares y las C2C12KO no. Hay que tener en cuenta que un mayor alineamiento de las células favorece la formación de fibras porque al estar orientadas en la misma dirección les cuesta menos trabajo fusionarse a las células.

Respecto a la presencia de gelatina en las células mutadas no se puede sacar ningún patrón que sea esclarecedor de que la existencia de esta favorezca el alineamiento de las células porque los porcentajes son muy similares en ambos casos. El día en el que tienen un mayor alineamiento las células mutadas es el primero, el día del cambio de medio.

Para las células C2C12 los porcentajes de alineamiento son muy elevados. En el día 0, las células aún no se han fusionadas y están muy alineadas lo que hace que se obtenga porcentajes de alineamiento muy elevado, del 23,6% para sin gelatina y 25,6% con gelatina. En el día 1, las células siguen sin fusionarse y formar células multinucleadas y los porcentajes aumentan siendo de 39,3 % para células sin gelatina y 43% con gelatina. En el día 6, se observan largas fibras musculares formadas por células multinucleadas que se han fusionado. Esto hace que las células

dejen de estar orientadas en la misma dirección y, por lo tanto, el porcentaje de alineamiento decrece considerablemente siendo de 6% para células sin gelatina y de 15,2% para células con gelatina.

Con esta información se puede concluir que el mayor alineamiento de las células sanas se obtiene justo antes de que se fusionen las células C2C12 y que la presencia de recubrimiento de gelatina induce un mayor alineamiento por lo que favorece la formación de fibras musculares.

También, destaca la gran diferencia de alineamiento que hay entre células sanas y mutadas donde las C2C12 sanas se alinean mucho más porque si que son capaces de formar fibras musculares. Además, comparando las imágenes de 24 horas después del cambio de cultivo se recogen datos que reflejan que el alineamiento de las mutadas no supera el 10% y, en cambio, en las sanas el porcentaje supera el 40%.

### 5.4.3 Curva de crecimiento

Se realiza una curva de crecimiento de 7 días para las células C2C12 y C2C12KO. Para ello se utilizaron placas P6, que tienen 6 pocillos con un volumen de 9,4 $cm^2$ por pocillo.

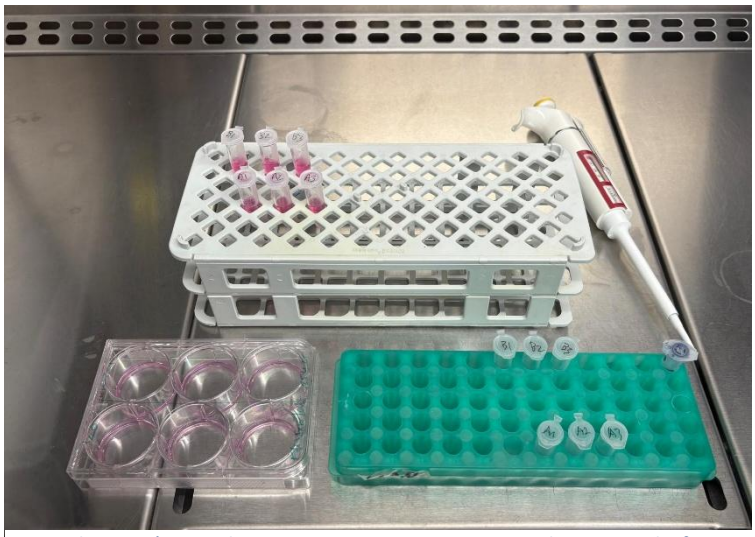


*Ilustración 28. Placa P6 con C2C12, C2C12KO y tubos eppendorf*

Se sembraron varias placas P6 con 3 pocillos de células sanas y 3 de células mutadas a una densidad de 5.000 células por $cm^2$ y 50.000 por pocillo aproximadamente. La densidad escogida no es determinante, pero es importante que siempre sea la misma densidad inicial por pocillo para que se tenga el mismo punto de partida y los resultados sean precisos.

El método consiste en tripsinar las células para luego neutralizarlas con medio de cultivo, y finalmente poder contarlas de forma manual con la ayuda de un hemocitometro.

Las células, en primera instancia, se encuentran con medio de cultivo “D10F” a una densidad inicial de 5.000 células por $cm^2$. Se vierte el medio y se realiza un lavado con PBS para eliminar cualquier resto del medio resto que después se retira. A continuación, se añade tripsina que es responsable de que las células que están adheridas a las paredes del pocillo se despeguen. Se

mezcla con ayuda de la pipeta y se añade medio "D10F" que se encarga de neutralizar la tripsina gracias a que contiene proteínas inhibidoras de proteasas. Es importante que la cantidad de medio añadida sea superior a la de tripsina para que se realice el proceso de neutralización correctamente.

Luego, se añade la mezcla en tubos Eppendorf, se centrifuga durante 5 minutos a 300 g y se realiza una resuspensión de las células. Para esta, primero se vierte el medio y luego se añade 1 mL de "D10F". Finalmente, se mezclan en otros tubos Eppendorf, 20 µL de las células musculares con 20 µL de azul de tripano, lo cual nos permite diferenciar las células vivas de las muertas.

Para acabar, se colocan las distintas muestras en cámaras de Neubauer, se coloca en el microscopio y se cuenta el número de células que hay en cada uno de los 4 cuadrantes. Para que el resultado sea el más preciso posible, se hace la media de los 3 pocillos de C2C12 sanas y de los 3 pocillos de C2C12KO. Este proceso se repite para cada uno de los 7 días y así se consigue obtener una curva de crecimiento de las células.

Para el día 0, hay un total de 50000 células por pocillo y 5.000 por $cm^2$ para ambos tipos de C2C12, ya que es la siembra inicial.

Para el día 1, hubo un total de 48.167 células por pocillo y 4.817 por $cm^2$ para las C2C12 sanas. Y para las células C2C12KO, hubo de 38.000 por pocillo y 3.800 por $cm^2$. Esto tiene sentido, ya que para la mayoría de las células en el primer día no se producen divisiones y, además, no todas sobreviven al cultivarse.

En el día 2, se contaron 228.667 células sanas por pocillo y 22.867 por $cm^2$. Y para las células KO, hay un total de 193.000 por pocillo y 19.300 por $cm^2$. Estos resultados son muy elevados y nos reflejan la gran facilidad que presentan las células para dividirse.

En el día 3, hubo 516.667 células C2C12 por pocillo y 51.666 por $cm^2$. Y para las células C2C12KO, hubo un total de 343.333 por pocillo y 34.333 por $cm^2$. Las células siguen dividiéndose y empieza a ver una diferencia notable en ambos tipos.

Para el día 4, se contaron un total de 800.000 células C2C12 por pocillo lo que es equivalente a 80.000 células por $cm^2$. Y para las KO, 500.000 por pocillo y 50.000 células por $cm^2$. Continúan dividiéndose las células a gran ritmo.

En el día 5, se obtuvieron 1.076.000 células C2C12 por pocillo y 107.600 por $cm^2$. Para las células mutadas, hubo un total de 530.000 células por pocillo y 53.000 por $cm^2$. El número de las células sanas duplica al de las mutadas aproximadamente.

Antes de los días 6 y 7, se cambió el medio antiguo por medio fresco, para evitar que pudiesen morir las células y siguiesen diviendose.

Para el día 6, se cuentan 950.000 C2C12 por pocillo y 95.000 por $cm^2$. Y para las C2C12KO, hay un total de 778.333 por pocillo y 77.833 por $cm^2$. El número de las células musculares sanas disminuye ligeramente y el de las mutadas sigue aumentando.

En el día 7, hubo un total de 1.475.000 C2C12 por pocillo y 147.500 por $cm^2$. Y para las células C2C12KO, hay un total de 573.333 y 57.333 por $cm^2$. En el último día, el número de células C2C12 sanas aumento y las C2C12KO disminuyeron.

A continuación, se muestran los resultados de la curva de crecimiento de forma gráfica.




*Ilustración 29. Curva de crecimiento de C2C12 y KO en un volumen de 10 cm²*

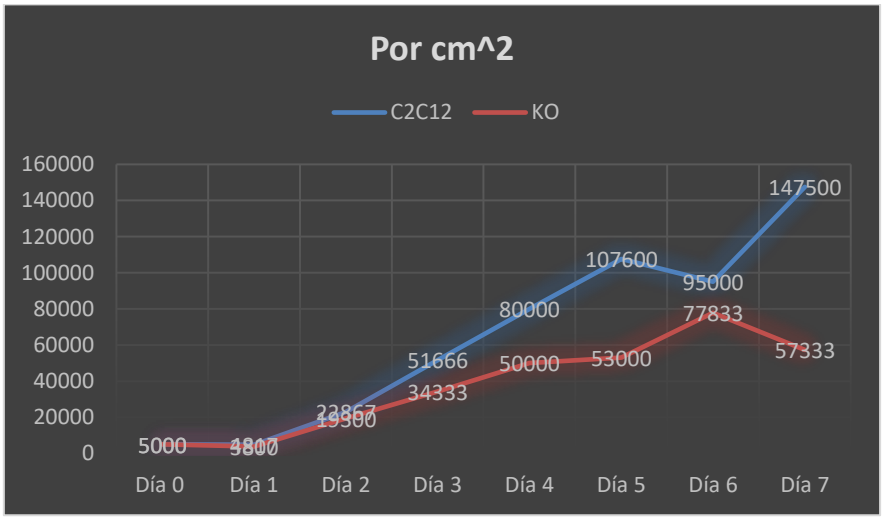



*Ilustración 30. Curva de crecimiento de C2C12 y KO en un volumen de 1 cm²*

Si se observan las células al microscopio, se puede comprobar cómo va aumentando el número de células cada día. A continuación, se muestra imágenes de las células en el día 1,2,3 y 4, siendo las imágenes de la izquierda de células C2C12 y las de la derecha de C2C12KO.

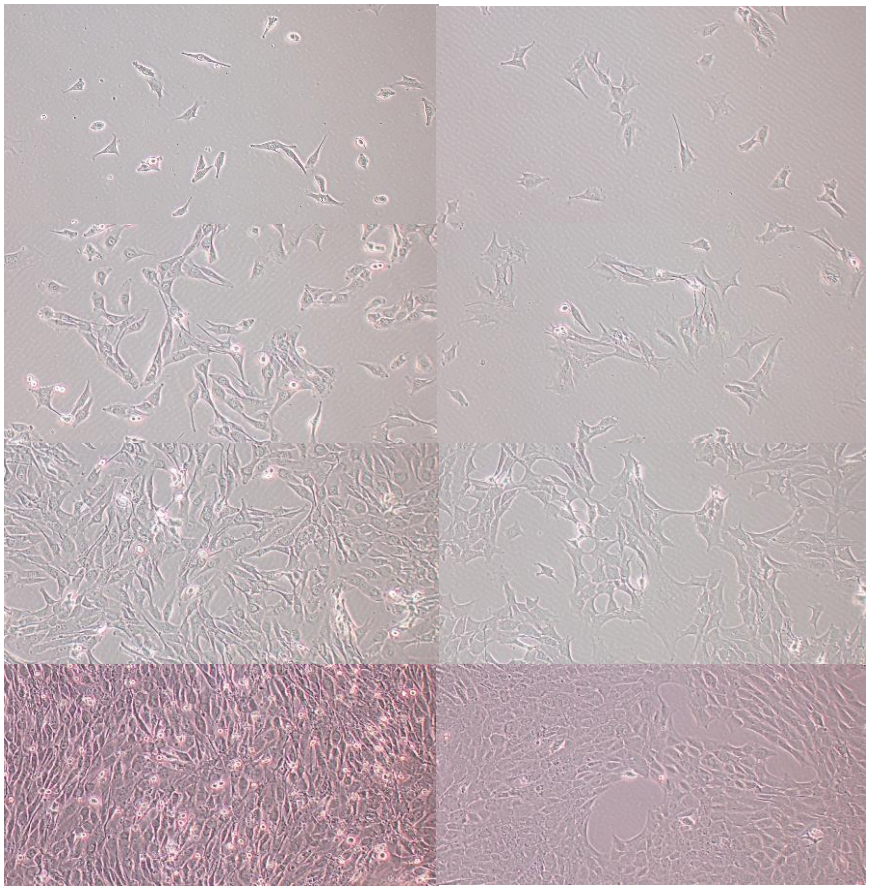


*Ilustración 31. C2C12 y C2C12KO días 1,2,3 y 4 de la curva de crecimiento*

Al realizar las curvas de crecimiento, se llegó a la conclusión de que las células C2C12 crecen y se dividen a una mayor velocidad que las C2C12KO. Si se siembran a una densidad inicial de 5000 células por $cm^2$, se puede asegurar que para el día 5 el número de células sanas duplica al de células mutadas.

El día exacto en el que hay el doble de C2C12 que de C2C12KO depende de la cantidad inicial de células sembradas pero lo que es seguro es que en algún momento habrá el doble de sanas que de mutadas. A una mayor densidad inicial de células se alcanzará antes este suceso y si, en cambio, hay una densidad menor se tardará más días en producir. Este análisis, también se realizó para una siembra inicial de 10.000 células por $cm^2$ y se comprobó que para el día 4 había la mitad de C2C12KO que de C2C12.

El número medio de divisiones o generaciones es un parámetro muy interesante que permite conocer el número de veces que se ha duplicado la población. A continuación, se calcula el número medio de divisiones desde el día 1 hasta que las C2C12 doblan en número a las C2C12KO, que es el día 5. Se hace de esta manera, porque este periodo de tiempo corresponde con la fase exponencial o logarítmica de la curva de crecimiento.

Para calcularlo, se emplea la siguiente fórmula:

$$N_f = N_0 \, x \, 2^d$$

Siendo:

Número de células de finales = $N_f$

Número de células de iniciales = $N_0$

Número medio de divisiones o generaciones = d

Número de generaciones media para C2C12, entre día 1 y día 5:

$$N_f = N_0 \, x \, 2^d$$

$$1.076.000 = 48.167 \, x \, 2^d$$

$$2^d = 22{,}34$$

$$d = 4{,}48$$

Número de generaciones media para C2C12KO, entre día 1 y día 5:

$$N_f = N_0 \, x \, 2^d$$

$$530.000 = 38.000 \, x \, 2^d$$

$$2^d = 13{,}94$$

$$d = 3{,}8$$

Realizando los cálculos se obtiene que el número medio de generaciones en la fase estacionaria es de 4,48 divisiones para C2C12 y 3,8 divisiones para C2C12KO.

También, se quiere calcular el número medio de divisiones desde el inicio hasta el final de la curva de crecimiento, es decir desde el día 0 hasta el día 7. Se realizan los siguientes cálculos:

Número de generaciones media para C2C12, entre día 1 y día 5:

$$N_f = N_0 \, x \, 2^d$$

$$1.475.000 = 50.000 \, x \, 2^d$$

$$2^d = 29{,}5$$

$$d = 4{,}88$$

Número de generaciones media para C2C12KO, entre día 1 y día 5:

$$N_f = N_0 \, x \, 2^d$$

$$573.000 = 50.000\ x\ 2^d$$

$$2^d = 11{,}46$$

$$d = 3{,}52$$

Para la curva de crecimiento de una semana, el número de generaciones media para C2C12 es de 4,88 divisiones y de 3,52 para C2C12KO.

### 5.4.4 Cultivo 3D con gelatina metacrilada

En este apartado, se busca crear un "organoide" que consiste en un cultivo 3D para las células C2C12 y las C2C12KO utilizando gelatina metacrilada como principal componente de la matriz. De esta forma, las células quedan envueltas en la gelatina metacrilada y al tratarse de un cultivo 3D, las células de mioblastos murinos quedan en suspensión en vez de adheridas como suele ocurrir.

Siguiendo este procedimiento, el objetivo consiste en simular el entorno tridimensional del músculo para comprobar si este puede favorecer el crecimiento y diferenciación de las células. La gelatina metacrilada permite imitar el entorno fisiológico del tejido muscular esquelético.

En primer lugar, se parte de un gramo de gelatina metacrilada al 40% que se encuentra liofilizado y añadiendo volumen de PBS se consigue diluir hasta forma gelatina metacrilada al 10%.

Se trabaja sobre una placa p24 y en primer lugar se procede a recubrir los pocillos de la p24 con gelatina normal al 0,1%, que cuando se retira proporciona una envoltura que puede ser beneficiosa para la proliferación de las células.

Después, como son necesarias que las células estén en suspensión se tripsinizan y neutralizan con medio "D10F" para poder separarlas las C2C12 de la superficie de los frascos T25 donde se conservan. Este procedimiento se hace tanto para las C2C12 como para las C2C12KO. Luego, se cuenta el número de células que hay en un hemocitómetro. Este paso es necesario porque se debe conocer el total de células para luego poder sembrar la p24 a la densidad celular que se requiera. Para este estudio, se siembra 500.000 células por pocillo.

A continuación, hay que mezclar las células en suspensión con la gelatina metacrilada en tubos eppendorf. Este proceso resulta algo tedioso debido a que la gelatina metacrilada es prácticamente sólida a la temperatura ambiente de la cabina de flujo laminar. Y a mayor porcentaje de metacrilación mayor solidez a temperatura ambiente. En cambio, a 37º C la gelatina metacrilada se encuentra en estado líquido.



*Ilustración 32. Gelatina metacrilada al 1% y 5% a temperatura ambiente*

En la imagen se observa gelatina metacrilada a temperatura ambiente. La que está al 5% se encuentra completamente sólida y la del 1% como presenta un menor porcentaje de metacrilación es semisólida y por eso se cae al girar el tubo eppendorf.

Para poder pipetear la gelatina metacrilada, esta tiene que estar en estado líquido por lo tanto es necesario introducir un baño maría dentro de la cabina para mantener la gelatina metacrilada líquida a 37º C y así poder mezclarla con las células.

Una vez mezclada, la gelatina metacrilada con las células correspondientes en tubos eppendorf intermedios, ya se puede pipetear en la placa p24, la cual tiene un recubrimiento previo de gelatina normal al 0,1% (sin metacrilar).

Cabe destacar que se parte de gelatina metacrilada al 10% y se quiere realizar el ensayo con gelatina al 5% y al 1%. Para formar la gelatina 5%, del volumen formado por las células junto a la gelatina metacrilada 10%, el 50% tiene que ser gelatina y para la gelatina al 1% el 10% del volumen total tiene que ser gelatina metacrilada.

Finalmente, se obtiene la placa p24 final sembrada con 500.000 células por pocillo. Hay un total de 3 pocillos con C2C12 y gelatina metacrilada al 5%, 3 pocillos con C2C12KO y gelatina metacrilada al 5%, 3 pocillos con C2C12 y gelatina metacrilada al 1% y 3 pocillos con C2C12KO y gelatina metacrilada al 1%. También, se siembran 6 pocillos más en 2D, es decir como en los experimentos previos, que cuenta con la misma densidad celular por pocillo.

Se conserva la placa p24 a temperatura ambiente durante 30 minutos y, de esta forma, se consigue que la gelatina metacrilada al 5% se encuentre en estado sólido y la del 1% semisólida. Se añade medio de proliferación, “D10F”, en cada pocillo sobre la gelatina metacrilada. El medio es líquido y por lo tanto no se mezcla directamente con la gelatina metacrilada siempre que se conserve a temperatura ambiente.

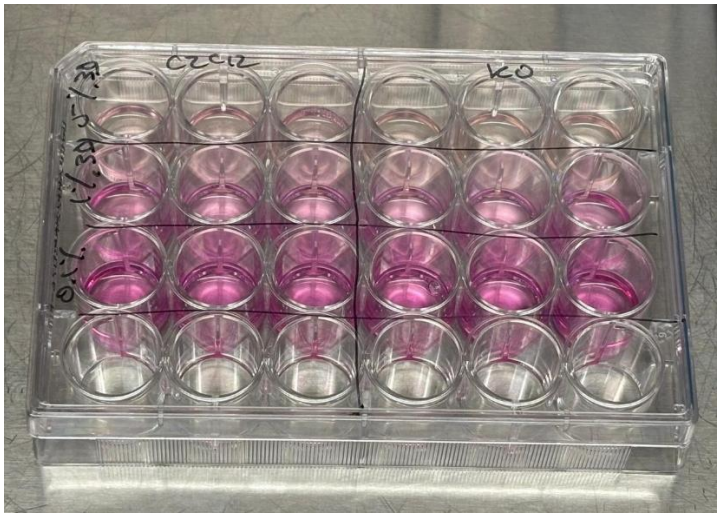



*Ilustración 33. Cultivo 3D de C2C12 y C2C12KO con gelatina metacrilada*

Una vez preparados los cultivos 3D con las células de mioblastos de ratón sanas y mutadas se observa el resultado al microscopio. Se puede apreciar fácilmente que las células se encuentran en suspensión y no adheridas a la superficie del pocillo. Además, como están a la misma densidad celular y en suspensión, apenas se observan diferencias entre los distintos tipos de células.

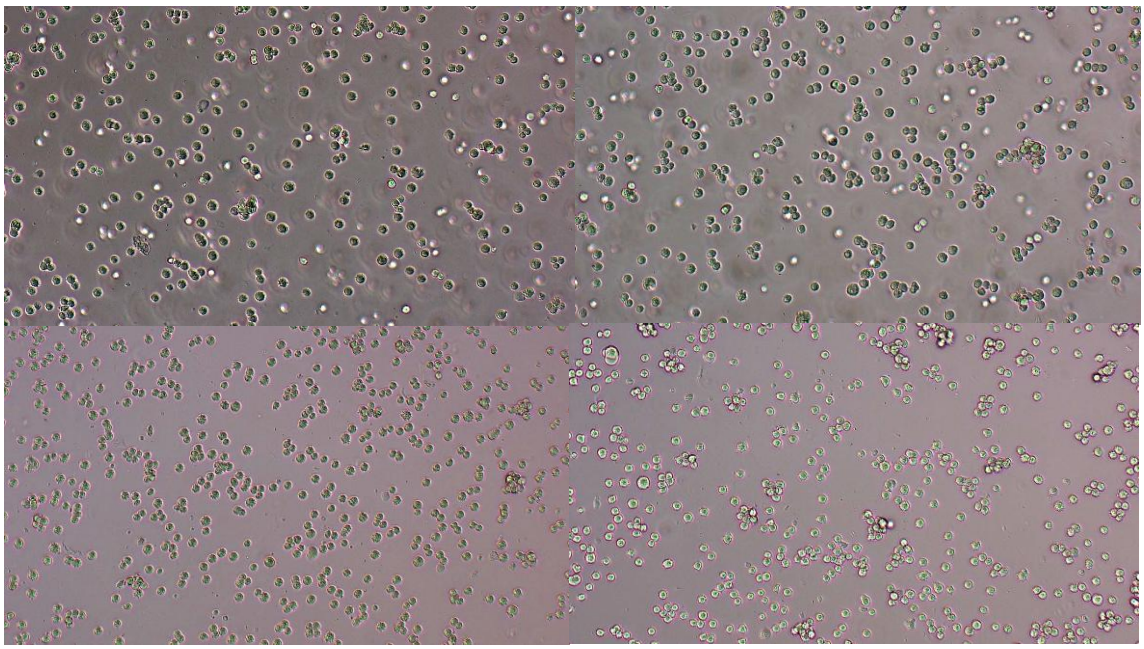


*Ilustración 34. C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1%*

Pasados unos días, las células alcanzan la confluencia máxima y se procede a cambiar el medio de proliferación, “D10F”, por el medio de diferenciación, “D3H”. De esta forma, entre la confluencia y el medio que favorece la fusión de células se acaban formando fibras musculares.

Pasados 5 o 6 días, las células C2C12 tienen que estar diferenciadas por completo. Sin embargo, los resultados no son los esperados debido a que no se ha conseguido crear el "organoide" que permitiese encapsular las células y que se diferencien en él. Las células consiguen diferenciase, pero de una forma menos eficiente que lo que lo hacen en un cultivo 2D.

La mayoría de las células se han adheridos y no están encapsuladas ya que no se ha formado el "organoide". Además, se observa que la formación de fibras musculares es más eficiente en cultivos 2D, luego en gelatina metacrilada al 1% y, finalmente, al 5% es donde más les cuesta diferenciarse a las células.

Se puede observar la diferenciación de las células en las distintas condiciones, una semana después de cambiar al medio "D3H".

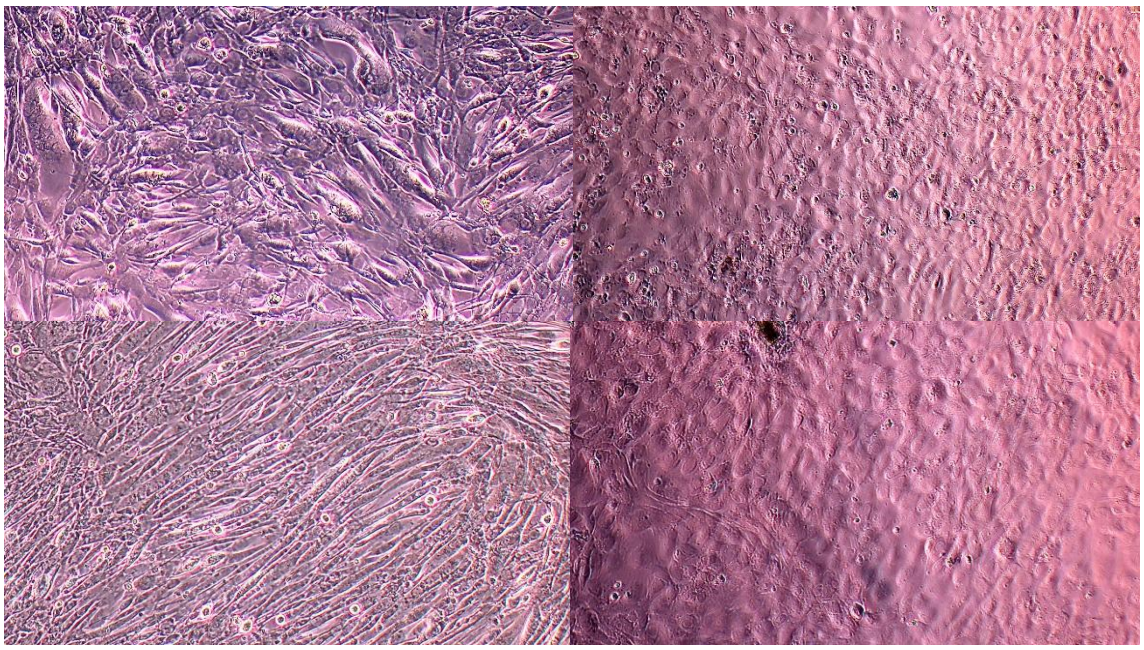


*Ilustración 35. C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1%*

Se repitió el procedimiento, pero cambiando una serie de variables. Se cree que la baja densidad celular y la dilución del porcentaje de metacrilación al mezclarse el medio "D10F" con la gelatina a 37ºC han podido afectar negativamente.

La gelatina metacrilada es una gelatina que ha sido modificada químicamente con grupos metacrilato para favorecer el entrecruzamiento de esta mediante reacciones radicalarias. Se va a favorecer el entrecruzamiento con la presencia de un agente entrecruzante conocido como LAP que cuando se proyecta sobre él luz azul, actúa como un fotoiniciador generando radicales libres que inician el proceso de polimerización de los grupos metacrilato de la gelatina metacrilada. Además, se emplea una densidad celular de 1.500.000 millones de células por pocillo, lo cual supone tres veces mayor densidad respecto al anterior.

Al favorecer la metacrilación con la luz azul, se pretende que cuando se añada el medio "D10F" y este a 37ºC este no se mezcle con la gelatina, sino que quede sobre su superficie y de esta manera no se diluya el porcentaje de metacrilación.

Se vuelve a realizar el ensayo de la misma forma que anteriormente, pero esta vez añadiendo el agente entrecruzante LAP y con mayor densidad celular. Se realiza tanto para las células sanas como mutadas al 5% y al 1% de metacrilación.

Con un fotopolimerizador de radiación electromagnética en el espectro de la luz azul, que tiene una longitud de onda de entre 380 y 500 nm, se exponen los cultivos 3D a la luz azul durante 15 segundos.

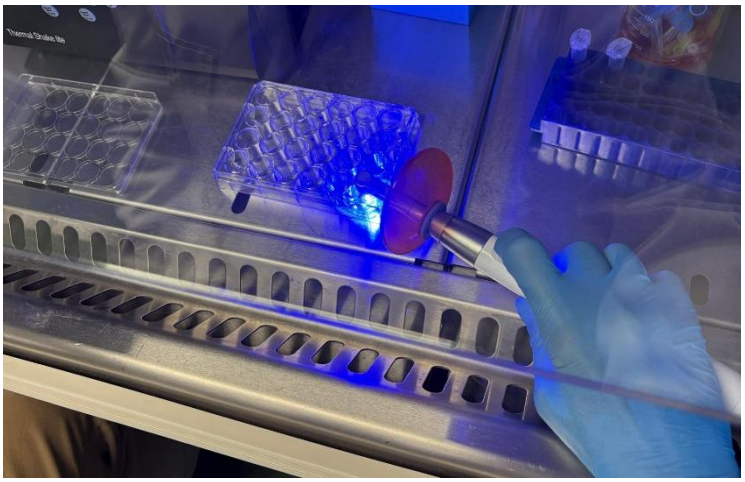


*Ilustración 36. Irradiación de luz azul sobre "organoide" con fotopolimerizador*

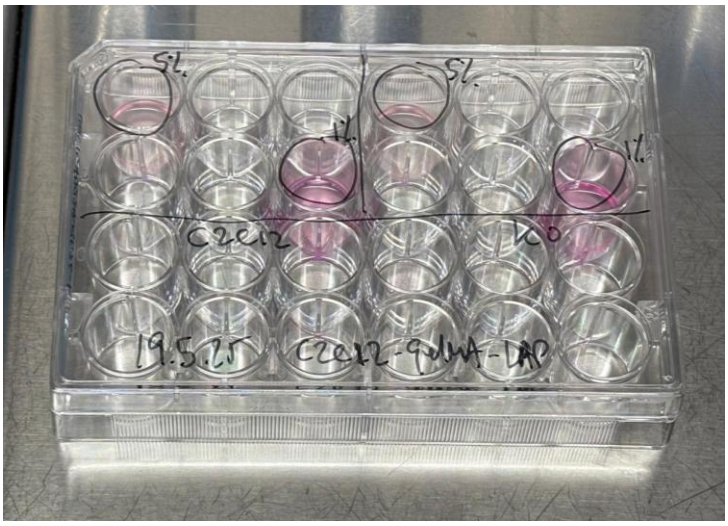


*Ilustración 37. P24 con "organoide" compuesto por C2C12, LAP y gelatina metacrilada*

Lo que debe ocurrir a continuación es que el agente entrecruzante LAP absorba la luz y se formen radicales libres que ataquen los grupos metacrilato iniciando una fotopolimerización. Los grupos metacrilato de la gelatina metacrilada forman enlaces covalentes que dan lugar a una red

tridimensional la cual replica las condiciones del tejido muscular esquelético. Las células C2C12 se quedan encapsuladas dentro del polímero o hidrogel que se ha formado.

Después, de proyectar la luz azul se conservan los cultivos 3D a temperatura ambiente durante 30 minutos para favorecer la gelificación de la gelatina metacrilada. Después, se añade medio de crecimiento "D10F" para que las células puedan dividirse. La gelatina metacrilada se solidifica algo más que en el anterior ensayo y esta solidez es mayor en la gelatina del 5% que en la de 1%. Como el polímero con las células es cercano a sólido y el medio es líquido, al pipetear este último no se mezcla con la gelatina metacrilada a temperatura ambiente. Aun así, los nutrientes del medio sí que llegan a las células C2C12.

Se observa al microscopio los organoides que encapsulan las células. Como se puede apreciar se encuentra en suspensión dentro de la red tridimensional que ha formado la gelatina metacrilada.

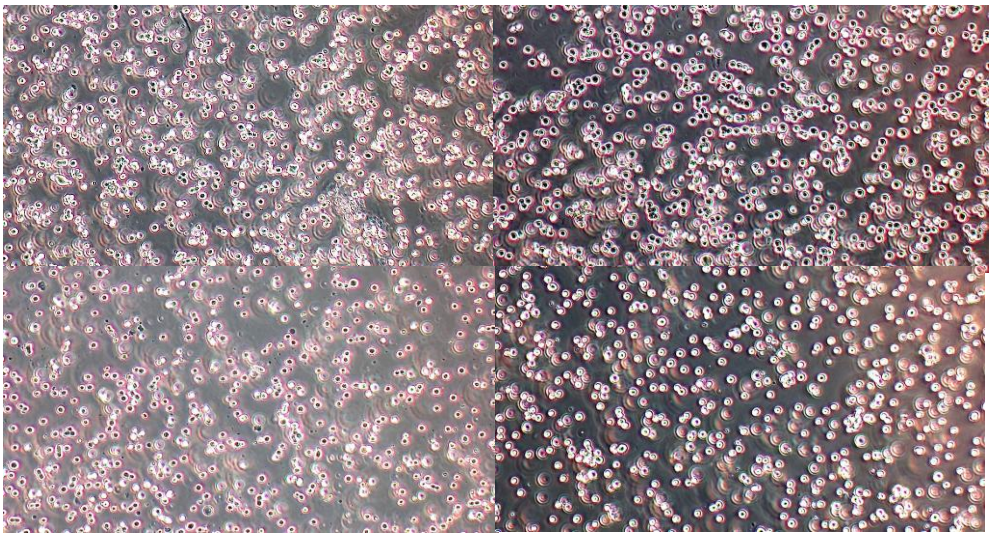


*Ilustración 38. C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1%*

Pasadas 24 horas, las células se encuentran en confluencia y se cambia el medio "D10F" por "D3H" para que las C2C12 se diferencien y se formen fibras musculares. Se descubre que los cultivo 3D se han levantado del sustrato, es decir del fondo de los pocillos de la p24. Se observa al microscopio y se aprecian las células dentro del "organoide" que se ha separado.

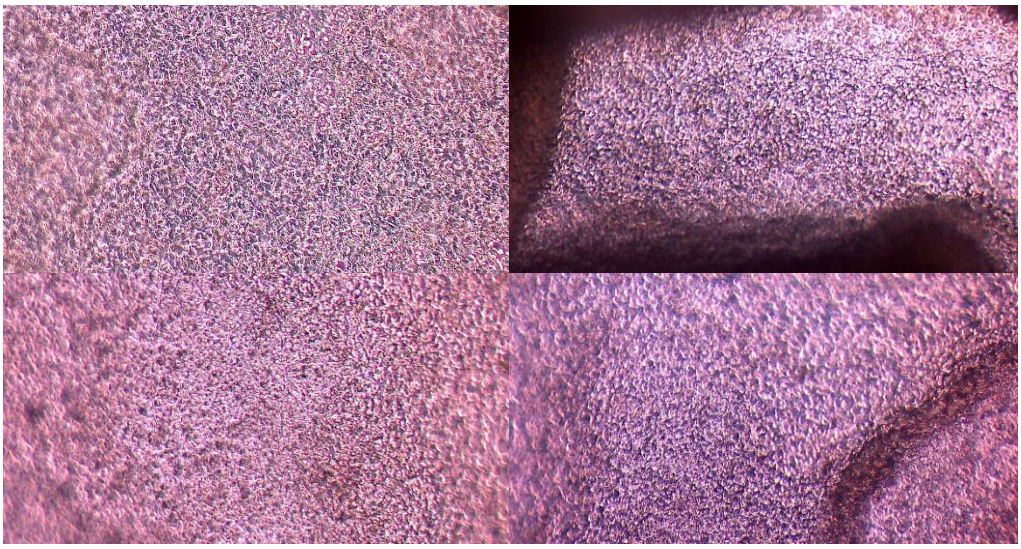


*Ilustración 39. C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1%*

Pasada una semana del cambio de medio, se vuelven a mirar las células al microscopio.

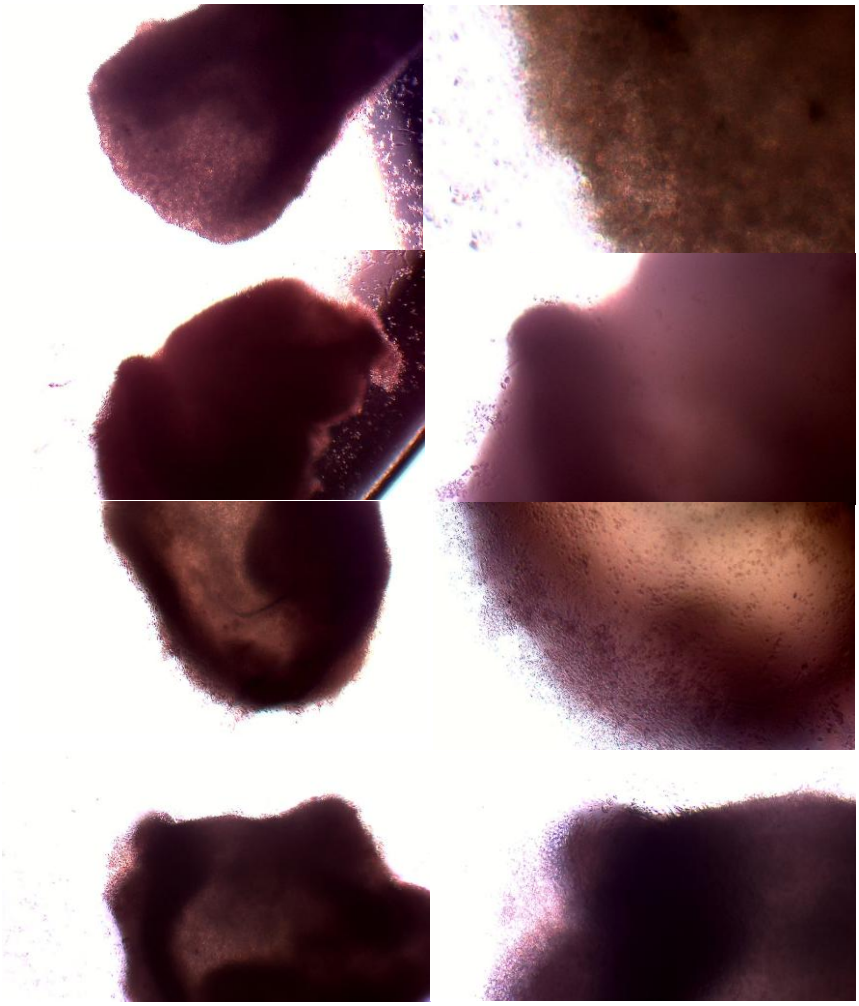


*Ilustración 40. "Organoide" C2C12 5% / C2C12KO 5% / C2C12 1% / C2C12KO 1%*

La primera fila corresponde con C2C12 al 5%, la segunda con C2C12KO al 5%, la tercera con C2C12 al 1% y la cuarta con C2C12KO al 1%.

En la imagen se observa el "organoide" pero como este se despegó del sustrato (la p24), no se pueden apreciar las células y fibras musculares en el interior. Fuera del "organoide" había C2C12 que no habían sido encapsuladas y se encontraban diferenciadas por lo que se sabe que en el interior del cultivo 3D también se han diferenciado.

Sin embargo, tras la elaboración de los distintos "organoides" se observaba que la matriz de gelatina metacrilada no favorecía la formación de fibras musculares, y aunque estas se formasen costaba más tiempo y eran menos evidentes las fusiones de las células. Por lo tanto, se debió hacer algo mal durante el procedimiento y se tienen que ajustar varios parámetros para conseguir la diferenciación más eficiente que en un cultivo 2D.

Aún así se consigue formar el "organoide" y se cree que ajustando el porcentaje de gelatina metacrilada, aumentando la densidad celular, asegurándose que se irradie correctamente y durante el tiempo necesarios las células con luz azul y evitando que la matriz se separe del sustrato se puede conseguir un "organoide" que encapsule células C2C12 y que estas se diferencien de forma más eficiente en su interior.

## 5.5 Resultados experimentales

Atendiendo a los distintos resultados obtenidos, el proyecto ha cumplido con los objetivos experimentales planteados inicialmente.

Uno de los objetivos primordiales, era hacer una comparación del proceso de crecimiento y diferenciación de las células C2C12 sanas y mutadas, comprobando como era la formación de fibras musculares en cada caso. Este procedimiento fue muy diferente para ambos tipos de células, porque las células sanas conseguían unirse formando células multinucleadas que daban lugar a fibras musculares y en las células mutadas no había ni siquiera indicios de células multinucleadas.

Por otra parte, estos resultados tienen mucho sentido y las células mutadas que tienen inhibido el gen LMNA reproducen características de laminopatías musculares donde las mutaciones en este gen derivan en distrofia, hipotonía y debilidad muscular. La falta de formación de fibras musculares en estas células nos refleja los problemas musculares que provocan las mutaciones en las proteínas láminas de este gen.

Otro resultado muy destacado, son las curvas de crecimiento de 7 días para ambos tipos de células. En estas, se precisa el número de células que hay por día de una manera muy exacta. Gracias a esta dinámica, se descubre que el crecimiento de las células sanas es muy superior al de la mutadas y llega un momento que el número de C2C12 duplica al de C2C12KO.

Por otra parte, se mide el alineamiento de las células en distintas fases y bajo diferentes condiciones de una forma tangible con el software ImageJ. Se comprueba la alta relación del alineamiento de los mioblastos con la formación de fibras musculares, por lo que este parámetro siempre es superior en células sanas. También, que el máximo alineamiento se obtiene cuando las células sanas están en confluencia y que cuando se van fusionando las células este disminuye drásticamente. La presencia de un recubrimiento de gelatina hace que incremente ligeramente el

porcentaje de alineamiento favoreciendo la formación de fibras musculares. Por lo tanto, la envoltura de gelatina mejora la adhesión celular y las células tiende a diferenciarse con mayor facilidad.

También, se crea un "organoide" que a partir del entrecruzamiento de la gelatina metacrilada permite crear una red tridimensional que encapsula las células. Al añadir un fotoiniciador, LAP, y proyectar luz azul sobre él se forma enlaces covalentes que favorecen la formación de la red y la creación de un polímero que denominamos "organoide". Esta parte es la que más problemas ha traído, pero una de la que más aplicaciones y líneas de investigación deja abiertas para el futuro.

# Capítulo 6. DISCUSIÓN

## 6.1 Interpretación y análisis de los resultados

Los distintos resultados permiten destacar la importancia de los modelos experimentales en animales para investigar acerca de enfermedades como es el caso de las laminopatías. En ellos, se pueden reproducir aspectos fisiopatológicos que padecen los enfermos de laminopatías musculares lo que permite poder extrapolar resultados que se obtienen en modelo animales a humanos y que así los avances en investigaciones clínicas sean más rápidos y seguros. Además, al conocerse poco de estas enfermedades es muy complicado trabajar directamente con células humanas en las primeras fases de estudios clínicos. En el caso de las líneas celulares de mioblastos de ratón, C2C12, tienen la ventaja de que presenta una alta similitud con el genoma humano y que son fáciles de cultivar y manipular genéticamente.

Los resultados obtenidos en el proceso de crecimiento y diferenciación en las células C2C12 sanas y mutadas son muy esclarecedores y muestran las claras diferencias que hay en ambos procesos. Se han cumplido las hipótesis iniciales de que las células sanas actuarían con normalidad fusionándose y que las mutadas al carecer de estabilidad nuclear les sería muy complicado y no lo lograrían. Esto es muy relevante, y permite comprobar que las mutaciones en el gen LMNA impiden la formación normal de fibras musculares lo que da lugar a que no se pueden realizar las contracciones y relajaciones habituales y, por lo tanto, halla serios problemas musculares que derivan en enfermedades como la L-CMD y similares. Siguiendo esta lógica, si se consiguiese hacer de alguna forma que las células C2C12KO se diferenciasen y formasen fibras musculares, esto invitaría a pensar que podría extrapolarse a enfermos reales de laminopatías. Por lo tanto, trabajar con células con knockout para el gen LMNA abre muchas líneas de investigación para el futuro.

En cuanto a las curvas de crecimiento, han sido clave para identificar la notable diferencia que existe en la velocidad de crecimiento y duplicación de ambos tipos de células musculares. El ritmo más bajo de crecimiento en las células normales refleja que las mutaciones no solo derivan en problemas musculares, sino que hasta provoca anomalías en el ciclo celular. En este apartado, se descubre que en pocos días de proliferación el número de C2C12 sanas duplica el de C2C12KO partiendo de una misma densidad celular. Además, al contar en distintas ocasiones el número de células en hemocitómetros se descubre que la viabilidad es mayor en células sanas ya que es más frecuente al contar encontrar células muertas, teñidas de azul de tripano, en las células mutadas que en las sanas.

La precisión del número de células en las curvas permite llegar a estas conclusiones. Sin embargo, al contar el número de células mediante un método manual con un hemocitómetro, hay que destacar que pueden existir ligeros márgenes de error y que al repetir varios días de las curvas de crecimiento se obtienen desviaciones leves en los resultados.

En las curvas de crecimiento se puede apreciar fácilmente la fase de latencia que incluiría el día 0 y el día 1, y también la fase exponencial que abarca desde el día 2 hasta el día 5. Sin embargo, la fase estacionaria donde el crecimiento se frena es más complicado de ubicar. Lo más probable es que corresponda a partir del día 6 pero para esta determinada curva se cambió el medio de

crecimiento en el día 5 y esto hace que las células tengan nuevos nutrientes, favoreciendo así el aumento de la población. Esto hace que la tendencia de las curvas de ambos tipos de células sea muy diferente. Cabe la posibilidad de que si no se llega a cambiar el medio las dos curvas tuviesen la misma tendencia y fuese más evidente la fase estacionaria.

En relación con la caracterización de las células, el único parámetro que se ha medido con un método tangible ha sido el alineamiento de las células. La importancia de este reside en que cuanto más alineadas se encuentren las células menos trabajo les costará fusionarse y forma fibras musculares. Por lo tanto, el alineamiento en células sanas fue mucho mayor que en las mutadas y, además, la presencia del tapizado de gelatina favorecía aún más el alineamiento.

El punto donde la alineación es mayor es justo antes de que empiecen a diferenciarse las células sanas que esto suele ocurrir a partir del 3 día de haber introducido el medio de diferenciación "D3H". En cambio, una vez que las células se fusionan el grado de alineamiento disminuye considerablemente, encontrándose las fibras es direcciones totalmente diferentes.

También, de forma visual se aprecian las diferencias morfológicas y de circularidad de los núcleos. Todas estas diferencias vienen provocadas por la inhibición del gen LMNA en las células C2C12 y se interpreta como que la pérdida de las proteínas laminas A y C de dicho gen provoca graves alteraciones en la estructura y función lo que conlleva a una menor estabilidad y mayor fragilidad en las células C2C12KO.

En referencia a la creación del "organoide" la intención era replicar los conocimientos de los experimentos previos en un cultivo que replicase al máximo las condiciones del tejido muscular esquelético donde se encuentran las células para conseguir resultados que pudiesen ser más fácilmente extrapolables a patologías como las laminopatías musculares. Además, las células eran encapsuladas por la red que la gelatina metacrilada formaba, creando así un biomaterial con células en el interior.

Se buscaba realizar el crecimiento y diferenciación de las células en suspensión en vez de adheridas a un sustrato como previamente se había realizado. Sin embargo, hubo varios obstáculos que dificultaron el proceso. La gelatina metacrilada gelifica a temperatura ambiente y es líquida a temperaturas más altas. Cuanto mayor es el grado de metacrilación, mayor es la capacidad de gelificar a mayores temperaturas y el objetivo es que fuese capaz de gelificar a 37ºC que es la temperatura a la que las células se conservan y prosperan.

La falta de suficiente porcentaje de metacrilación hacía que al incubar el "organoide" a 37ºC este en ocasiones pasase a estado líquido mezclándose con el medio "D10F" y diluyendo el grado de metacrilación.

Finalmente se acabo encontrando la metacrilación adecuada al introducir un agente entrecruzante y luz azul que favoreciese la formación de la red tridimensional capaz de encapsular las células y, de esta forma, conseguir que las células se cultivasen en suspensión.

Sin embargo, la diferenciación de las células no fue la correcta siendo menos eficiente que en los cultivos 2D. Por eso, si se repite el estudio con una gelatina metacrilada con mayor porcentaje de metacrilación las posibilidades de éxito serían mucho más altas. Además, hay estudios que abalan que la densidad celular que se empleó en los ensayos debería haber sido considerablemente más

elevada. Por lo tanto, mejorando estos dos factores las opciones de crear un “organoide” más estable que replique el tejido muscular y encapsule a las células C2C12 es mayor.

# Capítulo 7. CONCLUSIONES

## 7.1 Conclusiones del proyecto

La elaboración de este proyecto permite introducir y poner en contexto lo extremadamente nociva y agresiva que resultan las enfermedades de laminopatía, las cuales solo afectan a una ínfima parte de la población pero que aquellas personas que la sufren ven como sus vidas quedan condicionadas teniendo esperanzas de vida muy reducidas, necesitando ayuda de forma permanente y provocando dolor y sufrimiento en ellos y sus familiares.

Con el desarrollo de los ensayos de laboratorio se destaca la importancia de los modelos celulares para investigar acerca de enfermedades y acelerar el proceso de hallar curas o tratamientos al no tener que interactuar con seres humanos directamente, y así no tener que enfrentar cuestiones éticas o morales que dificultasen las investigaciones. En concreto, las líneas celulares de mioblastos de ratón son fáciles de manipular, crecen y se dividen rápidamente, son compatibles con biomateriales y cultivos 3D y presenta similitudes con el genoma humano lo cual las hace ideales para estudiar acerca de enfermedades musculares.

Las células que presentaban inhibido el gen LMNA permiten replicar las deficiencias y problemas que estas células causan en las laminopatías musculares. Las células C2C12 mutadas eran incapaces de diferenciarse correctamente lo que implica que existen varias alteraciones que impiden el funcionamiento adecuado del tejido muscular esquelético. Si se sigue profundizase en estos métodos y se consigue hallar alguna forma de inducir la diferenciación de las células mutadas, las cuales presentan graves problemas de estabilidad e integridad celular, cabe la posibilidad de que se pueda extrapolar la solución a laminopatías musculares en humanos.

Además, con la creación de “organoides” se pueden replicar las condiciones reales en las que se encuentran las células musculares en el tejido y que así cualquier avance o conclusión que se pueda sacar sea aún más fiable o que permita hacer un mejor estudio al replicar el tejido muscular esquelético.

Por último, hay que mencionar que el trabajo cumple satisfactoriamente con todos los objetivos planteados y que ha dado con el hallazgo de descubrimientos muy interesantes, como el mayor crecimiento y división en C2C12 sanas que en mutadas, planteando algunas hipótesis y líneas de investigación que podría ser probadas y de gran utilidad.

## 7.2 Conclusiones personales

La realización de este proyecto ha supuesto un verdadero reto y esfuerzo para mí. Con esto concluye mi etapa de estudiante de ingeniería biomédica y quería que en el trabajo se viesen plasmados algunos de los conocimientos que he ido aprendiendo a lo largo del grado.

En primer lugar, he aprendido ha como manejarme en un laboratorio, el cómo pipetear, hacer cálculos rápidos, observar y enfocar muestras al microscopio, adoptar las medidas de seguridad e

higiene adecuadas y mucho más. Con la parte teórica, me he nutrido de conocimientos acerca de las laminopatías y sobre todo de como citar correctamente, redactar y ser eficiente buscando información en artículos científicos.

Por último, quiero destacar que la parte que más me ha gustado ha sido la parte práctica de trabajar en el laboratorio. Esta me ha permitido darme cuenta de cómo es realmente la investigación, donde tú tienes un punto de partida y unos objetivos concretos y con el paso de las semanas vas viendo como todo se puede ir moldeando porque hallas algún descubrimiento que te dirige por otro camino diferente y debido a los resultados que vas obteniendo puedes llegar acabar haciendo una cuestión algo diferente a la planteada inicialmente. Esto nos pasó durante los ensayos de laboratorio y con el paso del tiempo veías como el proyecto iba cambiando y tomando forma adaptándose en todo momento a las novedades y hallazgos que iban apareciendo.

Personalmente, considero que este trabajo tiene mucho potencial y podría servir como base de futuras investigaciones más avanzadas.

# Capítulo 8. FUTURAS LÍNEAS DE TRABAJO

Con el desarrollo del proyecto y las semanas de trabajo en el laboratorio, surgen varias líneas de investigación que podrían llevar a importantes hallazgos.

En primer lugar, repetir la elaboración del "organoide" pero de una forma más correcta. Esto implica emplear un mayor porcentaje de metacrilación y una mayor densidad celular. También, asegurarse que la irradiación con luz azul este induciendo el entrecruzamiento de la gelatina metacrilada y que esta no se mezcle y diluya con el medio.

Esto permite tener un modelo más realista de tejido muscular y que se lleguen a conclusiones más sólidas al trabajar con las células C2C12. Además, la elaboración de este tipo de polímeros con células en su interior tiene muchas aplicaciones en el ámbito de la medicina regenerativa.

Otro apartado que sería muy interesante y debido a limitaciones no se pudo realizar es aplicar técnicas de bioimpresión. Una vez elaborado el "organoide" con las C2C12 encapsuladas se podrían imprimir en una bioimpresora 3D. Se tenía intención de crear hebras muy finas para buscar que hubiese un mayor alineamiento y que la diferenciación de las células fuese más veloz y efectiva. También, imprimir el "organoide" en un sustrato que se había creado (en SolidWorks) el cual tenía una serie de espacios alargados con un grosor de 4 mm para favorecer la formación de fibras musculares.

El fin último de la bioimpresión sería llegar a crear tejidos 3D personalizados lo cual podría llegar a cambiar la medicina, y que con el tiempo se pudiesen implantar tejidos 3D funcionales, creados en bioimpresoras, en seres humanos.

Realizar una citometría de flujo de las células C2C12 sanas y mutadas permite estudiar como son las distintas fases del ciclo celular. Esta información se podría relacionar con los resultados de la curva de crecimiento y así poder llegar a comprender mejor que sucede durante el ciclo celular para que la proliferación y crecimiento de las células sanas sea mucho mayor que para las mutadas ya que se comprobó que para una densidad inicial de 5.000 células por $cm^2$ para el día 5 de crecimiento las C2C12 sanas duplican en número a las mutadas.

Respecto a la citometría, hay dos posibles hipótesis u opciones que son las más probables. Una es que una gran parte de las células mutadas se encontrasen en las fases G0 y G1, donde las C2C12KO están aún lejos de dividirse y la otra posibilidad planteada consiste en que haya un porcentaje parecido de células en cada fase para ambos tipos de células y entonces se concluiría que las C2C12KO pasan por todas las fases igual que las sanas pero de una forma mucho más lenta y por lo tanto tardan más tiempo en completar el ciclo celular.

Por último, durante el transcurso de los ensayos de laboratorio en varias ocasiones se observaba a microscopios las células, y se tenía la intuición de que debido al relieve y bordes de las células parecía que las células sanas presentaban un mayor diámetro transversal que las células C2C12KO, es decir que eran de mayor grosor. Para poder medir este parámetro, es necesario un microscopio confocal (del cual se carecía durante la elaboración del proyecto) que permita obtener cortes ópticos en profundidad y así averiguar el grosor de ambos tipos de células.

Si se demostrase la hipótesis de que las células C2C12 sanas son más gruesas que las C2C12KO esto podría está directamente relacionado con la mutación que sufren las células musculares KO. Al ser células mucho más planas es muy posible que esto favoreciese a que el crecimiento sea más lento que en las células sanas y que influyese en que la diferenciación de estas células sea nula.

# Capítulo 9. ANEXOS

Archivo excell “DiagramaGantt”

Archivo excell “CurvasCrecimientoC2C12yKO”

# Capítulo 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yaou RB, Yun P, Dabaj I, Norato G, Donkervoort S, Xiong H, et al. International retrospective natural history study of LMNA-related congenital muscular dystrophy. Brain Commun. 1 de julio de 2021;3(3):fcab075.

2. Gómez Domínguez D. Estudio del potencial de la edición génica mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para el tratamiento de la distrofia muscular congénita asociada a LMNA [Internet] [doctoralThesis]. 2024 [citado 7 de febrero de 2025]. Disponible en: https://repositorio.uam.es/handle/10486/715098

3. Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bönnemann CG, Jeannet PY, Colomer J, Clarke NF, et al. De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. Ann Neurol. 2008;64(2):177-86.

4. Laminopatía: ¿en qué consiste esta enfermedad rara sin tratamiento? [Internet]. [citado 3 de febrero de 2025]. Disponible en: https://www.65ymas.com/salud/preguntas/laminopatia-en-que-consiste-rara-y-peligrosa-enfermedad_6401_102.html

5. Worman HJ, Fong LG, Muchir A, Young SG. Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. J Clin Invest. julio de 2009;119(7):1825-36.

6. Gómez-Domínguez D, Epifano C, De Miguel F, Castaño AG, Vilaplana-Martí B, Martín A, et al. Consequences of Lmna Exon 4 Mutations in Myoblast Function. Cells. 21 de mayo de 2020;9(5):1286.

7. Boudreau É, Labib S, Bertrand AT, Decostre V, Bolongo PM, Sylvius N, et al. Lamin A/C Mutants Disturb Sumo1 Localization and Sumoylation in Vitro and in Vivo. PLoS ONE. septiembre de 2012;7(9):1-9.

8. Méndez-López I. Laminopatías. Enfermedades de la lámina nuclear. Med Clínica. marzo de 2012;138(5):208-14.

9. atlas-celula-04-nucleo.pdf [Internet]. [citado 6 de febrero de 2025]. Disponible en: https://atlashistologia.webs7.uvigo.es/pdfs-descargas/atlas-celula-04-nucleo.pdf

10. La Taquilla Nuclear [Internet]. OpenLab Noticias. 2021 [citado 6 de febrero de 2025]. Disponible en: https://open-lab.com.mx/noticias/2021/01/12/la-taquilla-nuclear/

11. Snapshot [Internet]. [citado 6 de febrero de 2025]. Disponible en: https://apunty.com/doc/cap-11-docx-biologia-e-intro-a-la-biologia-celular

12. Ahn J, Jeong S, Jo I, Ha NC, Kang SM, Park BJ. Crystal structure of progeria mutant S143F lamin A/C reveals increased hydrophobicity driving nuclear deformation. Commun Biol [Internet]. 1 de diciembre de 2022 [citado 10 de febrero de 2025];5(1). Disponible en: https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselc&AN=edselc.2-52.0-85127293222&lang=es&site=eds-live&scope=site&authtype=sso&custid=s1136447

13. Vigouroux C, Bonne G. Laminopathies: One Gene, Two Proteins, Five Diseases.. En: Madame Curie Bioscience Database [Internet] [Internet]. Landes Bioscience; 2013 [citado 11 de febrero de 2025]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6151/

14. Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford. Causas, investigación y tratamientos farmacológicos [Internet]. [citado 11 de febrero de 2025]. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-educacion-quimica-78-pdf-S0187893X14700631

15. Raininko R, Gosky M, Padiath QS. LMNB1-Related Autosomal Dominant Leukodystrophy. En: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, editores. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 19 de febrero de 2025]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338165/

16. de Lucas-Collantes C, Pozo-Román J, Aparicio-López C, de Prada-Vicente I, Argente J. Lipodistrofia parcial adquirida (síndrome de Barraquer-Simons) y nefropatía IgA. Nefrología. 1 de septiembre de 2016;36(5):556-8.

17. Evangelisti C, Rusciano I, Mongiorgi S, Ramazzotti G, Lattanzi G, Manzoli L, et al. The wide and growing range of lamin B-related diseases: from laminopathies to cancer. Cell Mol Life Sci CMLS. 8 de febrero de 2022;79(2):126.

18. Rankin J, Ellard S. The laminopathies: a clinical review. Clin Genet. 2006;70(4):261-74.

19. Worman HJ. Nuclear lamins and laminopathies. J Pathol. 2012;226(2):316-25.

20. Zaremba-Czogalla M, Dubińska-Magiera M, Rzepecki R. Laminopathies: The molecular background of the disease and the prospects for its treatment. Cell Mol Biol Lett. 1 de marzo de 2011;16(1):114-48.

21. Quijano-Roy S, de la Banda MGG. Distrofias musculares congénitas. Rev Médica Clínica Las Condes. 1 de septiembre de 2018;29(5):530-43.

22. Orphanet: Distrofia muscular congénita por una mutación en el gen LMNA [Internet]. [citado 4 de marzo de 2025]. Disponible en: https://www.orpha.net/es/disease/detail/157973

23. Steele-Stallard HB, Pinton L, Sarcar S, Ozdemir T, Maffioletti SM, Zammit PS, et al. Modeling Skeletal Muscle Laminopathies Using Human Induced Pluripotent Stem Cells Carrying Pathogenic LMNA Mutations. Front Physiol. 15 de octubre de 2018;9:1332.

24. Bertrand AT, Brull A, Azibani F, Benarroch L https://orcid.org/0000-0003-2805-9170, Chikhaoui K, Stewart CL, et al. Lamin A/C Assembly Defects in LMNA-Congenital Muscular Dystrophy Is Responsible for the Increased Severity of the Disease Compared with Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy. Bertrand Anne T Brull Astrid Azibani Feriel Benarroch Louise Chikhaoui Khadija Stewart Colin Medalia Ohad Ben Yaou Rabah Bonne Gisè 2020 Lamin AC Assem Defects LMNA-Congenit Muscular Dystrophy Responsible Increased Sev Dis Comp Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Cells 94844-861. 2020;

25. The Progeria Research Foundation [Internet]. [citado 14 de marzo de 2025]. The FTI Drug. Disponible en: https://www.progeriaresearch.org/es/the-fti-drug/

26. Zokinvy (lonafarnib) for the Treatment of Progeria, USA [Internet]. Clinical Trials Arena. [citado 14 de marzo de 2025]. Disponible en: https://www.clinicaltrialsarena.com/projects/zokinvy-lonafarnib-for-the-treatment-of-progeria-usa/

27. Milan ANGS. Historia del desarrollo de la tecnología CRIPSR-Cas [Internet]. Fundacion Antama. 2019 [citado 15 de marzo de 2025]. Disponible en: https://fundacion-antama.org/historia-del-desarrollo-de-la-tecnologia-cripsr-cas/

28. Garrigues F. CRISPR: ¿Qué es y cómo funciona? [Internet]. Genotipia. 2023 [citado 15 de marzo de 2025]. Disponible en: https://genotipia.com/crispr-cas/

29. OpenAIRE - Explore [Internet]. [citado 17 de marzo de 2025]. a crispr cas9 zebrafish lamin a c mutant model of muscular laminopathy. Disponible en: https://explore.openaire.eu/search/publication?pid=10.1002%2Fdvdy.427

30. Lu JZ, Qiao ZB, Zhang L, Cao HX, Bai ZH, Qi YY, et al. Generation of a laminopathies-specific iPSC line EHTJUi005-A-3 with homozygous knockout of the LMNA gene by CRISPR/Cas9 technology. Stem Cell Res. 1 de octubre de 2021;56:102530.

31. http://www.upgrade.com.mx. ¿Que es la inmunofluorescencia? [Internet]. [citado 27 de marzo de 2025]. Disponible en: https://laboratorioluevano.com/blog/que-es-la-inmunofluorescencia

32. Definición de prueba inmunohistoquímica - Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. 2011 [citado 30 de marzo de 2025]. Disponible en: https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/prueba-inmunohistoquimica