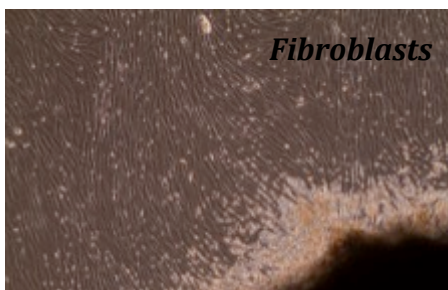
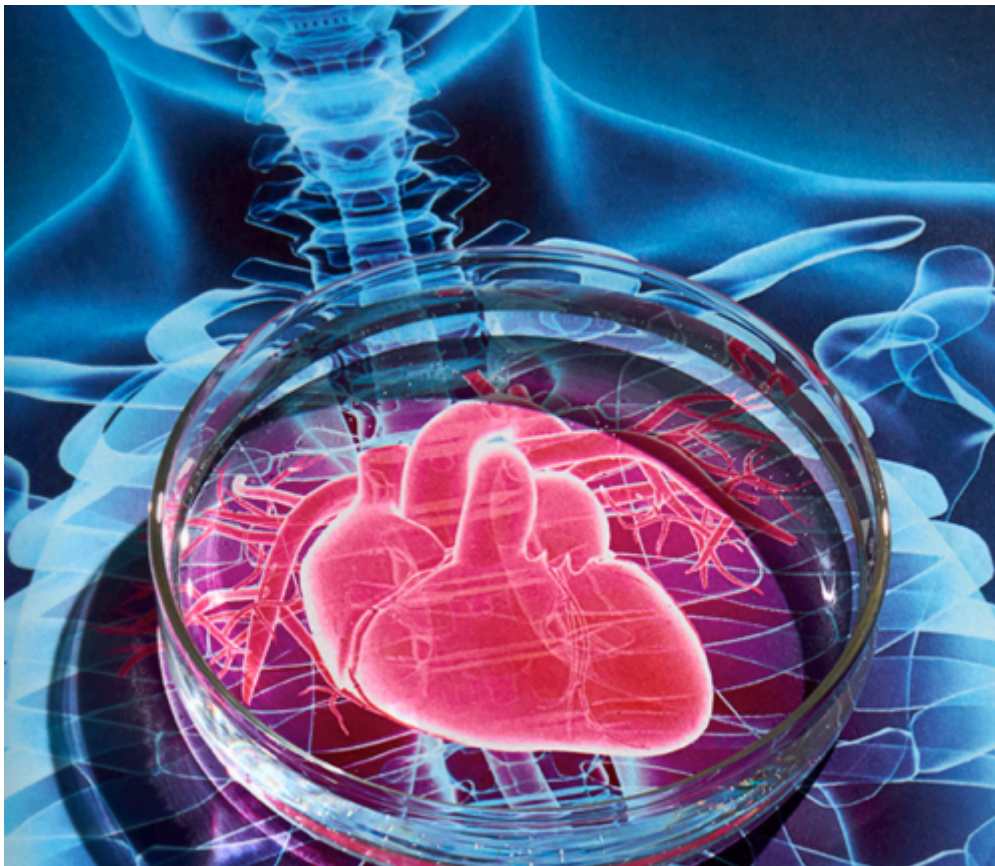
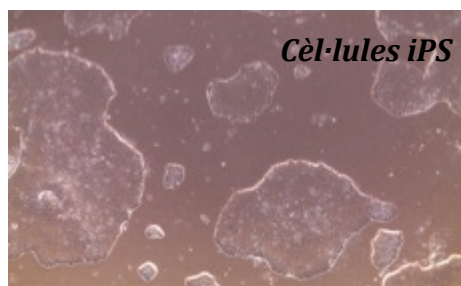


El cor en una placa

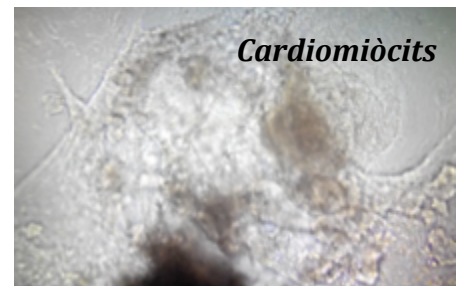
Obtenció de cardiomiòcits pacient-específics a partir de fibroblasts dèrmics



Fibroblasts



Cèl·lules iPS



Cardiomiòcits

Clàudia Brugada Iglesias

2n BAT A

Tutora: Margarita Custey
Departament de Biologia i Geologia

Institut Santiago Sobrequés

2 de novembre de 2016

ÍNDEX

Part teòrica

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 Metodologia	1
1.2 Motivació	1
1.3 Hipòtesi	2
1.4 Objectius	2
2. LA CÈL·LULA	3
2.1 Biologia bàsica de les cèl·lules de mamífer	3
3. LES CÈL·LULES MARE	6
3.1 Què són?	6
3.2 Descobriment	6
3.3 Tipus de cèl·lules mare	11
3.4 Estratègies per obtenir cèl·lules mare a partir de cèl·lules no pluripotents	14
3.5 Aplicacions de les cèl·lules mare	15
3.6 Tractaments amb cèl·lules mare	16
4. LES CÈL·LULES IPS	27
4.1 Què són?	27
4.2 Descobriment	29
4.3 Estratègies de reprogramació	30
4.3.1 Reprogramació somàtica mitjançant factors de transcripció coneguts	30
4.3.1.1 Sistemes virals	31
4.3.1.2 Sistemes no virals	32
4.3.2 Reprogramació mitjançant molècules petites (CiPS)	34
4.3.3 Tipus de cèl·lules reprogramables	35
4.3.4 Reprogramació a l'interior d'un ésser viu	36
4.4 Utilització de les cèl·lules iPS com a model de malaltia	37
4.5 Avantatges i inconvenients de les cèl·lules iPS	38

5. EL COR	41
5.1 El sistema elèctric del cor	43
5.2 Cardiomiòcits	43

Part pràctica

6. CARACTERÍSTIQUES IMPORTANTS DE LA SALA DE CULTIUS	45
7. OBTENCIÓ DE CARDIOMIÒCITS PACIENT-ESPECÍFICS	47
7.1 Obtenció de la mostra de pell	47
7.2 Aïllament dels fibroblasts	48
7.2.1 Passatge dels fibroblasts obtinguts de la mostra de pell	51
7.2.2 Congelació dels fibroblasts obtinguts de la mostra de pell	54
7.3 Reprogramació dels fibroblasts obtinguts de la mostra de pell	56
7.3.1 Aïllament de les colònies de cèl·lules iPS	60
7.3.2 Passatge dels clons de cèl·lules iPS	61
7.3.3 Congelació de cèl·lules iPS	63
7.3.4 Descongelació de cèl·lules iPS	63
7.4 Caracterització de les cèl·lules iPS	64
7.4.1 Bases teòriques de les tècniques utilitzades per la caracterització de les cèl·lules iPS	64
7.4.1.1 Transcripció inversa	65
7.4.1.2 La PCR	65
7.4.1.3 La PCR quantitativa	66
7.4.2 Aplicació pràctica	70
7.4.2.1 Extracció de l'RNA	70
7.4.2.2 Quantificació amb Nanodrop	71
7.4.2.3 Transcripció inversa	73
7.4.2.4 qPCR	74
7.5 Diferenciació de les cèl·lules iPS a cardiomiòcits	78
7.6 Caracterització dels cardiomiòcits	82
8. CONCLUSIONS	85
8.1 Valoració personal	86
9. AGRAÏMENTS	87
10. FONTS D'INFORMACIÓ	88
10.1 Pàgines web	88
10.2 Vídeos	90
10.3 Figures	90

10.4 Articles	91
10.5 Notícies	93
10.6 Altres	94

Everything is theoretically impossible,
until it is done.

Robert A. Heinlein

1. Introducció

Aquest treball té dues parts clarament diferenciades: la part teòrica i la pràctica. En la primera s'expliquen els fonaments teòrics de la cèl·lula, les cèl·lules mare, les cèl·lules iPS, el cor i els cardiomiòcits. En la segona es descriuen els protocols i resultats obtinguts al laboratori.

1.1 Metodologia

La part teòrica l'he escrita basant-me sobretot en articles d'investigació, notícies i webs científiques. En canvi, la part pràctica, que és la més complexa, l'he portada a terme al Centre de Genètica Cardiovascular de Girona durant els mesos de maig, juny i juliol de 2016.

1.2 Motivació

El principal motiu pel qual vaig escollir aquest tema va ser per la curiositat i l'interès que tinc cap a les cèl·lules mare. Em van cridar l'atenció des del primer moment que vaig sentir a parlar d'elles, aquestes cèl·lules no diferenciades.

Però he volgut aprofundir més i m'he endinsat en aquest món de les cèl·lules mare induïdes pluripotents, també anomenades cèl·lules iPS. Les cèl·lules iPS han revolucionat el món científic, precisament per les característiques que les defineixen. En saber que estudiaven aquestes cèl·lules en un laboratori proper i que tenia una oportunitat per accedir-hi, ja no vaig tenir cap més dubte. És el tema cabdal del meu treball i en el que es basa la part pràctica del mateix.

Ja posada dins el món de les cèl·lules iPS he concretat més i he volgut arribar fins al final del procés, la diferenciació d'aquestes cèl·lules cap a cardiomiòcits.

El cor és el motor del nostre cos i els cardiomiòcits els responsables de la seva contracció. La generació de cardiomiòcits al laboratori representa un pas gegant cap a l'estudi de les malalties cardiovasculars.

1.3 Hipòtesi

La hipòtesi principal que he plantejat és: **“Els cardiomiòcits creats artificialment al laboratori tenen les característiques i les propietats dels cardiomiòcits que trobem al cor i, per tant, es poden utilitzar per estudiar malalties cardiovasculars”**.

Per comprovar aquesta hipòtesi, la part pràctica del treball ha consistit en l'obtenció de cardiomiòcits mitjançant la diferenciació de cèl·lules iPS generades a partir de fibroblasts dèrmics.

1.4 Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball de recerca és dual. Per una banda, l'objectiu a nivell teòric és ampliar els meus coneixements per tal d'obtenir una visió global però detallada sobre les cèl·lules mare. Els objectius específics són:

- Adquirir coneixements detallats sobre les característiques de les cèl·lules mare i sobre les seves aplicacions terapèutiques.
- Conèixer els diferents mètodes de generació de cèl·lules iPS i la utilitat d'aquestes cèl·lules en els camps de la medicina i la recerca.
- Aprofundir en l'ús de les cèl·lules iPS com a model de malaltia en general, i en concret, de malalties cardiovasculars.

Per l'altra banda, l'objectiu a nivell pràctic és aprendre i visualitzar les diferents tècniques de laboratori necessàries per l'obtenció de cardiomiòcits derivats de cèl·lules iPS obtingudes a partir d'una biòpsia de pell d'un individu sa. Els objectius específics són:

- Aprendre com aïllar fibroblasts dèrmics d'una biòpsia de pell i com reprogramar-los a cèl·lules iPS.
- Investigar l'expressió de gens característics de cèl·lules iPS en les cèl·lules reprogramades.
- Aprendre com diferenciar les cèl·lules iPS a cardiomiòcits.
- Estudiar l'expressió de gens característics de cardiomiòcits en les cèl·lules iPS diferenciades.

Part teòrica

2. La cèl·lula

El nostre cos està format per bilions de cèl·lules i cadascuna d'elles té només una funció determinada. Un tipus cel·lular és cadascuna de les categories en les quals es poden classificar les cèl·lules d'un organisme pluricel·lular. Aproximadament, l'organisme humà es troba integrat per 210 tipus cel·lulars diferents.

Les cèl·lules especialitzades en una mateixa funció s'agrupen per formar teixits, i diferents teixits que han de desenvolupar una funció comuna s'organitzen per formar els òrgans.

2.1 Biologia bàsica de les cèl·lules de mamífer

Les cèl·lules presenten una estructura força complexa. Cada tipus cel·lular és diferent i presenta característiques particulars segons la funció que hagi de dur a terme. Malgrat això, en qualsevol cèl·lula de mamífer distingim les parts següents:

-La membrana plasmàtica: És la capa que envolta i protegeix la cèl·lula. És una membrana semipermeable que pot ser travessada per diverses substàncies com ara l'aigua i els nutrients.

-El citoplasma: És el líquid contingut dins la membrana. Hi trobem el nucli i els diferents orgànuls de la cèl·lula.

-El citoesquelet: Actua com a esquelet de la cèl·lula proporcionant suport intern, organitza les estructures internes i està implicat en fenòmens de transport i la divisió cel·lular.

-El nucli: És l'encarregat de dirigir les funcions de la cèl·lula.

Dins el nucli hi trobem la cromatina, una massa granulosa formada principalment per proteïnes i DNA. Es troba dispersa pel nucli durant el

temps que la cèl·lula no es troba en fase de replicació. Quan la cèl·lula inicia la seva replicació la cromatina es va enrotllant i apareixen els cromosomes, unes estructures cabdals en la transmissió de la informació genètica.

-El nucleoplasma: És un líquid incolor contingut dins la membrana nuclear. Està format per aigua i nombroses biomolècules dissoltes. En el nucleoplasma es troben la cromatina, els cromosomes en el moment de la replicació i un orgànul anomenat nuclèol.

-Els orgànuls cel·lulars: Són estructures que s'encarreguen de dur a terme determinades funcions cel·lulars.

- Nuclèol: Sintetitza el material que més endavant formarà part dels ribosomes.
- Mitocondris: Duen a terme la respiració cel·lular.
- Ribosomes: S'encarreguen de la síntesi de proteïnes.
- Reticle endoplasmàtic: Té la funció d'emmagatzemar i transportar les proteïnes que s'han sintetitzat als ribosomes.
- Aparell de Golgi: Acumula les substàncies que provenen del reticle endoplasmàtic i s'encarrega de segregar-les a l'exterior de la cèl·lula mitjançant petites vesícules.
- Vacúols: Emmagatzemen substàncies de reserva o de rebuig. Intervenien en la nutrició cel·lular i en la regulació de la quantitat d'aigua de la cèl·lula.
- Lisosomes: Contenen substàncies amb funció digestiva.
- Centrosoma: Centre organitzador de microtúbuls. Juguen un paper fonamental durant el cicle mitòtic. Són necessaris per la segregació dels cromosomes entre les dues cèl·lules filles.

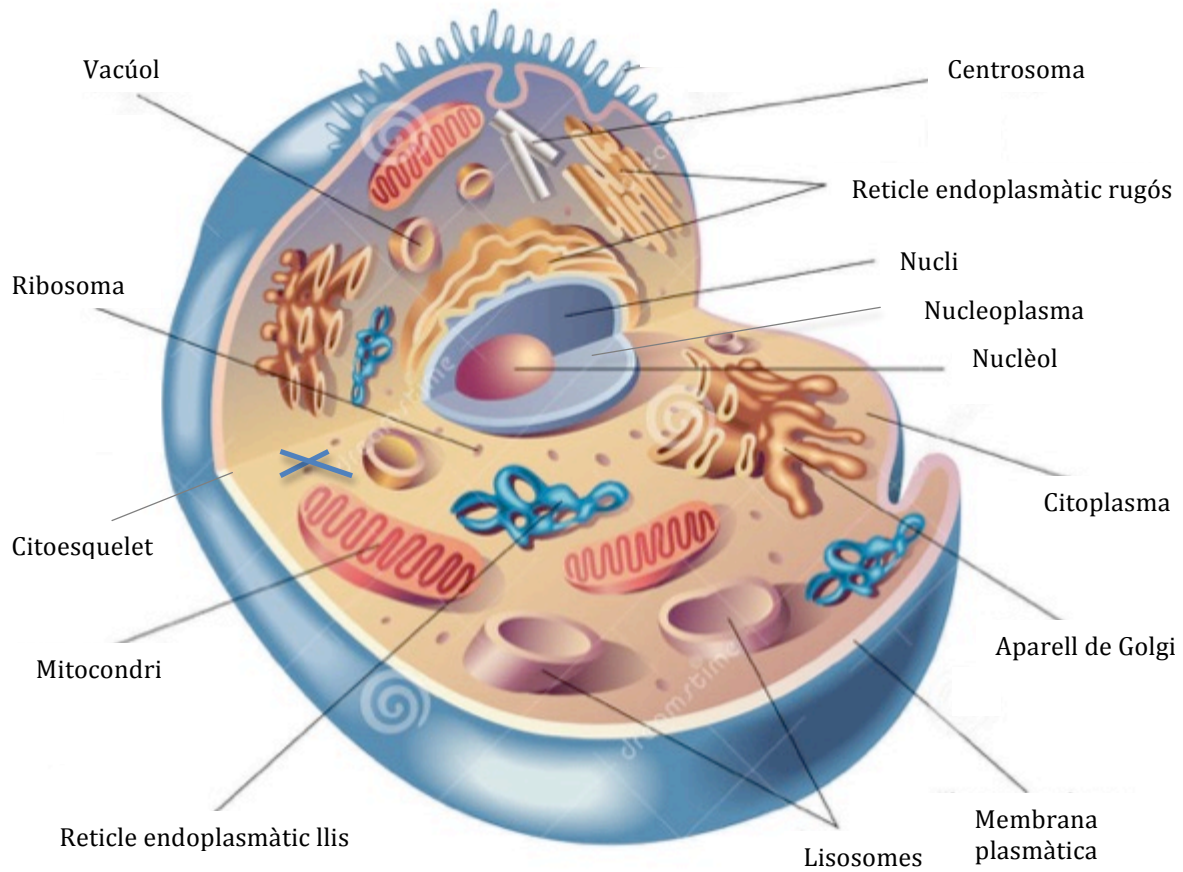


Fig.1 Parts d'una cèl·lula de mamífer

El diagrama mostra els diferents components d'una cèl·lula de mamífer.

3. Les cèl·lules mare

3.1 Què són?

Als embrions, en alguns teixits fetals i en teixits adults hi ha unes cèl·lules úniques indiferenciades que tenen l'habilitat de diferenciar-se en altres tipus cel·lulars propis de les 3 capes germinals¹: les cèl·lules mare.

Les cèl·lules mare són les principals proveïdores de noves cèl·lules en teixits adults, i van donar lloc a tots els òrgans i teixits presents en el nostre cos durant l'embriogènesi.

Les cèl·lules mare presenten dues propietats que les diferencien de la resta de cèl·lules: a) tenen la capacitat d'autorenovació, la qual les permet originar còpies d'elles mateixes indefinidament, i b) poden produir noves cèl·lules que pertanyin a qualsevol teixit del cos humà. Aquesta darrera propietat, anomenada pluripotència, fa que siguin capaces de reparar un teixit substituint les cèl·lules danyades per cèl·lules sanes. Les cèl·lules mare són molt importants per la nostra salut precisament per aquesta darrera funció.

3.2 Descobriment

El terme "cèl·lula mare" es va utilitzar per primera vegada l'any 1868 quan el biòleg alemany Ernst Haeckel va utilitzar la paraula "stammzelle" per descriure l'organisme unicel·lular que va actuar com a cèl·lula ancestre de tots els éssers vius en la història. Nou anys després, el mateix investigador va proposar utilitzar la mateixa paraula per descriure l'òvul fecundat que es converteix en totes les cèl·lules d'un organisme. Anys després, altres investigadors feien servir el mot cèl·lula mare en embriologia. En particular, cal citar a Theodor Boveri, perquè ja al voltant de l'any 1900 va descriure la capacitat de les cèl·lules mare per auto-

¹ Capes germinals: Cadascuna de les tres capes de cèl·lules primordials (ectoderma, mesoderma i endoderma) que es formen en les primeres fases del desenvolupament embrionari. Donen lloc als teixits i òrgans.

renovar-se i diferenciar-se en altres tipus cel·lulars, que són les dues característiques principals que defineixen les cèl·lules mare encara avui en dia.

Durant el mateix període, el terme “cèl·lula mare” també es va adoptar en el camp de la hematopoesi². El 1896, Artur Pappenheim va utilitzar el terme “cèl·lula mare” per descriure la cèl·lula precursora capaç de donar lloc a glòbuls vermells i blancs.

Malgrat que feia molts anys que es s'utilitzava el terme, no va ser fins la dècada del 1960 quan es va poder demostrar l'existència de les cèl·lules mare. Ernest McCulloch i James Till van fer uns experiments amb ratolins per mesurar la sensibilitat a la radiació de les cèl·lules de la medul·la òssia. Primer van irradiar els ratolins amb una dosi de rajos X que els mataria en 30 dies si no rebien un trasplantament de cèl·lules sanes. Després van obtenir medul·la òssia sana d'altres ratolins, la van dividir en porcions, i van exposar cada una a diferent intensitat de radiació. La dosi més gran va matar tantes cèl·lules sanes que van perdre la possibilitat de salvar els ratolins, i la dosi més petita va deixar moltes de les cèl·lules intactes. Finalment van injectar les diferents mostres de medul·la sana irradiades dins els ratolins i van dur a terme l'autòpsia dels ratolins 10 dies després del trasplantament. Van poder observar nòduls a la melsa³ dels ratolins que contenien cèl·lules en divisió, algunes de les quals s'estaven diferenciant en els 3 principals tipus de cèl·lules de la sang: glòbuls blancs, glòbuls vermells i plaquetes. A més, el nombre de nòduls era directament proporcional al nombre de cèl·lules de la medul·la òssia que s'havien rebut. Amb aquests experiments els investigadors van definir dues característiques importants de les cèl·lules mare sanguínies: poden renovar-se a si mateixes i poden produir cèl·lules que donen origen a tots els diferents tipus de cèl·lules sanguínies.

Després d'aquest primer estudi, van anar apareixent diferents treballs que apuntaven a l'existència de cèl·lules mare en diferents teixits. Per exemple, durant el mateix any 1960 es va publicar el primer informe d'investigació que indicava

² Hematopoesi: Procés de formació i maduració de les cèl·lules sanguínies presents a la sang a partir d'una cèl·lula mare hematopoètica pluripotencial.

³ Melsa: És un òrgan de l'abdomen, la funció del qual és la destrucció d'eritròcits vells i servir de reservori de sang.

que les cèl·lules adjacents a lesions cerebrals poden generar noves neurones, neuroblasts⁴ i cèl·lules glials⁵.

Durant la mateixa època, es van començar a utilitzar trasplantaments de medul·la òssia per tractar malalties de la sang. En concret, el 1956, Edward Donnall Thomas va dur a terme el primer trasplantament de medul·la òssia en pacients emparentats a Nova York. El pacient va ser tractat amb medul·la òssia del seu germà bessó. Van veure que la infusió intravenosa de cèl·lules de la medul·la òssia del donant permetia repoblar la medul·la òssia del pacient receptor i produir noves cèl·lules sanguínies. Aquest trasplantament va demostrar que és possible trasplantar el sistema limfohematopoètic d'una persona a una altra només transferint un número limitat de cèl·lules de la medul·la. Això va estimular la investigació per identificar les cèl·lules mare hematopoètiques i els factors que controlen el seu creixement i el seu desenvolupament.

Uns anys més tard, després de nombrosos fracassos en trasplantaments entre pacients no emparentats, el 1973 es va dur a terme el primer trasplantament exitós de medul·la òssia en pacients de diferents famílies. Un pacient de 5 anys de Nova York es va tractar amb injeccions de medul·la òssia d'un donant de Dinamarca. Aquest trasplantament va demostrar la importància d'una correcta selecció de donants i receptors.

El 1978 es va descobrir que la sang del cordó umbilical humà contenia cèl·lules mare hematopoètiques (sanguínies). La sang del cordó és fàcil de recollir i no comporta cap risc ni per la mare ni pel nadó. Aquesta troballa és rellevant pel fet que representa una font més de cèl·lules mare i, per tant, una possible opció per curar certes malalties de la sang.

⁴ Neuroblasts: Cèl·lules en divisió que esdevindran neurones.

⁵ Cèl·lules glials: Juntament amb les neurones, són els dos tipus diferents de cèl·lules que formen el sistema nerviós. Aquestes cèl·lules donen suport i protecció a les neurones, fent de cola d'unió entre aquestes.

No va ser fins uns anys més tard que es va començar a investigar amb cèl·lules mare embrionàries. Concretament l'any 1981 es va aconseguir aïllar, per primera vegada, cèl·lules mare embrionàries a partir de la massa cel·lular interna d'un blastocist⁶ de ratolí i es van cultivar *in vitro*. El mateix any es va demostrar que les cèl·lules aïllades eren capaces de diferenciar-se en cèl·lules de les tres capes germinals, fet que confirmava la seva pluripotencialitat.

Al cap d'uns anys, el 1989, es va desenvolupar el diagnòstic genètic preimplantacional, un mètode en el qual s'extreu, d'un embrió fertilitzat *in vitro*, una sola cèl·lula mare i s'analitzen les alteracions genètiques que puguin donar lloc a malalties hereditàries.

Al mateix any, Pera et al., deriva una línia clonal de cèl·lules humanes embrionals de carcinoma⁷ que produeix teixits de les 3 capes germinals. El seu potencial de diferenciar-se espontàniament *in vitro* és limitat.

Cinc anys més tard, el 1994, s'observen blastocists humans, creats *in vitro*, donats per a la recerca. La massa cel·lular interna és mantinguda en cultiu i es poden veure trofoblasts⁸ a la perifèria i cèl·lules semblants a les embrionàries al centre. Les cèl·lules tenen tots els cromosomes i una morfologia semblant a la de la cèl·lula mare, tot i que algunes regions es diferencien en fibroblasts. El problema que tenien aquestes cèl·lules era que no es podien mantenir gaire temps en cultiu i no s'expandien gaire.

L'any següent, científics de la Universitat de Wisconsin, van derivar les primeres cèl·lules mare embrionàries de primats no humans. Era la primera vegada que s'obtenien cèl·lules mare d'un animal no-rosegador.

El 1997, Dominique Bonnet i John Dick de Canadà, descobreixen que la leucèmia prové d'una subpoblació de les mateixes cèl·lules mare que creen les cèl·lules sanguínies. És un dels primers estudis que va demostrar que el càncer pot provenir

⁶ Blastocist: És una estructura de 200-300 cèl·lules que es genera 5-6 dies després de la fecundació.

⁷ Carcinoma: És una forma de càncer amb origen a les cèl·lules de tipus epitelial o glandular.

⁸ Trofoblasts: És considerat el primer dels annexos embrionaris. Allibera una hormona que manté els nivells de progesterona, sostenint així la gestació.

de les cèl·lules mare descontrolades. D'aquí neix el concepte de cèl·lules mare cancerígenes.

Un any després, científics de la Universitat de Wisconsin, van aïllar i fer créixer les primeres cèl·lules mare d'embrions humans. Els embrions utilitzats havien estat creats *in vitro*. Les cèl·lules poden ser cultivades durant molt de temps i mantenen el seu cariotip⁹ normal i una alta activitat de la telomerasa¹⁰. Algunes línies cel·lulars formen teratomes en ser injectades en ratolins. Aquests teratomes inclouen cèl·lules de les 3 línies germinals, demostrant la pluripotencialitat de les cèl·lules mare embrionàries aïllades.

Fa 10 anys, el 2006, Shinya Yamanaka va revolucionar el món de les cèl·lules mare quan va reprogramar cèl·lules adultes per crear les cèl·lules iPS. Aquest apartat es desenvoluparà en profunditat més endavant (apartat 4.2).

El 2007, Anthony Atala va descobrir un nou tipus de cèl·lula mare aïllat del líquid amniòtic. Es va demostrar que les cèl·lules provenien del fetus, que eren pluripotents i que es podien fer créixer al laboratori durant molt de temps. Aquestes cèl·lules representen una possible via alternativa que no produeix la controvèrsia de les cèl·lules mare embrionàries.

El 2012, a partir de les cèl·lules mare embrionàries, es va trobar un tractament efectiu de la ceguesa. Es van fer implants de cèl·lules epitelials del pigment retinal a partir de cèl·lules mare embrionàries.

Fa dos anys, Charles Vacanti i Haruko Obokata, van anunciar un revolucionari descobriment: qualsevol cèl·lula pot ser portada a l'estat preembrionari.

⁹ Cariotip: És un esquema dels cromosomes d'una cèl·lula ordenats d'acord amb la seva morfologia i mida.

¹⁰ Telomerasa: És un enzim que allarga les puntes dels cromosomes (anomenats telòmers). Els telòmers contenen DNA condensat que proporciona estabilitat als cromosomes.

3.3 Tipus de cèl·lules mare

Les cèl·lules mare es poden classificar segons la seva potencialitat, és a dir, la seva capacitat de diferenciació cel·lular:

-Totipotents: Poden donar lloc a tots els tipus de cèl·lules del cos sense excepció, tenint en compte també els teixits extraembrionaris (placenta i cori¹¹). Podrien desenvolupar un ésser humà sa i complet. Les úniques cèl·lules totipotents són les que es troben en el zigot durant els 2-3 primers dies després de la unió d'un òvul i un espermatozoide.

-Pluripotents: Poden originar tots els tipus de cèl·lules del cos excepte les totipotents i les extraembrionàries. Tenen la capacitat de donar lloc a tots els òrgans i teixits del cos durant el desenvolupament humà.

-Multipotents: Poden esdevenir únicament alguns tipus cel·lulars similars. Un exemple són les cèl·lules hematopoètiques de la medul·la òssia, que poden originar totes les cèl·lules que formen la sang, però no neurones, cardiomiòcits o qualsevol altre tipus de cèl·lula no-sanguínia.

-Oligopotents: Poden originar pocs tipus de cèl·lules. Un exemple són les cèl·lules limfoides.

-Unipotents: Només poden donar lloc a un tipus de cèl·lula amb capacitat d'autorenovar-se. Com per exemple les cèl·lules de la pell.

¹¹ Cori: És una de les membranes que existeix durant la gestació entre el fetus en desenvolupament i la seva mare.

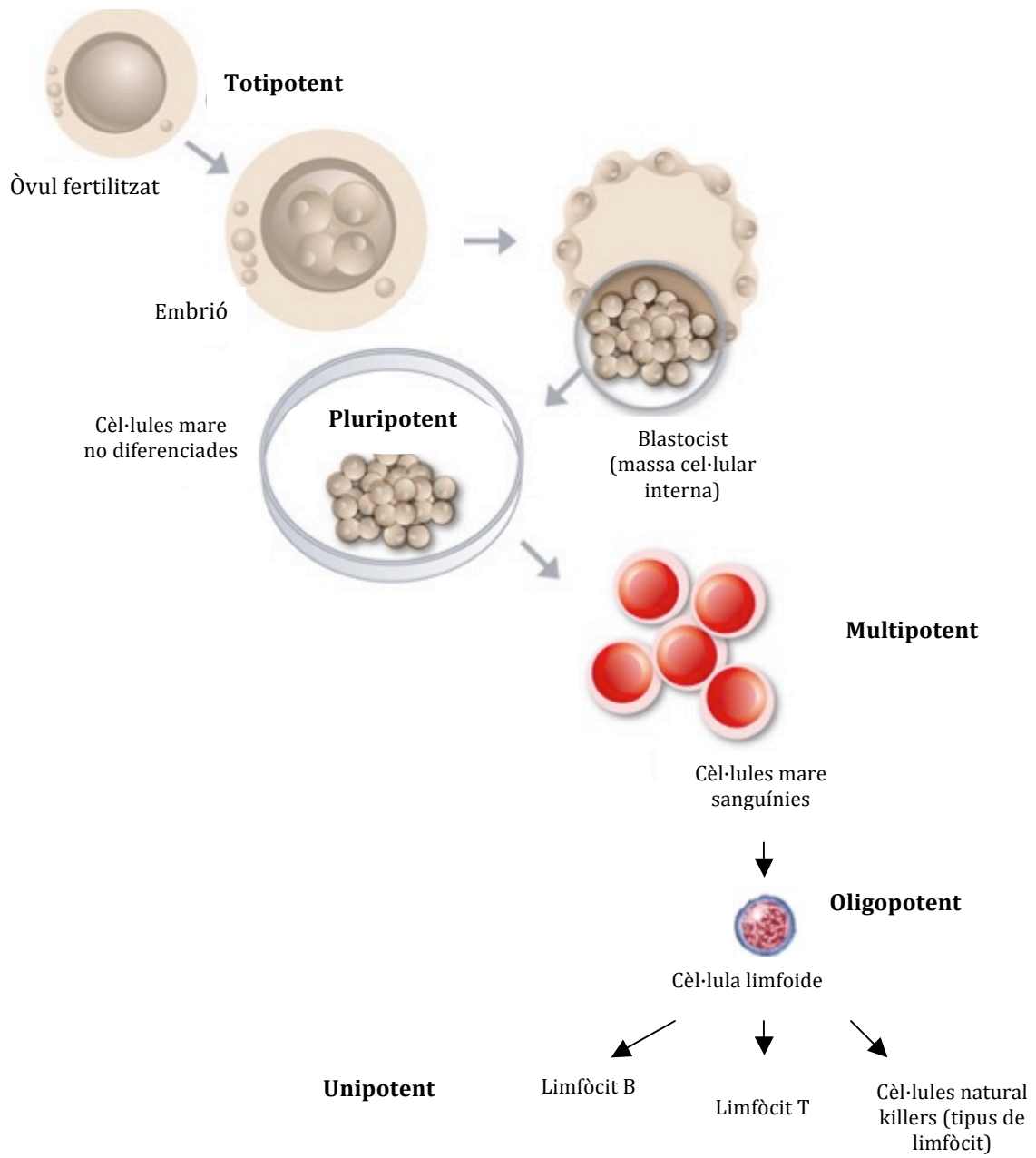


Fig. 2 Jerarquia de cèl·lules mare

En aquest diagrama podem veure els diferents tipus de cèl·lules mare que trobem: totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent i unipotent.

Les cèl·lules mare també es poden classificar segons el seu origen:

-Embrionàries: Aquests tipus de cèl·lules mare es troben a l'embrió als 4-5 dies posteriors a la fecundació, quan ja ha passat l'etapa de totipotencialitat. Per tant, són cèl·lules pluripotents. Tenen el potencial de transformar-se en qualsevol cèl·lula o teixit del cos. En l'àmbit de la recerca, aquestes cèl·lules s'obtenen de fetus avortats o d'embrions donats per les parelles sotmeses a cicles de fecundació *in vitro*, que ja no necessiten utilitzar-los amb finalitat reproductiva. La recerca amb cèl·lules mare embrionàries conté un component ètic important. En molts casos es tracta d'embrions congelats que han de ser, per tant, descongelats i cultivats abans d'utilitzar-los per a la investigació. Això implica la destrucció d'un embrió. El que es pot fer és extreure una o dues cèl·lules de l'embrió mitjançant la tècnica anomenada biòpsia embrionària (Fig. 3). L'embrió no es destrueix però, a causa de la manipulació, pot afectar la seva capacitat d'evolució.



Fig. 3 Extracció de cèl·lules d'un l'embrió

En aquesta figura observem una petita agulla (a la dreta) que s'insereix dins l'embrió per extreure'n cèl·lules mare embrionàries.

-Cordó umbilical: Es poden aïllar de la sang de la placenta i el cordó umbilical després del naixement. La sang del cordó umbilical conté cèl·lules mare hematopoètiques, semblants a les que trobem a la medul·la òssia, que tenen la capacitat de generar glòbuls vermells i cèl·lules del sistema immunitari. Les cèl·lules mare de cordó umbilical són generalment usades per tractar trastorns en la sang i en el sistema immunitari, com per exemple, la leucèmia o l'anèmia.

-Adultes: Les cèl·lules mare adultes es troben entre cèl·lules diferenciades d'un teixit específic i normalment són multipotents. La seva principal funció és mantenir i reparar el teixit al qual pertanyen. L'exemple més clar són les cèl·lules mare sanguínies, que poden originar eritròcits, leucòcits i plaquetes.

3.4 Estratègies per obtenir cèl·lules mare a partir de cèl·lules no pluripotents

Hi ha diferents maneres d'obtenir cèl·lules mare al laboratori. Són estratègies importants que convé mencionar ja que, com he anat recalcant, les cèl·lules mare tenen unes propietats molt eficaces per ajudar-nos de diverses maneres.

A continuació s'exposen les maneres d'obtenir cèl·lules mare a partir de cèl·lules que no presenten la propietat de la pluripotència.

-Transferència nuclear somàtica: Consisteix en la substitució del nucli d'un òvul per un de procedent d'una cèl·lula somàtica d'un individu adult. La cèl·lula creada es divideix i es forma un blastocist del qual se'n poden extreure cèl·lules pluripotents que posseeixen la dotació genètica de la cèl·lula somàtica. Aquest mètode és el que es va utilitzar per crear l'ovella Dolly l'any 1996.

En humans, aquesta tècnica està només acceptada amb finalitats d'investigació. S'ha observat que es necessiten un gran nombre de transferències per arribar a obtenir una cèl·lula somàtica pluripotent. Això implica problemes ètics ja que s'utilitzen òvuls humans.

-La fusió cel·lular: És el fenomen biològic en què dues cèl·lules fusionen les seves membranes i donen com a resultat una única cèl·lula amb un sol nucli. Per generar cèl·lules mare es fusionen una cèl·lula somàtica (normalment provinent de pell) i una cèl·lula mare embrionària. Per tal d'aconseguir la fusió de les membranes, les cèl·lules s'exposen a un agent químic. La cèl·lula híbrida obtinguda és pluripotent i presenta el nucli reprogramat. El principal inconvenient és que aquestes cèl·lules obtingudes són tetraploides, és a dir, presenten el doble de cromosomes dels que haurien de tenir. És cert que es comporten d'una manera molt similar a les cèl·lules mare embrionàries però la tetraploidia en limita el seu ús. En presentar aquesta característica, el seu potencial terapèutic és pràcticament nul, per la qual cosa es podrien utilitzar per experimentació biomèdica però no per teràpia cel·lular.

-Partenogènesi: És el procés reproductiu mitjançant el qual s'estimula el desenvolupament d'un embrió a partir d'un òvul no fecundat per un

espermatozoide. Quan aquesta tècnica es fa servir per investigació, es destrueix l'embrió quan aquest ha arribat a la fase de blastocist i s'agafen, de la massa cel·lular interna, les cèl·lules mare embrionàries per tal de cultivar-les al laboratori.

-Induïdes pluripotents: Les cèl·lules mare induïdes pluripotents, o cèl·lules iPS (*induced pluripotent stem cells*) són un tipus de cèl·lules mare que s'obtenen artificialment al laboratori. Bàsicament s'obtenen introduint 4 factors de pluripotència dins una cèl·lula somàtica. Les seves característiques i aplicacions es descriuen més endavant (apartat 4).

3.5 Aplicacions de les cèl·lules mare

S'han descrit diverses aplicacions per les cèl·lules mare. Algunes d'elles ja s'estan utilitzant actualment i d'altres es proposen per al futur:

-Investigació dels mecanismes bàsics que donen lloc a malalties. Les cèl·lules mare permeten obtenir models cel·lulars específics d'una malaltia. Això facilita l'estudi del comportament d'aquestes cèl·lules pròpies de teixits dels que és difícil obtenir mostres (per exemple del cor).

-Ús en teràpies cel·lulars. Consisteix en introduir cèl·lules generades fora de l'organisme cap a teixits danyats o alterats amb l'objectiu de curar la malaltia que presenta el pacient.

-Reparació de teixits i òrgans. Les cèl·lules mare adultes són presents en la majoria dels teixits d'un individu adult i s'encarreguen de la renovació cel·lular i de la regeneració del teixit en cas de dany. Aquestes cèl·lules es poden cultivar *in vitro* indefinidament i es poden utilitzar per la reparació de teixits danyats. També s'està fent recerca en la creació d'òrgans.

-Medicina personalitzada. Avui en dia és possible generar cèl·lules mare a partir de biòpsies de pacients. Es poden estudiar les cèl·lules de pacients que tinguin una mutació que causi una malaltia en concret o de pacients que tinguin una malaltia

però que no s'hi hagi identificat cap mutació causal. En ambdós casos, els estudis poden proporcionar informació clau per trobar la cura o un tractament per la seva malaltia.

3.6 Tractaments amb cèl·lules mare

A l'hora de considerar teràpies amb cèl·lules mare s'ha de ser molt prudent, ja que encara es desconeixen molts dels factors implicats en els processos de proliferació i diferenciació de les cèl·lules mare adultes.

Fa relativament poc que s'està experimentant amb les cèl·lules mare però, tot i així, ja es comencen a plantejar alguns tractaments aplicables. Actualment només n'existeixen 3 que estan validats com a segurs i efectius.

a) Utilització de cèl·lules mare en malalties de la sang

Actualment el tractament amb cèl·lules mare més utilitzat és el trasplantament de cèl·lules mare de la sang (cèl·lules mare hematopoètiques). Aquest trasplantament s'utilitza per a tractar certs trastorns de la sang i del sistema immunitari o per reconstruir el sistema sanguini després de tractaments d'algun tipus de càncer amb quimioteràpia o radioteràpia.

La medul·la òssia és un material esponjós que es troba a l'interior dels ossos i és ric en cèl·lules mare hematopoètiques que quan maduren es converteixen en diferents tipus de cèl·lules de la sang com eritròcits, leucòcits i plaquetes.

Quan es produeixen malalties en aquest teixit, on l'única solució és el trasplantament, s'ha de substituir la medul·la afectada per una de funcional.

Hi ha diverses fonts d'on es poden obtenir les cèl·lules mare pel trasplantament. La principal font de cèl·lules mare és la medul·la òssia. Es poden aïllar també del cordó umbilical i de la sang perifèrica.

Les cèl·lules mare poden ser del propi pacient, que han de ser tractades per eliminar les cèl·lules malignes (trasplantament autòleg o autogènic), o d'un donant, el qual pot ser familiar del pacient o no (trasplantament al·logènic).

La primera fase en aquest trasplantament és administrar quimioteràpia i/o radioteràpia a altes dosis amb l'objectiu d'eliminar totes les cèl·lules de la medul·la

òssia del pacient, incloses les cèl·lules no desitjades i malignes. Aquest procés s'anomena ablació.

A la segona fase és quan hi entren en joc les cèl·lules mare que s'implanten per via venosa mitjançant un procés similar a una transfusió de sang. Les cèl·lules mare viatjaran pel torrent sanguini cap a la medul·la òssia, on s'establiran amb l'objectiu de regenerar el sistema limfohematopoètic del pacient.

b) Utilització de cèl·lules mare en malalties de la pell

La pell és la primera barrera de protecció del nostre organisme. El procés de regeneració de la pell pot beneficiar-se de l'ús de cèl·lules mare per a millorar i accelerar els processos de cicatrització.

Des del 1970, les cèl·lules mare de la pell s'utilitzen per fer créixer empelts de pell per pacients amb cremades severes en extenses parts del cos. Aquest tractament només està reservat per pacients molt greus, i només uns pocs centres d'arreu del món són capaços de dur-lo a terme. No és una solució perfecte ja que només es reemplaça una de les capes de la pell, i la nova pell no té ni porus ni pèls.

També s'està treballant per combatre el càncer de pell amb teràpia cel·lular.

c) Utilització de cèl·lules mare en malalties oculars

El 2015 es va aprovar el sistema *Holoclar* a Europa. Aquest sistema utilitza cèl·lules mare del limbe corneal¹² per reparar la còrnia danyada ja pugui ser per accidents de treball, cremades amb àcids domèstics...

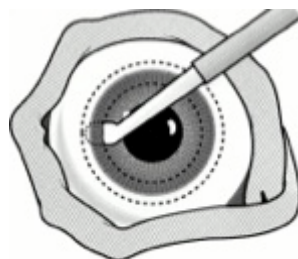


Fig. 4 Localització de les cèl·lules limbars

Les cèl·lules limbars es localitzen en l'anell que es mostra puntejat a la imatge.

¹² Limbe corneal: Zona que envolta la còrnia.

La funció normal d'aquestes cèl·lules limbars és guarir el dany a la capa externa de la còrnia. Quan hi ha una deficiència d'aquestes cèl·lules mare limbars deguda a un dany de la còrnia es pot aplicar el sistema *Holoclar*.

La teràpia consisteix en agafar una petita porció del limbe en bon estat, on hi ha les cèl·lules mare limbars, i cultivar-les al laboratori. Això produeix una tela de còrnia que després pot ser trasplantada de nou a l'ull. Amb aquesta tècnica, si no hi ha un dany profund a la còrnia, el pacient pot recuperar la vista. A més, amb la combinació de la tècnica *Holoclar* i trasplantaments de còrnia es pot acabar restaurant una còrnia normal en casos incurables de cremades als ulls.

A part d'aquests 3 tractaments, s'han realitzat experiments en animals que han permès descriure altres aplicacions terapèutiques de les cèl·lules mare. Tot i això, encara s'han d'avaluar els seus efectes i la seva seguretat mitjançant assajos clínics¹³ en humans. Per tant, s'ha de tenir en compte que són tractaments experimentals, i es recomana que només es consideri la seva aplicació com a últim recurs. A continuació se'n presenten alguns exemples:

d) Utilització de cèl·lules mare en malalties neurodegeneratives

Una possible aplicació de les cèl·lules mare és en el tractament de les malalties neurodegeneratives. En totes aquestes malalties es dona una pèrdua irreversible de cèl·lules neuronals. Aquesta irreversibilitat és deguda a les minses capacitats regeneratives del sistema nerviós central. Als pacients afectats d'aquestes malalties se'ls subministren fàrmacs que endarrereixen el desenvolupament de la malaltia però cada cop és més clar que per combatre-les cal evitar la neurodegeneració i/o reemplaçar les cèl·lules que degeneren per altres de funcionals.

¹³ Assaig clínic: Un estudi en el qual s'estudia l'efecte de qualsevol tractament en un grup de pacients i amb una sèrie de controls.

S'han descrit tres alternatives incloses dins la medicina regenerativa aplicada a malalties neurodegeneratives: el trasplantament cel·lular amb cèl·lules fetals, el neuroreemplaçament amb cèl·lules mare adultes i la teràpia gènica.

El trasplantament cel·lular amb cèl·lules fetals consisteix en trasplantar cèl·lules neuronals de fetus a les persones afectades. S'han de tenir molt present les implicacions ètiques que representa utilitzar cèl·lules fetals i de nounats, malgrat que provinguin d'avortaments o de defuncions naturals, la qual cosa fa que sigui molt difícil aplicar aquest tipus de trasplantament de manera rutinària.

Una altra alternativa és la utilització de cèl·lules mare neurals multipotents de cervell adult. Hi ha estudis en models de la malaltia de Parkinson en què s'han implantat cèl·lules mare en hipocamps d'animals adults i han adquirit les característiques morfològiques i moleculars del teixit hoste. En canvi, si s'implanten al cerebel no són capaces de diferenciar-se en neurones cerebel·loses. Aquests resultats confirmen la gran plasticitat de les cèl·lules mare neurals adultes però indiquen que la seva utilitat per al neuro-reemplaçament en algunes regions del cervell és limitada.

La tercera alternativa terapèutica és la teràpia gènica. Hi ha certes malalties neurodegeneratives que són causades per mutacions genètiques. En aquests casos es poden trasplantar cèl·lules mare neurals que hagin estat modificades genèticament al laboratori per corregir la mutació que causa la malaltia. Aquesta aproximació presenta diverses avantatges, com per exemple la gran capacitat proliferativa que presenten aquestes cèl·lules *in vitro*, la seva homogeneïtat i la possibilitat que expressin de manera permanent "gens terapèutics". En experiments realitzats en animals de laboratori s'ha observat que aquestes cèl·lules són capaces d'integrar-se en els teixits hoste i que es poden diferenciar tant en cèl·lules neurals com glials, tot repoblant la zona malmesa on han estat trasplantades. Ara falta esbrinar si aquests resultats tan prometedors es poden reproduir en humans.

e) Utilització de cèl·lules mare en malalties cerebrovasculars

L'ictus és una malaltia ocasionada per una alteració de la circulació de la sang al cervell. Es pot produir per un bloqueig en el subministrament de la sang cap a

alguna regió del cervell o pel trencament d'un vas sanguini del cervell. Ambdues situacions fan que les cèl·lules neurals morin, ja que no reben l'oxigen ni els nutrients de la sang. Actualment, s'està estudiant un nou enfocament en què s'implanten cèl·lules mare on hi ha cèl·lules danyades perquè facin la funció d'ajudar a fer créixer el teixit o les neurones aportant factors neurotròfics¹⁴ o reduir el procés de mort cel·lular.

f) Utilització de cèl·lules mare en malalties respiratòries

Un dels majors problemes a l'hora de fer trasplantaments d'òrgans és el rebuig immunològic. Hi ha hagut un gran avanç en aquest sentit gràcies a les cèl·lules mare ja que una manera d'evitar aquest rebuig és utilitzant les cèl·lules mare del mateix pacient sobre l'òrgan que es trasplanta (trasplantament autòleg o autogènic).

Aquesta estratègia es va utilitzar per primer cop a l'Hospital Clínic de Barcelona el 2008 en un trasplantament de tràquea. La pacient patia tuberculosi. Se li va practicar una intervenció a la part superior de la tràquea, però no es va poder reparar el bloqueig del seu pulmó esquerre, fet que impedia la circulació de l'aire cap al pulmó. Les seves dues úniques opcions eren l'extirpació del pulmó o un trasplantament de tràquea coberta amb cèl·lules mare de la pròpia pacient, i es va decidir optar per la segona. La tràquea del donant va passar per 25 cicles de rentat per eliminar totes les seves cèl·lules, deixant només l'estructura cartilaginosa. Paral·lelament, es cultivaven les cèl·lules de la pacient que havien de cobrir la tràquea. Les cèl·lules eren de tipus epitelial i del cartílag, diferenciades a partir de cèl·lules mare procedents de la seva medul·la òssia. La tràquea es va repoblar amb cèl·lules de la pacient abans de l'operació. Es va extreure la part del teixit danyat i es va substituir per la nova tràquea. El cos de la pacient receptora de la tràquea la va identificar com a pròpia i no hi va haver rebuig immunològic.

¹⁴ Factor neurotròfic: Proteïna que estimula el desenvolupament, incrementa la supervivència i promou la regeneració neuronal durant el desenvolupament embrionari i després de lesions del sistema nerviós.

g) Utilització de cèl·lules mare en malalties cardiovasculars

Les malalties cardiovasculars han estat la principal causa de mort als Estats Units des del 1900 i actualment són la principal causa de mort a Europa. En concret, la mortalitat per malalties cardiovasculars a Europa és de 4 milions de persones cada any, el que suposa al voltant d'un 45% a totes les morts. Això representa el doble que les morts per càncer.

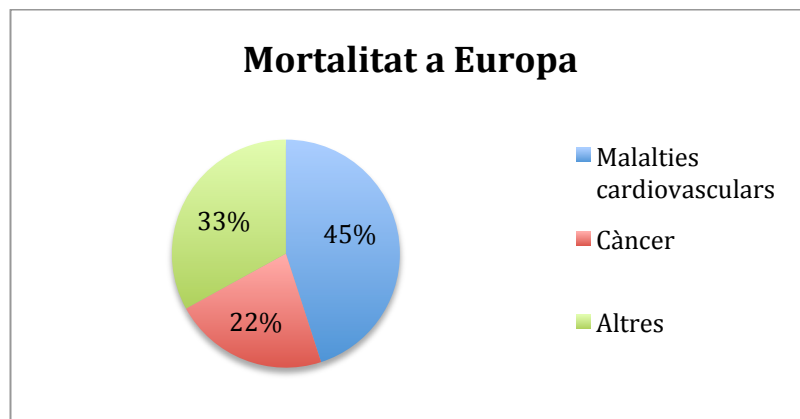


Fig. 5 Gràfic sobre la mortalitat a Europa

La insuficiència cardíaca isquèmica¹⁵ és una d'aquestes malalties cardiovasculars. Es produeix quan el teixit cardíac no rep l'aport d'oxigen necessari. Això pot causar la mort de les cèl·lules musculars cardíques, els cardiomiòcits. Quan la lesió isquèmica és suficient per causar la pèrdua de quantitats importants de cardiomiòcits, aquesta pèrdua ve complementada per una sèrie d'esdeveniments perjudicials: la formació d'una cicatriu no contràctil, l'aprimament de la paret ventricular, una sobrecàrrega del flux i la pressió sanguínia, insuficiència cardíaca i fins i tot la mort. Per tant, és essencial restaurar el teixit danyat, ja sigui a través de la reparació o la regeneració.

Encara que el trasplantament de cor també representa una opció viable per reemplaçar el miocardi danyat, la disponibilitat d'òrgans i el rebuig immunològic limiten l'ús pràctic d'aquest enfocament. Aquesta dificultat ha portat els investigadors a explorar l'aplicació de diferents tipus de cèl·lules mare (embrionàries, iPS i adultes) per a la reparació cardíaca.

¹⁵ Isquèmia: Disminució del reg sanguini en una zona determinada.

Les cèl·lules mare embrionàries semblen ser un bon partit per la medicina regenerativa. Tenen la capacitat de dividir-se indefinidament i de diferenciar-se en qualsevol tipus de cèl·lula. Tot i que no són capaces de diferenciar-se espontàniament en cardiomiòcits, poden ser dirigides perquè s'hi diferenciïn i s'integrin elèctricament en el múscul cardíac.

En un estudi amb primats es va demostrar que les cèl·lules mare embrionàries poden ajudar a millorar la funció cardíaca en miocardis danyats. En concret, els investigadors van induir infarts de miocardi als primats i, seguidament, els van injectar cardiomiòcits derivats de cèl·lules mare embrionàries en el múscul danyat. Al cap d'unes setmanes, van observar que les cèl·lules musculars del cor s'havien infiltrat al teixit cardíac danyat, havien madurat i s'havien integrat adequadament sobre les fibres musculars, començant a bategar juntament amb elles. Al cap d'uns mesos, les cèl·lules mare trasplantades havien regenerat el 40% del teixit cardíac danyat.

Malauradament, tal com s'ha mencionat anteriorment, les cèl·lules mare embrionàries tenen l'inconvenient que presenten els problemes ètics que comporta extreure aquestes cèl·lules dels embrions, raó per la qual no s'han fet estudis en humans. A més, després del descobriment de les cèl·lules iPS, s'ha tendit a la utilització preferent d'aquest darrer tipus de cèl·lules, ja que presenten més avantatges a l'hora d'obtenir cèl·lules pacient-específiques que les cèl·lules mare embrionàries.

Les cèl·lules iPS (desenvolupat a l'apartat 4) són capaces de diferenciar-se *in vitro* en cardiomiòcits, cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars. En injectar-les en un cor de ratolí es diferencien en cèl·lules cardíques.

La utilització de les cèl·lules iPS en teràpia té dues limitacions principals. El cor està format per múltiples tipus de cèl·lules amb diferents propietats i funcions. Per tant, depenent de la malaltia o del defecte cardíac, caldrà utilitzar un tipus concret de cèl·lules cardíques. Actualment, s'està treballant per millorar les tècniques de diferenciació en cadascun dels diferents tipus de cèl·lules cardíques al laboratori. A més, donada la seva propietat de pluripotència, les cèl·lules iPS són tumorigèniques. Això implica que si es trasplanten cèl·lules indiferenciades, aquestes poden donar lloc a tumors. La solució al problema va ser diferenciar

completament les cèl·lules iPS *in vitro* a cardiomiòcits abans de trasplantar-les al cor danyat. En un experiments amb models animals es va demostrar que les cèl·lules trasplantades eren capaces d'arribar al miocardi i millorar la funció cardíaca. Actualment, s'estan buscant estratègies per millorar l'eficiència d'aquestes cèl·lules en ser trasplantades. Busquen millorar la seva supervivència, el seu acoblament amb les cèl·lules cardíques, i la seva funcionalitat en els teixits. També s'està treballant per crear teixits biosintètics a partir dels cardiomiòcits obtinguts de les cèl·lules iPS.

Per altra banda, s'han fet estudis amb diferents tipus de cèl·lules mare adultes. A continuació se'n presenten alguns exemples.

Els mioblasts esquelètics¹⁶ són un dels primers tipus cel·lulars que es van considerar per la regeneració cardíaca. Aquestes cèl·lules les trobem en abundància al nostre cos. Poden proliferar i expandir-se *in vitro* fàcilment. A més, tenen la capacitat de contraure's i d'aguantar el patiment de la isquèmia.

De moment, els resultats experimentals obtinguts amb aquest tipus de cèl·lules no són massa prometedors. Quan s'ha intentat que s'implantin en el teixit danyat, no han mostrat millores. També s'ha intentat diferenciar aquestes cèl·lules a cardiomiòcits però tampoc ha donat bons resultats. Les miofibres derivades dels mioblasts esquelètics també han fallat a l'hora d'integrar-se electromecànicament en el miocardi.

Així, tots els potencials avantatges que tenien aquestes cèl·lules no s'han compensat amb els desavantatges que presenten. Després de tots els estudis es va decidir descartar aquest tipus de cèl·lules per la regeneració cardíaca.

Les cèl·lules mare de la medul·la òssia sí que han mostrat bons resultats. Es va publicar un article on es descrivia el cas d'un pacient que havia sofert un infart de miocardi. Van aïllar i cultivar cèl·lules de la medul·la òssia del pacient i se li van transferir a la zona danyada del cor amb un catèter. Deu setmanes després de la

¹⁶ Mioblasts esquelètics: El mioblast és una cèl·lula progenitora que dona lloc a cèl·lules musculars. Concretament, els mioblasts esquelètics els trobem al múscul de l'esquelet.

transfusió de cèl·lules mare, l'àrea de l'infart es va reduir d'un 24.6% a un 15.7% i va millorar la funció del ventricle esquerre.

S'han publicat diferents articles científics utilitzant cèl·lules mare de la medul·la òssia per la regeneració cardíaca. Alguns descriuen millores en la funció cardíaca i altres mostren la falta d'efectes. La comparació de tots els resultats obtinguts va crear conflictes, ja que es van trobar discrepàncies en els dissenys experimentals i fets matemàticament i lògicament incompatibles.

Tot i així, les cèl·lules mare de la medul·la òssia són una opció que segueix vigent per la millora de la funció del ventricle esquerre i la disminució de les cicatrius en pacients amb les malalties isquèmiques de cor.

Els fibroblasts autòlegs mostren una altra estratègia per combatre el dany del miocardi. El tractament consisteix en reemplaçar el teixit cicatritzat amb un de més elàstic, similar al teixit muscular. Les cèl·lules són manipulades per tal que expressin els factors de transcripció específics de les cèl·lules musculars cardíacaes. Són inserides al cor i són capaces d'ocupar una gran porció d'aquest teixit cicatritzat.

També s'està estudiant col·locar un pegat al cor fet de fibroblasts autòlegs. Pot enfortir l'estructura i el sosteniment després de la lesió miocardiaca.

Una altra possible teràpia per la reparació cardíaca és l'administració de cèl·lules mare mesenquimals¹⁷. Tenen el potencial de diferenciar-se en cèl·lules del mesoderma, inclosos els miòcits. Malgrat el potencial ús en teràpia, a diferència de les cèl·lules mare embrionàries, aquest tipus de cèl·lules no es diferencien espontàniament a cardiomiòcits *in vitro*, sinó que és necessari estimular-les químicament per tal d'obtenir cardiomiòcits. Una característica important d'aquestes cèl·lules és que presenten una baixa resposta immunològica. Això facilita la teràpia amb cèl·lules que no siguin del propi pacient. S'han fet estudis amb animals que mostren que l'ús d'aquestes cèl·lules va lligat a la millora de la funció del cor.

¹⁷ Cèl·lules mare mesenquimals: Són cèl·lules multipotents que es poden diferenciar en diferents tipus cel·lulars, incloent osteoblasts, condrocits, miòcits i adipòcits.

Per últim, tenim les cèl·lules mare cardíques. Tradicionalment, s'havia considerat que les cèl·lules cardíques estaven terminalment diferenciades i, per tant, no es podien dividir. Actualment, es coneix que el cor té un reservori de cèl·lules mare cardíques. Aquestes cèl·lules poden proliferar i madurar cap als diferents tipus de cèl·lules cardíques: cardiomiòcits ventriculars i auriculars, que formen les parets musculars del cor; les cèl·lules endotelials, que formen l'endocardi, el revestiment interior dels vasos sanguinis i vàlvules cardíques; i les cèl·lules musculars llises entre d'altres.

Les cèl·lules mare cardíques es troben en àrees específiques del cor, com per exemple, al pericardi i a les aurícules. Aquestes cèl·lules són bones candidates per la regeneració cardíaca ja que tenen la capacitat de diferenciar-se fàcilment i exitosament en cèl·lules cardíques.

Les cèl·lules de l'epicardi també han mostrat un gran potencial per la regeneració cardíaca ja que tenen la capacitat de diferenciar-se en múltiples llinatges cardíacs. A més, a partir d'una biòpsia petita s'expandeixen molt ràpidament. Diversos estudis en animals han apuntat que aquesta habilitat d'expandir-se ràpidament permet millorar la funció cardíaca. També s'han fet assajos clínics en pacients que havien sofert infarts de miocardi i els resultats van ser prometedors.

El mecanisme pel qual les cèl·lules mare promouen la reparació cardíaca segueix sent controvertit i és probable que les cèl·lules regenerin el miocardi de diverses maneres. Inicialment, els científics creien que les cèl·lules mare cardíques podien ser cultivades i injectades en el teixit danyat per promoure la seva regeneració. Es va proposar que les cèl·lules trasplantades es diferenciaven en cèl·lules cardíques, vasos sanguinis o altres cèl·lules danyades. No obstant això, aquest model ha estat reemplaçat per la idea que les cèl·lules mare trasplantades alliberen factors de creixement i altres molècules que promouen la formació de vasos sanguinis, fomenten la supervivència cel·lular i/o estimulen les cèl·lules mare cardíques per reparar el dany.

Un dels principals problemes a l'hora d'utilitzar les cèl·lules mare per a reparar lesions del cor és la bioseguretat, ja que s'han vist casos de taquicàrdies i arítmies puntuals en els pacients als quals se'ls havien trasplantat cèl·lules mare. L'altre

problema és aconseguir portar les cèl·lules a la destinació desitjada ja que aquestes ràpidament es difonen del cor cap a altres òrgans. A l'hora d'injectar les cèl·lules al pacient s'ha de tenir en compte el tipus de dany cardíac, el temps que durarà la teràpia i l'habilitat de les cèl·lules d'arribar al miocardi. Diversos estudis han mostrat que després de trasplantaments, la incorporació de les cèl·lules al miocardi no és viable ja que les cèl·lules trasplantades no reconeixen l'ambient nou, no s'integren al cor i tendeixen a desaparèixer al cap d'uns dies.

A més, s'ha vist que la dosi òptima de cèl·lules mare i l'eficàcia del tractament depenen de diversos factors, com l'edat, el gènere, el tipus de tractament i altres condicions. En un futur s'espera poder establir quines són les condicions òptimes per poder portar a terme tractaments amb cèl·lules mare per reparar el cor.

Encara queden molts dubtes per resoldre i molts estudis per anar fent, però la medicina aposta per usar les cèl·lules mare en nous tractaments, ja que els científics creuen que poden revolucionar la medicina del futur.

4. Les cèl·lules iPS

És difícil estudiar les característiques bàsiques i la fisiologia en cèl·lules vives procedents d'alguns òrgans humans, com per exemple el cor i el cervell. Encara que és tècnicament possible obtenir biòpsies i fer créixer les cèl·lules al laboratori, tant pacients com individus sans rarament accedeixen a donar mostres d'aquests òrgans. Una opció que es va plantejar amb l'aparició de les cèl·lules mare va ser la utilització de les cèl·lules mare embrionàries. De fet, ha estat possible generar cèl·lules mare embrionàries específiques de pacients amb diverses malalties, com per exemple la malaltia muscular de Duchenne, la malaltia de Huntington o la hipertròfia cardíaca, entre d'altres.

Aquestes cèl·lules són viables però presenten molts problemes ètics al darrere pel fet d'haver de destruir embrions. Per aquest motiu es van començar a buscar altres enfocaments per poder estudiar aquests teixits.

Investigacions recents han demostrat que és possible convertir cèl·lules diferenciades adultes en cèl·lules mare. Aquest procediment, anomenat reprogramació, permet obtenir cèl·lules mare induïdes pluripotents (també anomenades cèl·lules iPS, de l'anglès *induced pluripotent stem cells*) de qualsevol individu.

4.1 Què són?

Les cèl·lules iPS es produeixen artificialment al laboratori a partir de cèl·lules somàtiques¹⁸ d'un individu que, en principi, poden ser trasplantades al mateix individu sense risc de rebuig immunològic. Per generar-les es parteix de cèl·lules somàtiques diferenciades, com per exemple fibroblasts dèrmics, de les quals s'ha de modificar l'expressió gènica per a assolir la pluripotencialitat característica de les cèl·lules mare. Això s'aconsegueix introduint a la cèl·lula gens específics que indueixen la pluripotència. Les cèl·lules iPS generades tenen gairebé les mateixes propietats que les cèl·lules mare embrionàries, amb l'avantatge ètic que no provenen d'un embrió.

¹⁸ Somàtica: Qualsevol de les cèl·lules que formen el cos d'un organisme pluricel·lular, excepte els gàmetes. Són cèl·lules diferenciades.

Les cèl·lules iPS són capaces de diferenciar-se en qualsevol tipus de cèl·lula de les 3 capes germinals: ectoderma, mesoderma i endoderma. Aquestes tres capes són estructures temporals, que donaran lloc a tots els teixits i òrgans de l'organisme.

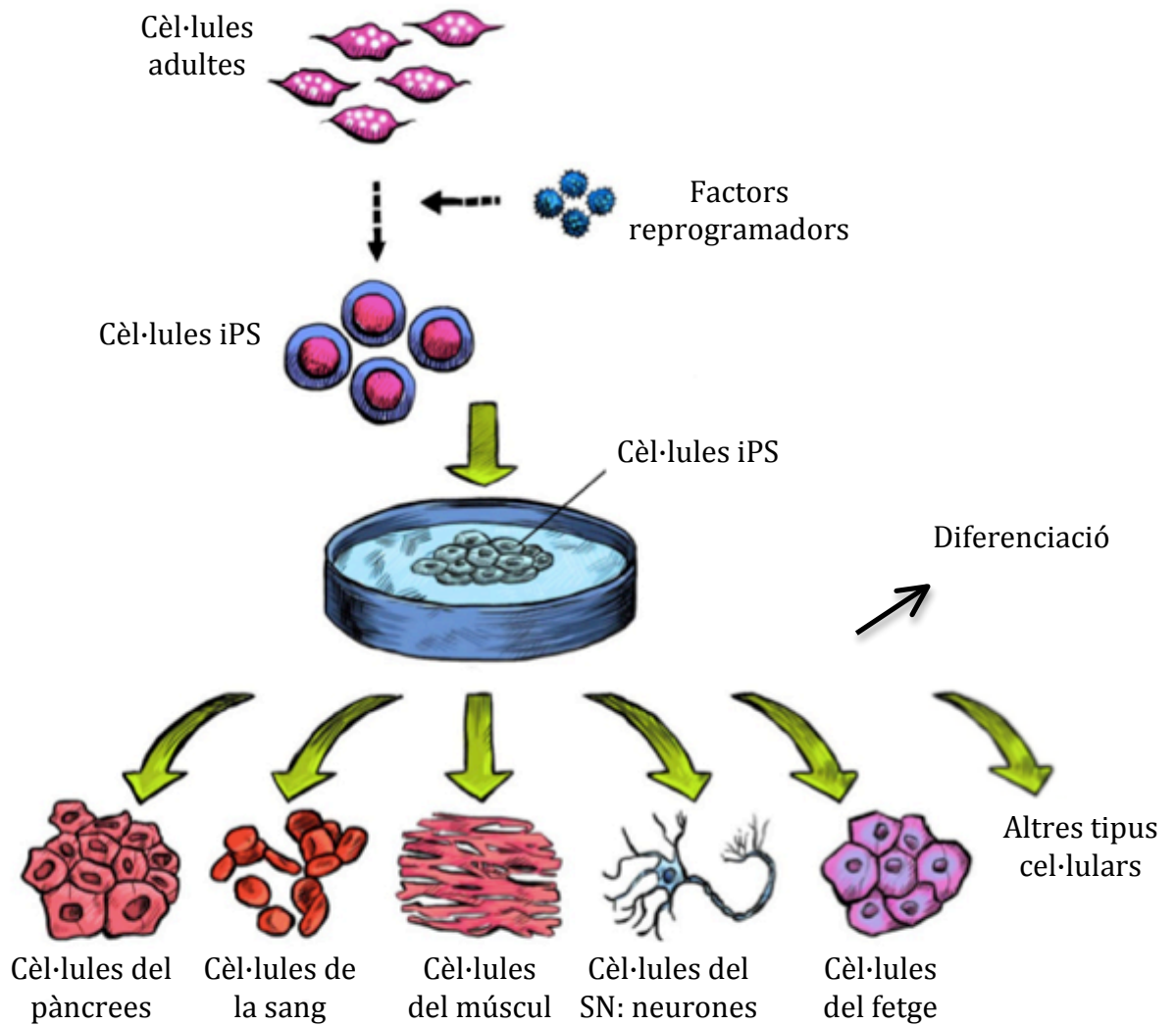


Fig. 6 Diagrama del procés de diferenciació

Exemples de tipus de cèl·lules que poden generar les cèl·lules iPS.

4.2 Descobriment

La investigació amb cèl·lules iPS va començar el 2006: Shinya Yamanaka i el seu equip van ser els primers en generar cèl·lules iPS mitjançant la reprogramació de cèl·lules somàtiques de pell de ratolí.

Les preguntes més importants que es va plantejar Shinya Yamanaka i de les quals van sorgir les cèl·lules iPS van ser: “Una cèl·lula realment ha de restar diferenciada per sempre més? És possible reprogramar aquestes cèl·lules diferenciades en cèl·lules mare embrionàries al laboratori?”. Es plantejava si les proteïnes que fan que les cèl·lules mare embrionàries siguin pluripotents podrien reprogramar la identitat d’una cèl·lula diferenciada. El seu grup de recerca va començar a investigar amb una llista de més de 100 proteïnes identificades com a importants per les cèl·lules mare embrionàries, de les quals no sabien si operaven col·lectivament o no. Això oferia més d’un milió de possibles variacions. Utilitzant un programa d’ordinador van ser capaços de distingir els 24 gens amb més possibilitats de tenir un paper important en la inducció de la pluripotència. Després de molts anys de feina, finalment van trobar que 4 d’aquests gens (anomenats *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* i *cMyc*, comunament abreviats com a OSKM i anomenats factors de Yamanaka) eren essencials per les cèl·lules mare embrionàries. Van agafar aquesta combinació de 4 gens i els van inserir transitòriament, utilitzant retrovirus, dins d’una cèl·lula epitelial de ratolí. En un procés que encara es desconeix, la cromatina es va començar a desfer i, mitjançant un mecanisme de retroalimentació positiva, les proteïnes codificades pels 4 gens essencials introduïts exògenament van estimular l’expressió endògena per part de la cèl·lula d’aquests mateixos gens. Les proteïnes resultants, típiques de les cèl·lules mare embrionàries, fan que la cèl·lula detecti que suposadament està en un ambient embrionari. A mesura que es van replicant, aquestes cèl·lules es van assemblant més a les cèl·lules mare embrionàries. A partir d’aquí es poden utilitzar per produir qualsevol cèl·lula del cos.

Hi havia també el dubte de si aquests resultats es podrien reproduir en humans. El mateix grup del Dr. Yamanaka va demostrar que era possible reprogramar cèl·lules

somàtiques humanes utilitzant els mateixos 4 factors que havien emprat en els ratolins. En aquest cas també van utilitzar retrovirus que contenien aquests 4 factors. Les cèl·lules obtingudes mostraven similituds amb les cèl·lules mare embrionàries, com per exemple en la seva morfologia i expressió gènica. A més, les cèl·lules iPS van créixer exponencialment durant 4 mesos i es va poder observar que es podien diferenciar en les 3 capes germinals (ectoderma, endoderma i mesoderma) *in vitro*.

4.3 Estratègies de reprogramació

Des del descobriment de les cèl·lules iPS, s'han publicat diversos mètodes de reprogramació de cèl·lules somàtiques. Actualment s'estan estudiant per trobar el més eficaç. A continuació, es presenten els mètodes més utilitzats.

4.3.1 Reprogramació somàtica mitjançant factors de transcripció coneguts

El mètode descobert per Yamanaka, que ja s'ha explicat anteriorment, es considera la tècnica tradicional (*Gold Standard*) de reprogramació. Consisteix en afegir quatre gens específics (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* i *cMyc*) a les cèl·lules, que fan que la cèl·lula indueixi la pluripotència.

Malgrat el gran èxit que van suposar aquests experiments, es va observar que quan injectaven les cèl·lules iPS obtingudes en ratolins, alguns desenvolupaven tumors. Aquest fet podia ser donat per la expressió de *Klf4* i *cMyc*. El factor *Klf4* regula la proliferació, la diferenciació, l'apoptosi¹⁹ i la reprogramació de cèl·lules somàtiques. El factor *cMyc* té una funció important relacionada amb la proliferació de les cèl·lules i el cicle cel·lular. Poc després, els mateixos investigadors van publicar que era possible de reprogramar les cèl·lules sense aquests dos gens i que si s'injectaven en ratolins, aquests ja no desenvolupaven tumors. Això va representar un gran avenç per la utilització de les cèl·lules iPS per teràpia en humans, ja que es minimitza el risc de desenvolupar càncer.

Posteriorment s'han anat publicant estudis en els que es mostra que és possible reprogramar diferents tipus de cèl·lules somàtiques utilitzant diferents

¹⁹ Apoptosi: Forma de mort cel·lular programada en els organismes pluricel·lulars.

combinacions de factors. Per exemple, el grup del Dr. Thomson va demostrar que era possible reprogramar fibroblasts humans substituint *Klf4* i *cMyc* per *Nanog* i *Lin28*.

Recentment s'ha descobert que determinades molècules petites com l'àcid valproic són capaços de potenciar l'efecte d'alguns dels factors de transcripció citats anteriorment. Aquestes molècules poden ser una alternativa a l'administració dels factors *cMyc* i *Klf4*. També s'ha descrit que la combinació d'una altra molècula petita que activa els canals de calci a la membrana plasmàtica amb els quatre factors de Yamanaka, permet millorar l'eficiència de reprogramació.

Un dels problemes que es troben els investigadors que volen generar cèl·lules iPS és com introduir els factors de pluripotència dins les cèl·lules. Hi ha dues estratègies principals: utilitzant sistemes virals o sistemes no virals.

4.3.1.1 Sistemes virals

-Retrovirus: Inicialment, la inserció dels factors OSKM dins els fibroblasts de ratolins o d'humans es duia a terme amb retrovirus. Aquests injecten els factors dins de les cèl·lules de manera eficient. Els problemes principals que té la utilització d'aquest tipus de virus és que només infecten cèl·lules en divisió i el DNA dels factors OSKM s'integra permanentment en diferents llocs aleatoris del genoma de les cèl·lules hoste. Això últim pot causar la interrupció d'un o varis gens, fent que les proteïnes que en deriven no siguin funcionals.

-Lentivirus: La introducció dels factors OSKM amb l'ajuda d'aquests virus també ha resultat útil a l'hora d'expressar els factors de reprogramació en cèl·lules somàtiques. Els lentivirus presenten l'avantatge que poden infectar cèl·lules en divisió i també les que no ho estan. Però igual que amb els retrovirus, es dona la integració dels factors OSKM al genoma de les cèl·lules.

-Adenovirus: Aquest tipus de virus també pot infectar cèl·lules en divisió i les que no ho estan. El principal avantatge de la utilització d'adenovirus per la reprogramació és que no s'integra cap fragment de DNA en la cèl·lula. Tot i així,

l'eficiència d'infecció no és tan alta com amb els altres dos tipus de virus, i pot causar inflamació i danyar les cèl·lules.

-Virus sendai: Un avantatge que presenta aquest tipus de virus és que, a diferència dels adenovirus, no necessiten entrar al nucli perquè es doni la transcripció dels factors OSKM. Això elimina totalment la possibilitat d'integració dels factors en el genoma de les cèl·lules hoste. A més, l'eficiència de generació de cèl·lules iPS és més alta que quan s'utilitzen adenovirus.

En general, el major problema d'utilitzar sistemes virals, tot i la seva eficiència i reproductibilitat, és que comporten la producció de partícules virals potencialment nocives que expressen oncògens potents com ara *cMyc*. A més, a l'hora de dur a terme la reprogramació cel·lular, s'intenta que el genoma de les cèl·lules no quedi alterat pel procés de reprogramació. Per exemple, que no quedin restes dels vectors usats per introduir aquests factors en les cèl·lules. Per això, tal com s'ha descrit anteriorment, s'estan començant a fer servir virus que no s'integren en el genoma. Un cop realitzada la reprogramació es poden eliminar els factors de transcripció subministrats quedant el genoma de la cèl·lula intacte. De totes maneres, per tal d'evitar totalment els problemes associats amb la utilització de virus, es van intentar dissenyar altres sistemes per introduir els factors OSKM dins les cèl·lules.

4.3.1.2 Sistemes no virals

Una manera d'evitar els virus és utilitzant liposomes o electroporació per incorporar els factors de transcripció dins de la cèl·lula. Aquests sistemes són més segurs que els sistemes virals i el DNA no s'integra en el genoma de les cèl·lules hoste.

L'electroporació és un procediment on s'augmenta la conductivitat elèctrica i la permeabilitat de la membrana plasmàtica cel·lular aplicant externament un camp elèctric. Si la força i la durada del camp elèctric són els adequats, es generen porus a la membrana que permeten que substàncies extracel·lulars puguin entrar dins la

cèl·lula. Si hi ha una exposició excessiva es pot causar la mort cel·lular. Quan desapareix el camp elèctric, es tanquen els porus.

Aquest procediment s'utilitza en recerca per introduir diferents substàncies dins les cèl·lules, com per exemple, plasmidis.

Els liposomes són unes vesícules molt petites compostes per una bicapa lipídica de fosfolípids i colesterol. La seva mida i característiques fan que aquestes estructures puguin circular, penetrar i difondre's en els teixits amb una gran facilitat, alliberant els factors transportats de manera controlada i eficaç. Són utilitzats en recerca per introduir DNA o plasmidis dins les cèl·lules. Això és possible gràcies a que la composició de la bicapa lipídica del liposoma es pot fusionar amb altres bicapes com la membrana cel·lular, transferint així el contingut del liposoma (per exemple DNA o plasmidis) dins la cèl·lula.

Aquestes tècniques es poden utilitzar per introduir dins les cèl·lules els factors OSKM en diferents formats:

-DNA lineal: Consisteix en introduir les seqüències de DNA corresponents als 4 factors en format lineal.

-Plasmidis o vector: És un DNA extracromosòmic que es pot replicar en una cèl·lula, independent dels cromosomes. Es poden introduir tots 4 factors en un mateix vector o en vectors separats. A mida que les cèl·lules es van dividint, els vectors (que no es multipliquen, a diferència del DNA de la cèl·lula) es van perdent. Després de varies divisions s'aconsegueixen tenir cèl·lules sense cap rastre de plasmidis.

-RNA: També es poden inserir els factors OSKM en forma d'RNA sintètic modificat *in vitro*. Aquesta modificació serveix perquè l'RNA introduït per reprogramar les cèl·lules escapi els sistemes de defensa que té la cèl·lula contra l'RNA procedent d'infeccions víriques. L'eficiència de reprogramació és molt més alta que amb altres mètodes no-integratius, però cal realitzar transfeccions repetides per aconseguir la reprogramació.

Aquest mètode pot representar un risc oncogènic degut a l'alta expressió de *cMyc*.

-Proteïnes: Les proteïnes derivades dels factors OSKM es fusionen a uns pèptids que permeten la seva introducció a les cèl·lules *in vitro* o *in vivo*. Cal subministrar les proteïnes de manera seriada. El principal desavantatge d'aquest mètode és que és lent i ineficient. A més, les proteïnes utilitzades són difícils d'obtenir i purificar en grans quantitats, fet que fa que la seva utilització de manera rutinària al laboratori sigui molt difícil.

4.3.2 Reprogramació mitjançant molècules petites (CiPS)

Les molècules petites són compostos bioactius que poden modular les vies cel·lulars específiques implicades en la senyalització cel·lular i en els canvis transcripcionals, metabòlics i epigenètics. Tots aquests processos són modulats durant la reprogramació cel·lular. L'objectiu principal de la reprogramació mitjançant CiPS és afectar l'expressió endògena dels gens necessaris per la reprogramació cel·lular sense introduir els factors OSKM. Les cèl·lules generades amb aquest mètode de reprogramació s'anomenen cèl·lules CiPS (de l'anglès *chemically induced pluripotent stem cells*).

El grup del Dr. Melton va reportar que utilitzant l'àcid valproic, una molècula petita, es poden eliminar dos factors oncogènics: *cMyc* i *Klf4*. A més van veure que l'eficiència de reprogramació augmentava considerablement.

Posteriorment, diversos grups van identificar combinacions de molècules petites específiques que permetien la reprogramació de cèl·lules embrionàries i fibroblasts adults de ratolins en combinació amb un únic factor de transcripció, *Oct4*. Aquests experiments van demostrar que no cal introduir els factors OSKM externament a les cèl·lules, sinó que és possible reprogramar les cèl·lules somàtiques per generar cèl·lules mare pluripotents modulant l'expressió endògena dels factors exclusivament amb molècules petites.

Es creu que en un futur es podran reprogramar cèl·lules humanes utilitzant molècules petites.

4.3.3 Tipus de cèl·lules reprogramables

Potencialment, qualsevol cèl·lula somàtica es pot utilitzar per la reprogramació, però les més comunes són les que es presenten a continuació.

Primer de tot tenim els fibroblasts, són fàcils d'aconseguir (mitjançant una biòpsia dèrmica) i de mantenir. Són molt viables i estables fins a 5-10 passatges, ja que en els passatges, l'eficiència de reprogramació disminueix i el risc d'alteracions genòmiques augmenta. Els fibroblasts són una manera quasi assegurada d'obtenir cèl·lules iPS, tot i tenir una baixa eficiència de reprogramació. Aquest procés necessita de 3 a 5 setmanes.

També es poden utilitzar les cèl·lules de la sang que trobem al cordó umbilical o a la sang perifèrica, tot i que necessiten un procés previ de purificació. No són estables en cultiu després de molts passatges i la seva eficiència de reprogramació és baixa. Un avantatge és que aquestes cèl·lules no són gaire madures i, per tant, desenvolupen menys mutacions mitocondrials a l'hora de fer créixer i conservar les cèl·lules. A més, es poden obtenir mitjançant processos no invasius.

Finalment, també s'utilitzen els queratinòcits. El principal avantatge és que es troben simplement en un cabell. Són molt manejables però necessiten un medi de cultiu especial i només són estables durant 5 passatges. La seva eficiència en la reprogramació és més alta que els fibroblasts i el procés també dura menys (2-3 setmanes).

Actualment, malgrat els avantatges que presenten els queratinòcits, el tipus cel·lular més utilitzat per la reprogramació són els fibroblasts. El seu manteniment és barat i fàcil, es poden reprogramar utilitzant diferents mètodes i quasi sempre s'obtenen cèl·lules iPS.

4.3.4 Reprogramació a l'interior d'un ésser viu

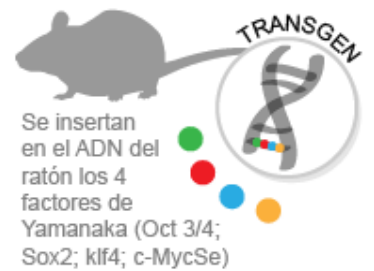
Un equip del Centre Nacional d'Investigacions Oncològiques va aconseguir reprogramar a l'interior d'un ésser viu, en aquest cas un ratolí, cèl·lules adultes per convertir-les en cèl·lules mare més plàstiques que les embrionàries.

Van desenvolupar ratolins transgènics²⁰ que en una part del seu DNA tenien inserits els quatre factors de Yamanaka. A més, aquesta zona del genoma es podia activar o silenciar en presència o absència d'un determinat antibiòtic (anomenat doxiciclina). Quan aquests factors portaven una setmana activats en presència de l'antibiòtic es van poder començar a veure els primers senyals de reprogramació. Per exemple, algunes cèl·lules de l'intestí començaven a mostrar proteïnes pròpies de les cèl·lules mare embrionàries. Al cap de dos mesos, els animals van desenvolupar teratomes²¹ i tumors constituïts per diversos tipus de teixits. Això mostra la capacitat pluripotent de les cèl·lules.

La reprogramació va anar un pas més enllà perquè es van formar estructures pseudo-embriònaries, que presenten les tres capes pròpies dels embrions (ectoderma, mesoderma i endoderma), estructures que formen part de la placenta i senyals de formació de cèl·lules sanguínies.

Això ens diu que aquestes cèl·lules mare són molt més versàtils que les cèl·lules iPS *in vitro* de Yamanaka ja que mai van aconseguir generar teixits que sustenten el desenvolupament d'un nou embrió, com la placenta.

Tot i així, s'ha de confirmar la naturalesa totipotent d'aquestes cèl·lules desenvolupades dins el ratolí.



1ª semana con antibiòtico



Algunas cèl·lules del rató empiezan a expresar proteínas propias de las cèl·lules embrionàries.

Varias semanas



Las cèl·lules reprogramadas empiezan a formar masas llamadas teratomas.

A los dos meses



Además de los teratomas, se producen estructures pseudo-embriònaries y extraembriònaries, como partes de la placenta.



Las cèl·lules reprogramadas 'in vivo' son más plàstiques y pluripotentes que las cèl·lules embrionàries y las iPS obtenidas 'in vitro'.

Información: Ángeles López
Gráfico: Gracia Pablos

Fig. 7 Esquema que mostra la reprogramació a l'interior d'un ratolí

²⁰ Transgènica: Ésser viu al qual se li han afegit de manera artificial gens que no són els propis mitjançant tècniques de biotecnologia i enginyeria genètica.

²¹ Teratoma: Tipus de tumor que pot contenir diversos tipus de teixit.

4.4 Utilització de les cèl·lules iPS com a model de malaltia

Totes les cèl·lules del cos contenen els mateixos gens codificats en el seu DNA. Si tenim una malaltia en concret causada per un defecte genètic, ho veurem reflectit a cadascuna de les nostres cèl·lules. Cadascuna porta la mutació que causa la malaltia al seu genoma. Malgrat això, cada tipus cel·lular expressa uns certs gens que li són rellevants per la seva funció. Per exemple, en una cèl·lula epitelial només els gens que fabriquen proteïnes de la pell són funcionals. Aquests gens sempre estan en la part descondensada de la cromatina. Tots els altres gens que no s'expressen els trobem a la part condensada de la cromatina.

Un dels avantatges de les cèl·lules iPS és que les podem crear a partir de les cèl·lules de qualsevol pacient. Això ens permet obtenir cèl·lules iPS amb els mateixos defectes genètics del pacient que posteriorment podem diferenciar en altres cèl·lules de qualsevol teixit. Amb aquestes cèl·lules es pot estudiar la malaltia i trobar la possible cura. S'han modelat diverses malalties: Parkinson, Alzheimer, anèmia, Huntington...

En el camp de la cardiologia, les malalties més modelades mitjançant cèl·lules iPS són els trastorns arítmics, que són aquells que afecten les propietats elèctriques del cor.

Un dels trastorns arítmics més estudiats és la Síndrome de QT llarg, que es caracteritza per l'allargament d'un interval concret de l'electrocardiograma anomenat QT. És una de les malalties que causa mort sobtada cardíaca.

Un dels gens associat a la Síndrome de QT llarg és el KCNQ1, que codifica per un canal de potassi. S'han descrit algunes mutacions en aquest gen que causen l'alteració de la funció i/o l'estructura normal d'aquests canals.

Un grup de científics van crear un model d'iPS d'un pacient diagnosticat amb la Síndrome de QT llarg que tenia una mutació en aquest gen. Van observar que els cardiomiòcits derivats de les cèl·lules iPS del pacient, comparades amb cardiomiòcits control, mostraven un defecte en els canals de potassi. Aquesta alteració podria afectar les propietats elèctriques del cor i, per tant, causar la malaltia del pacient.

4.5 Avantatges i inconvenients de les cèl·lules iPS

Les cèl·lules iPS es poden diferenciar en qualsevol tipus de cèl·lula, això significa que podem obtenir cèl·lules diferenciades del teixit d'interès en grans quantitats, i utilitzar-les per investigació i per teràpia. Això pot tenir una possible aplicació per identificar els diferents comportaments i causes d'una malaltia i estudiar noves possibles cures.

A nivell general, el major avantatge de les cèl·lules iPS és que utilitzar-les no comporta els problemes ètics derivats de la utilització d'embrions humans.

A nivell de recerca, les cèl·lules iPS representen un model cel·lular adequat per conèixer millor la fisiopatologia de les malalties, ja que permeten la generació de tipus cel·lulars que són difícils (o impossibles) d'obtenir. També tenen el potencial de ser utilitzades per assajar els efectes de nous medicaments: en lloc de provar els seus efectes sobre animals, ho podem investigar utilitzant aquestes cèl·lules.

A nivell terapèutic, donat que es poden generar cèl·lules iPS pròpies d'un pacient, si les re-incorporéssim al seu cos, aquest no les rebutjaria. A més, aquestes cèl·lules permeten el desenvolupament de tractaments especialitzats per a cada pacient. Un altre punt a favor és que és possible corregir els defectes genètics del DNA de l'individu que poguessin donar lloc a malaltia i, per tant, les cèl·lules especialitzades obtingudes a partir de les cèl·lules iPS corregides ja no tindrien el defecte.

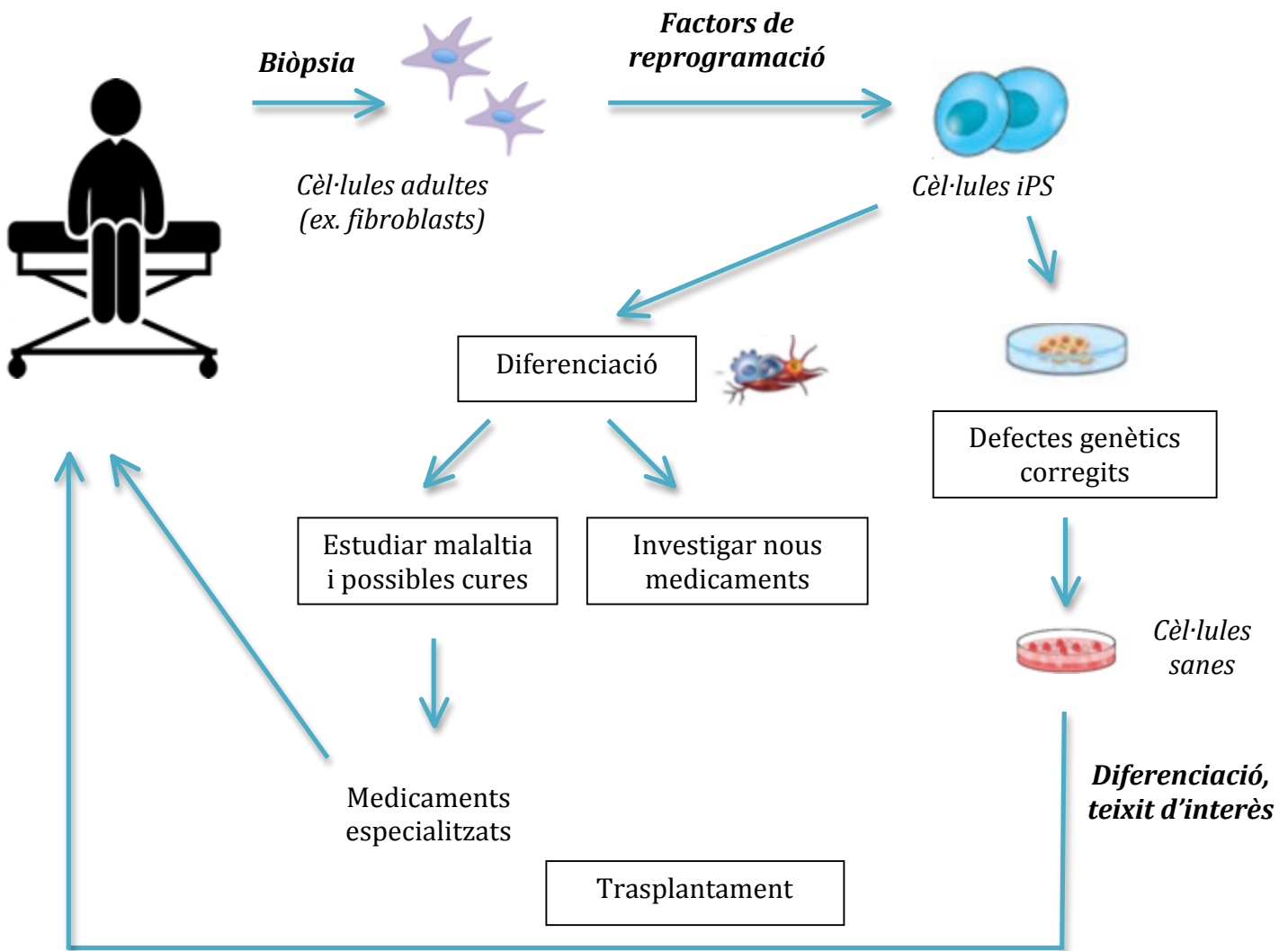


Fig. 8 Avantatges de les cèl·lules iPS

En aquest diagrama es mostren els 4 avantatges bàsics de les cèl·lules iPS: Estudiar la malaltia i les possibles cures, corregir els defectes genètics, investigar nous medicaments i trasplantar-les de nou al pacient.

Un dels inconvenients és que l'eficiència del procés de reprogramació és força baixa. A més, és un procés força lent i no sempre funciona en tots els tipus de cèl·lules.

Hi ha algunes malalties en les quals hi actuen factors ambientals, nutricionals i hormonals. Les cèl·lules iPS no tenen la capacitat de reflectir aquests factors ja que

només reproduïen els aspectes genètics de la malaltia. Una possible solució és exposar les cèl·lules iPS a aquests factors ambientals.

Un altre inconvenient és que en algunes malalties les cèl·lules han d'estar madures perquè s'evidencien els símptomes. S'està treballant per introduir noves millores dels protocols de diferenciació i maduració.

Tal com s'ha explicat anteriorment, s'utilitzen retrovirus o lentivirus per sobreexpressar de manera eficient els factors de reprogramació en els diferents tipus cel·lulars. Aquests virus s'integren de manera permanent en el genoma de les cèl·lules que volem reprogramar i promouen l'aparició de mutacions. Això fa que les cèl·lules no siguin segures per teràpia. És per això que actualment es tendeixen a utilitzar mètodes alternatius, com per exemple, l'electroporació. Això minimitza el risc d'integració dels factors al genoma de les cèl·lules, però també fa que la reprogramació sigui molt menys eficient.

Un dels greus problemes que presenten aquestes cèl·lules està en el propi conjunt de gens que s'utilitzen per la inducció de la pluripotència. Alguns d'aquests gens estan associats amb el desenvolupament de múltiples tumors. Un exemple és la sobreexpressió de *Klf4* que causa tumors de mama, i l'expressió inadequada de *cMyc*, que s'observa en el 70% dels càncers humans. És per això que s'han buscat alternatives per tal de no fer servir aquests factors. Alguns grups de científics van aconseguir reprogramar cèl·lules somàtiques fent servir diferents combinacions de gens que inclouen: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* i *Lin28A*. Actualment també s'està treballant per reprogramar cèl·lules somàtiques només amb molècules petites.

Un altre inconvenient és que a vegades la reprogramació és incompleta. Això pot causar que les cèl·lules iPS es comportin de manera diferent a les cèl·lules mare embrionàries i, per exemple, no siguin capaces de diferenciar-se en cèl·lules de les 3 línies germinals.

5. El cor

El cor és el principal motor del nostre cos. És un múscul situat entre els pulmons encarregat d'impulsar la sang per tot el sistema circulatori gràcies als seus moviments de contracció (sístole) i dilatació (diàstole). El cor bomba la sang interrompudament unes 70 vegades per minut en repòs, però pot arribar a bombar a una freqüència molt més alta, per exemple, durant la pràctica d'exercici o emocions fortes, que pot arribar fins als 200 batecs per minut en els joves.

El cor té 4 cavitats: les dues superiors s'anomenen aurícules i les dues inferiors ventricles. Tenim dues vàlvules auriculo-ventriculars: la vàlvula tricúspide, situada entre l'aurícula i el ventricle esquerre i la vàlvula mitral, entre l'aurícula i el ventricle dret. Hi ha dues vàlvules que permeten la sortida de la sang del cor i eviten que torni enrere. Aquestes vàlvules són la aòrtica (en el ventricle esquerre) i la pulmonar (en el ventricle dret). Les quatre vàlvules permeten que la sang tingui sempre una única direcció, evitant que aquesta vagi enrere.

El cor està connectat a conductes anomenats venes, artèries i capil·lars. A través de les venes arriba la sang al cor. Així a l'aurícula dreta arriben la vena cava superior i inferior, que porta la sang de tot el cos (a excepció dels pulmons). A l'aurícula esquerre hi arriba la sang dels pulmons, a través de les venes pulmonars. Les artèries són el conducte de sortida del cor, són vasos més valents i elàstics que les venes, atès que necessiten aguantar la pressió de l'impuls de la sang, quan el cor ha bategat. Finalment, els vasos més petits s'anomenen capil·lars, i s'encarreguen de fer l'intercanvi d'oxigen i productes de desfet en les cèl·lules de tot el cos.

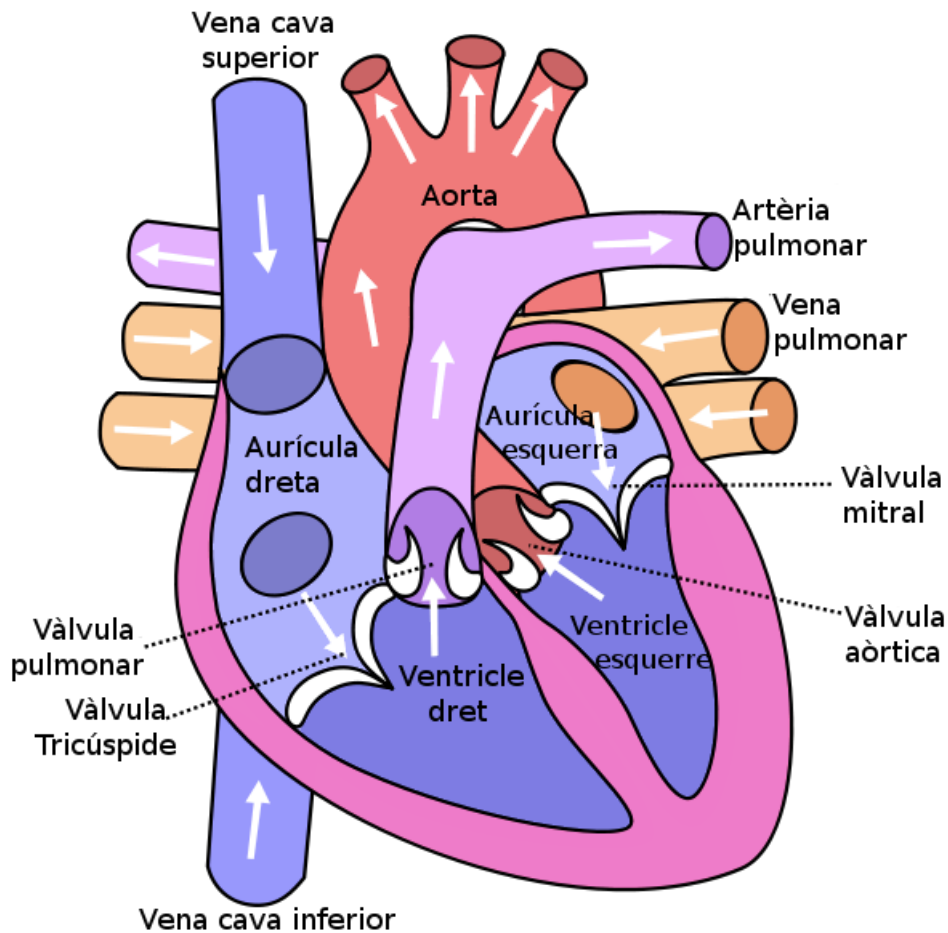


Fig. 9 Estructura del cor

Al cos hi ha dos circuits diferents, però que estan connectats: el pulmonar i el general.

-Circuit pulmonar: La sang va del cor als pulmons i dels pulmons al cor. Als pulmons hi ha l'oxigenació de la sang, la qual expulsa diòxid de carboni i absorbeix oxigen.

-Circuit general: La sang va del cor cap a les diferents parts del cos i torna de nou al cor. La sang proporciona substàncies nutritives i oxigen a les cèl·lules. Les cèl·lules transformen aquestes substàncies en energia i generen substàncies residuals i diòxid de carboni que aboquen a la sang.

El cor té diverses capes:

-Pericardi: És una membrana que envolta i separa el cor de les estructures veïnes.

-Epicardi: Descriu la capa externa de teixit del cor. Funciona com a capa protectora.

-Miocardi: És el teixit muscular del cor. És l'encarregat de bombar la sang pel sistema circulatori a través de les contraccions. El múscul cardíac generalment funciona involuntària i rítmicament, gràcies a l'estimulació nerviosa del seu sistema elèctric.

-Endocardi: És la capa interna del cor. Forma el revestiment intern de les aurícules i els ventricles.

5.1 El sistema elèctric del cor

El cor s'estimula de forma coordinada per a que es contragui de forma efectiva. L'impuls elèctric es genera en el node sinusal, situat a l'aurícula dreta. Aquesta activació elèctrica causa la contracció auricular, per a que la sang entri als ventricles a través de les vàlvules auriculo-ventriculars. L'impuls es desplaça al node auriculo-ventricular, on el corrent elèctric s'atura per uns mili-segons per esperar que la contracció auricular acabi d'omplir els ventricles. Un cop aquests s'han omplert del tot, s'allibera l'impuls elèctric del node auriculo-ventricular per estimular els ventricles. L'estimulació elèctrica dels ventricles activa la contracció ventricular, per tal que la sang surti del cor a través de les vàlvules aòrtica i pulmonar per a que arribi a tot el cos, i als pulmons respectivament. Aquest procés, anomenat cicle cardíac, o activació elèctrico-mecànica es repeteix constantment, generant el batec cardíac.

Qualsevol alteració en el sistema elèctric del cor, dóna lloc a arítmies ja sigui per alentiment del cor (bradicàrdia) o per què el cor va més ràpid del compte, causant taquicàrdia.

5.2 Cardiomiòcits

Els cardiomiòcits són les cèl·lules més enèrgiques del nostre organisme. Formen part del miocardi i són les encarregades del moviment contràctil. Tenen la capacitat de contraure's individualment en resposta a l'estímul elèctric generat al node sinusal. Per aquesta raó, les fibres de les cèl·lules han de ser molt flexibles per poder fer el moviment de contracció i dilatació. Aquestes cèl·lules són imprescindibles en el batec del cor.

Els cardiomiòcits tenen 4 tipus principals de proteïnes:

-Sarcomèriques: Són les encarregades de generar la contracció muscular. Alguns exemples són l'actina, la miosina i les troponines.

-Citoesquelètiques: Són les encarregades de mantenir l'estructura dels cardiomiòcits. Alguns exemples són la distrofina i la desmina.

-Desmosomals: Són les principals encarregades de les unions entre cardiomiòcits. Alguns exemples són la placofilina, la desmoplaquina i la desmocolina.

-Canals iònics: Generen l'activitat elèctrica. Alguns exemples són els canals de sodi o potassi, l'intercanviador sodi-calci o la bomba sodi-potassi.

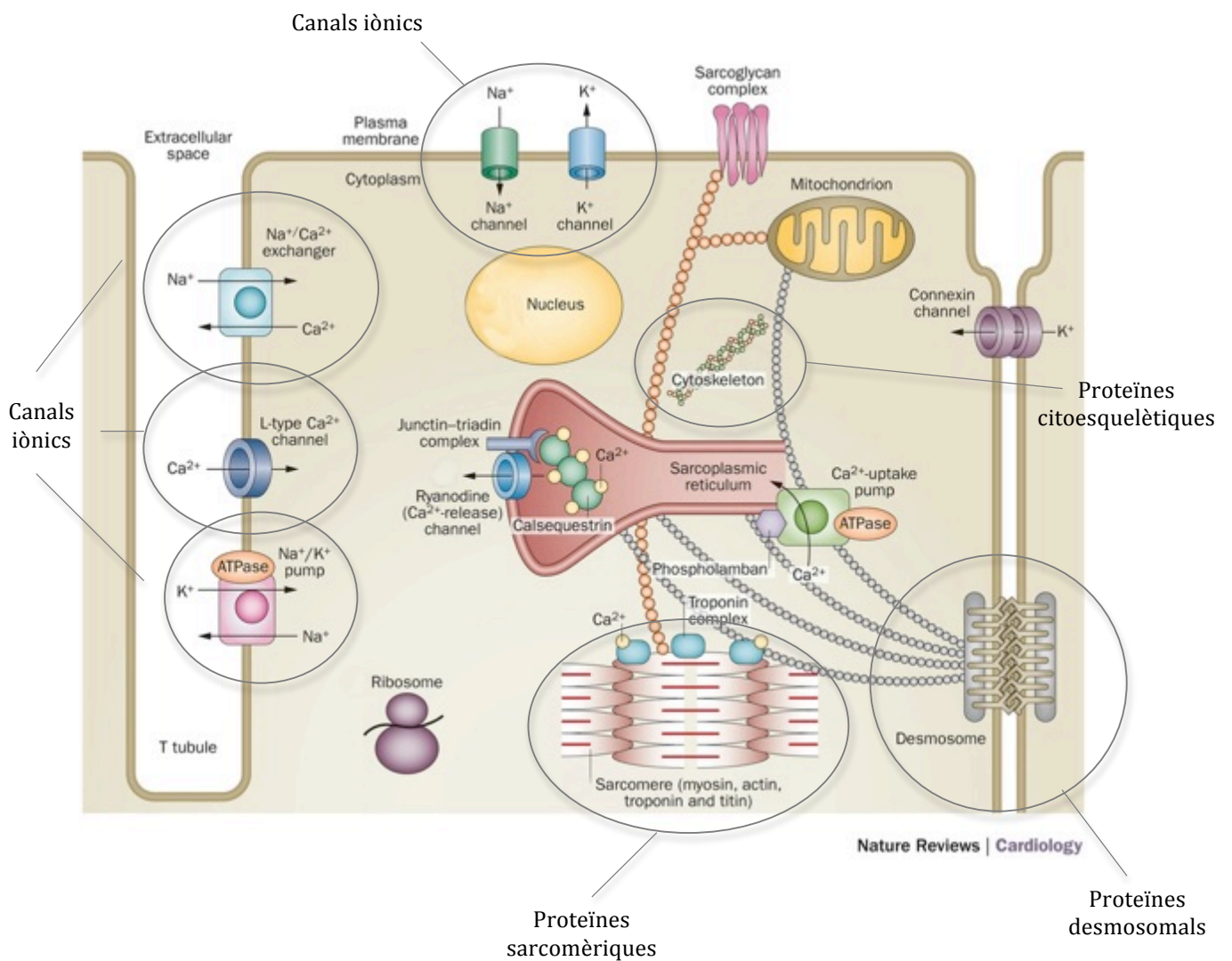


Fig. 10 Estructura dels cardiomiòcits

Diagrama on es marquen els quatre tipus principals de proteïnes dels cardiomiòcits.

Part pràctica

La part pràctica d'aquest treball l'he dut a terme al Centre de Genètica Cardiovascular. Primer explicaré en general les característiques de la sala de cultius i després em centraré en el que hem treballat al laboratori. Finalment explicaré la utilització d'aquests cardiomiòcits que obtenim.

6. Característiques importants de la sala de cultius

La major part de les pràctiques han estat fetes a la sala de cultius, que ha d'estar dedicada exclusivament a això.

És important sempre portar bata i guants quan estem a la sala de cultius.

És important tancar tots els pots amb parafilm quan surtin de la campana perquè no s'obrin sense voler i es contaminin. També és important que els cultius estiguin sempre tapats quan surtin de la campana perquè sinó es contaminarien de qualsevol microorganisme de l'ambient i podrien afectar el cultiu.

A la sala de cultius hi trobem:

1. La campana: La seva funció és proporcionar un espai lliure de partícules, especialment de possibles contaminants que puguin infectar el cultiu. Per mantenir-ho tot estèril hi ha un ventilador que força el pas d'aire a través d'un filtre HEPA i proporciona aire net lliure de partícules a tota la zona de treball. És molt important que tot el que hi posem a dins també sigui estèril, per això ho mullem amb etanol al 70%. Abans i després de cada ús, la superfície de treball s'ha de netejar amb etanol i encendre la llum ultraviolada per acabar d'eliminar qualsevol partícula que s'hi hagi quedat.
2. Incubadora: És on es guarden els cultius. Està a 37 °C i 5% de CO₂. Aquestes condicions són òptimes pel creixement de les cèl·lules. La temperatura i el CO₂ són importants perquè s'ha de mantenir un medi de creixement estable per les cèl·lules.

3. Microscopi: És un instrument òptic constituït per dos sistemes de lents, l'ocular i l'objectiu, que permeten augmentar extraordinàriament la magnitud de la mostra a observar, fent visible allò que no es veu a ull nu.
4. Centrífuga: És una màquina que utilitza la força centrífuga de la rotació per separar els diferents components d'una mostra en funció de la seva densitat. A l'hora de fer-la servir sempre s'ha d'equilibrar el pes perquè sinó la centrífuga tremola molt i pot comportar que s'espalli l'aparell.
5. Escombraries: És important tenir dos contenidors d'escombraries separats: un per les deixalles comunes, com per exemple els embolcalls de les pipetes i un altre per tot l'instrumental que ha tocat les cèl·lules. Els residus biològics els venen a buscar una vegada a la setmana i s'incineren.

7. Obtenció de cardiomiòcits pacient-específics

L'objectiu principal de la part pràctica consisteix en obtenir cardiomiòcits a partir de fibroblasts dèrmics. Per poder obtenir aquests cardiomiòcits s'han de passar diverses fases que explico a continuació pas a pas.

7.1 Obtenció de la mostra de pell

Objectiu: Obtenir la mostra de pell d'un pacient, d'on extraurem els fibroblasts que són el nostre punt de partida.

Aquesta part no la vaig poder visualitzar perquè la mostra va arribar directament al laboratori. De totes maneres, se'm va explicar el protocol, que detallo a continuació.

Materials:

- Guants
- Perforadora de 4 mm
- Gasses
- Pinces
- Tub de recol·lecció amb medi per fibroblasts

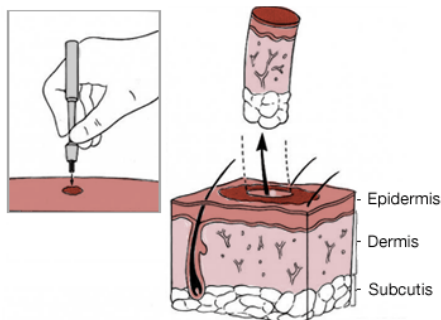
Productes:

- Alcohol per desinfectar
- Anestèsia local

Procediment:

- 1- Seleccionar l'àrea per fer la biòpsia.
- 2- Netejar l'àrea amb alcohol.
- 3- Aplicar l'anestèsia.
- 4- Amb la perforadora, rotar sobre la pell fins a perforar la dermis.
- 5- Retirar la perforadora i eixugar l'excés de sang amb una gassa.
- 6- Extreure la mostra estirant-la cuidadosament amb unes pinces.
- 7- Eliminar la part subcutània (grassa).

- 8- Transferir la mostra al tub de recol·lecció, que té medi de cultiu per fibroblasts.



Ens interessa la part de la dermis, és d'on aïllem els fibroblasts.

A l'esquerra podem veure com es perfora la dermis amb una perforadora. A la dreta s'observa un esquema de la mostra i les tres capes corresponents de la pell.

Fig. 11 Biòpsia de pell

7.2 Aïllament dels fibroblasts

Objectiu: Aïllar fibroblasts de la dermis de la mostra de pell.

Materials:

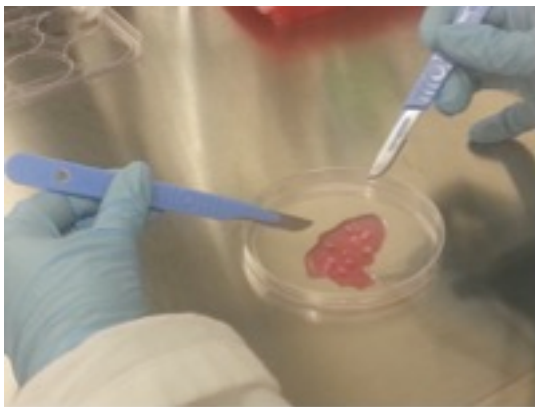
- Biòpsia de pell en medi de cultiu per fibroblasts
- Cobreobjectes
- Placa de cultiu cel·lular de 6 pous
- Placa de Petri
- 2 bisturís i 2 fòrceps
- Pipeta de 5 ml i pipetejador

Productes:

-Medi de cultiu dels fibroblasts: Conté tots els components necessaris pel creixement dels fibroblasts, incloent aminoàcids, vitamines i sals inorgàniques. A més conté, antibacterians i antifúngicides. Aquests dos últims components serveixen per eliminar tots els bacteris i fongs provinents de la mostra de pell. També conté sèrum fetal boví (FBS), que és necessari per al cultiu d'aquestes cèl·lules *in vitro*. Té un nivell molt baix d'anticossos i conté factors de creixement.

Procediment:

- 1- Abocar la biòpsia a la tapa de la placa de petri junt amb el seu medi. És important mantenir el teixit humit perquè les cèl·lules no es morin.
- 2- Amb l'ajuda dels bisturís, trossejar la biòpsia fins a obtenir de 12 a 15 trossets.
- 3- Distribuir els trossets en 3 dels pous de la placa de 6 pous, col·locant-los al centre de cada pou.
- 4- Col·locar un cobreobjectes a cada pou vigilat que tots els trossets es mantinguin a sota.
- 5- Afegir medi de cultiu a cada pou mentre s'aguanta el cobreobjectes amb les pinces. Cal que el cobreobjectes faci suficient pressió perquè el teixit no floti. Si no s'enganxa a la placa, serà impossible que creixin els fibroblasts.
- 6- Deixar reposar a l'incubador durant una setmana.
- 7- Al cap d'una setmana, anar canviant el medi dos vegades a la setmana.



A



B

A la figura A veiem els trossets de pell trossejats amb els bisturís.

A la figura B ja tenim el cultiu ja preparat per col·locar a l'incubador.

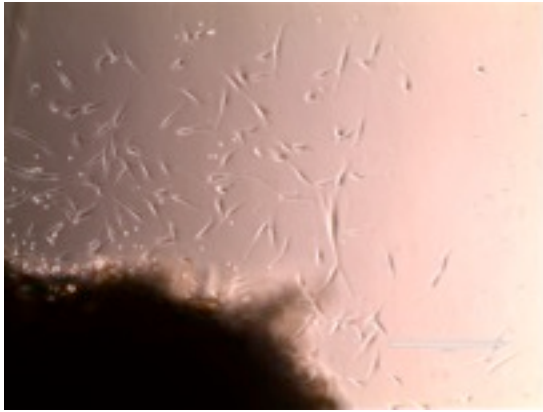
Resultats:

Set dies després d'haver realitzat el procediment, tal com es veu al panell A de la següent figura, es poden començar a observar fibroblasts. L'ombra fosca que es veu a la part inferior esquerra és el teixit.

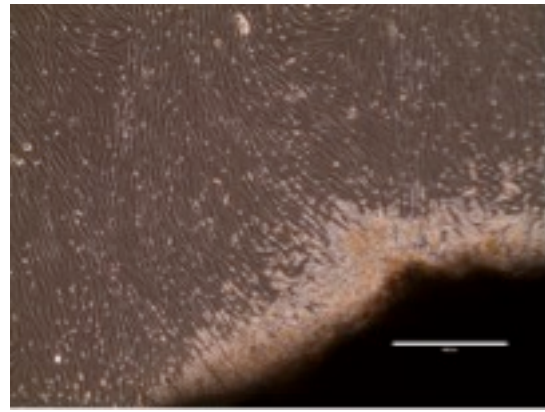
A la figura B veiem el teixit i els fibroblasts que es van expandint.

A la figura C s'hi pot veure el teixit, unes formes arrodonides que són greix i els fibroblasts.

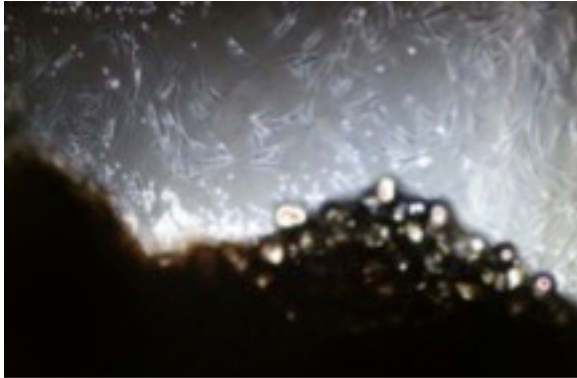
La darrera imatge d'aquest apartat mostra el pou omplert de fibroblasts. La línia del mig de la imatge és el cobreobjectes. Quan el fibroblasts arriben a aquest límit podem veure el canvi de direcció. Els fibroblasts creixen per sobre i per sota del cobreobjectes. És important anar observant el cultiu sovint i vigilar que no es quedin sense espai per créixer.



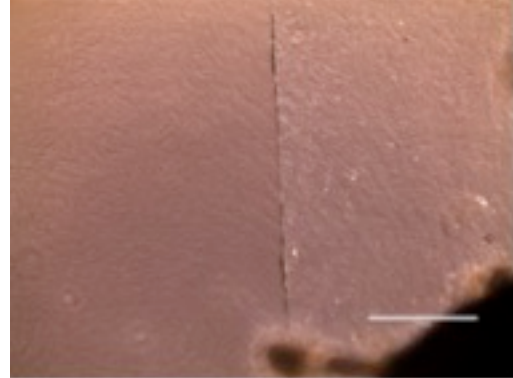
A: Fibroblasts, dia 7 (Escala: 400 μ m)



B: Fibroblasts, dia 9 (Escala: 400 μ m)



C: Fibroblasts, dia 9 (Escala: 400 μ m)



D: Fibroblasts, dia 12 (Escala: 1000 μ m)

7.2.1 Passatge dels fibroblasts obtinguts de la mostra de pell

Objectiu: Passar les cèl·lules a un altre recipient més gran perquè puguin créixer i expandir-se. En el nostre cas ho passarem a un flascó.



Placa



Flascó

Materials:

- Pipetes d'aspiració, pipetes i pipetejador
- Rascador de cèl·lules
- Tub de 15 ml
- Flascó
- Centrífuga

Productes:

- PBS: L'utilitzem per netejar les restes de medi de cada pou ja que sinó el sèrum que conté el medi inhibeix el TripLE select i no es desenganxarien les cèl·lules de la placa de cultiu.
- TripLE select: Utilitzat per desenganxar les cèl·lules de la placa de cultiu. Conté dos components que no són sals:
 - EDTA: Quela²² els ions de calci i magnesi que les proteïnes d'adhesió necessiten per al manteniment de la conformació estructural.
 - Proteasa: Enzim que talla les seqüències polipeptídiques mitjançant la hidròlisi dels enllaços peptídics.

²² Quelar: Unir-se als ions metàl·lics.

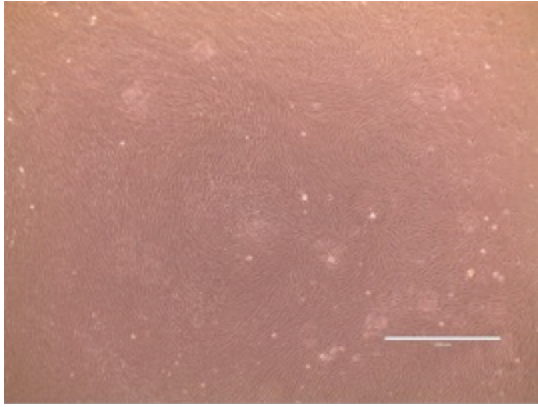
Ambdós components contribueixen a que les cèl·lules es desenganxin de la superfície de cultiu, i que també perdin les unions cèl·lula-cèl·lula.

-Medi de cultiu dels fibroblasts.

Procediment:

- 1- Aspirar el medi de cada pou.
- 2- Afegir PBS a cada un dels 6 pous.
- 3- Transferir els cobreobjectes dels 3 pous amb els trossets de pell i els fibroblasts als 3 pous restants. Tenir cura que les cèl·lules que han crescut enganxades al cobreobjectes quedin mirant cap a dalt.
- 4- Agitar per netejar les restes de medi, i aspirar el PBS.
- 5- Afegir TripLE select a cada pou per desenganxar les cèl·lules.
- 6- Posar 2-3 min a l'incubador.
*A partir d'aquí s'ha de treballar ràpidament perquè si les cèl·lules estan molta estona amb aquest reactiu es moren.
- 7- Comprovar que les cèl·lules s'estan desenganxant mirant-les amb el microscopi. Sabem que s'estan desenganxant perquè perden la forma allargada típica comuna dels fibroblasts i adopten una forma rodona i petita.
- 8- Desenganxar les cèl·lules utilitzant el rascador. És important passar el rascador per totes direccions. Fer-ho també en els cobreobjectes. S'ha de tenir en compte que no totes les cèl·lules es desenganxaran.
- 9- Aspirar tot el medi de cada pou, també els trossets de pell, i reunir-ho en el tub de 15 ml.
- 10- Centrifugar 4 min a 1000 rpm.
- 11- Aspirar tot el medi excepte les cèl·lules que han precipitat a baix gràcies a la centrifugació.
- 12- Resuspendre les cèl·lules amb medi nou i posar-ho tot en un flascó.
- 13- Anar canviant el medi dos vegades a la setmana.

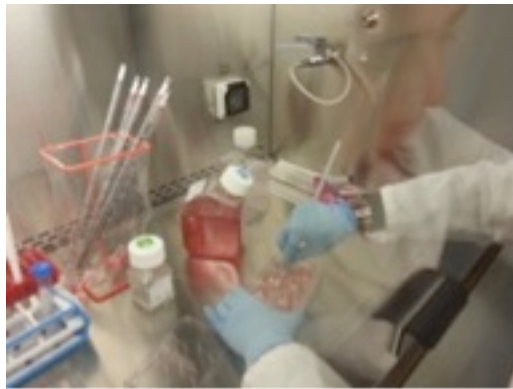
Tornar a passar les cèl·lules al cap de 7-10 dies. S'han d'intentar mantenir els trossets de pell ja que així s'aconsegueixen més fibroblasts.



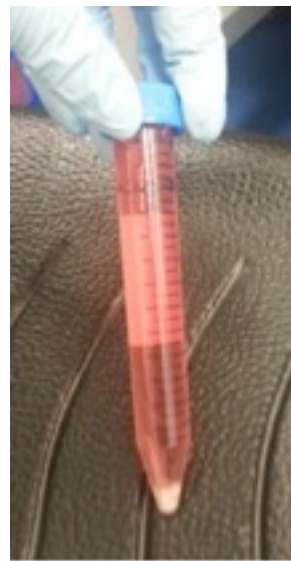
A: Fibroblasts (*Escala: 1000 μ m*)



B: Fibroblasts



C



D

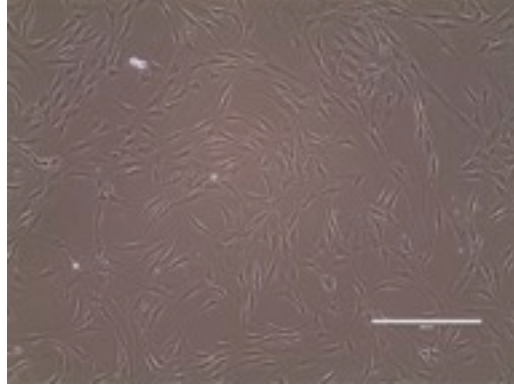
A la figura A podem veure els fibroblasts enganxats abans de començar el procediment. Seguidament, a la figura B, observem els fibroblasts desenganxats després d'haver-los posat a l'incubador durant 2-3 minuts. (Pas 6)

A la figura C observem el procediment de desenganxar les cèl·lules amb el rascador. (Pas 8)

La última figura és després de la centrifugació, on veiem el medi sense cèl·lules i les cèl·lules precipitades al fons. (Pas 10)

Resultats:

El dia després del passatge podem apreciar com els fibroblasts ja s'han enganxat al fons del flascó i tenen espai per proliferar.



Fibroblasts, dia 22 (Escala: 400 μ m)

7.2.2 Congelació dels fibroblasts obtinguts de la mostra de pell

Objectiu: Congelar una part dels fibroblasts obtinguts. Així tenim una reserva per si la reprogramació posterior no funciona o per altres estudis.

Materials:

- Pipetes d'aspiració i pipetejador
- Rascador de cèl·lules
- Tub de 15 ml
- Centrífuga
- Vials de congelació
- Contenedor de congelació Mr. Frosty: Recipient que serveix perquè les mostres no pateixin un canvi de temperatura brusc durant el procés de congelació.
- Congelador de -80 °C
- Tanc de nitrogen líquid: Et permet conservar les mostres molt de temps. Està més o menys a -183 °C

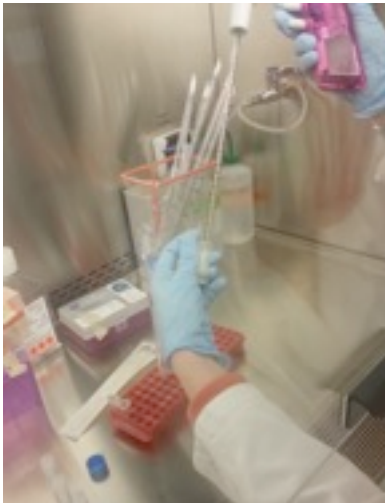
Productes:

- Medi de cultiu dels fibroblasts

-DMSO: És important perquè flexibilitza la membrana cel·lular i així quan congelem les mostres la membrana no es trenca. Si la membrana es trenca la cèl·lula es mor.

Procediment:

- 1- Desenganxar les cèl·lules que volem descongelar com s'ha descrit anteriorment i posar-les en un tub de 15 ml.
- 2- Centrifugar 4 min a 1000 rpm.
- 3- Aspirar el medi que no conté cèl·lules.
- 4- Barrejar les cèl·lules amb medi que conté un 10% de DMSO.
- 5- Distribuir en els vials de congelació.
- 6- Col·locar-los en un Mr. Frosty.
- 7- Col·locar el Mr. Frosty al congelador a -80°C . Aquest pas et garanteix que la temperatura baixi gradualment i així no es moren les cèl·lules. La temperatura de les cèl·lules baixa 1°C per minut ja que els vials de congelació estan envoltats d'alcohol isopropílic.
- 8- L'endemà cal transferir els vials de congelació al tanc de nitrogen líquid per la seva preservació durant temps llargs.



A



B

A la primera figura observem la distribució de les cèl·lules en els vials de congelació. (Pas 5)

A la figura B veiem els vials de congelació col·locats al Mr. Frosty. (Pas 6)

7.3 Reprogramació dels fibroblasts obtinguts de la mostra de pell

Objectiu: Incorporar una sèrie de factors dins dels fibroblasts que els reprogramaran per convertir-los en cèl·lules iPS.

Materials:

- Placa de cultiu cel·lular de 6 pous
- Pipetes i pipetejador
- Rascador de cèl·lules
- Tub de 15 ml
- Comptador automàtic de cèl·lules (Scepter): És una màquina que compta les cèl·lules automàticament. Es submergeix la punta dins el medi amb cèl·lules i les cèl·lules flueixen a través d'una petita obertura que hi ha al sensor. A mesura que passen les cèl·lules, la resistència augmenta i a mesura que augmenta la resistència també augmenta el voltatge. Els canvis de voltatge es registren com a pics, un per cada cèl·lula que passa. Segons la magnitud del canvi en la resistència, l'aparell és capaç de distingir si la partícula és una cèl·lula, un fragment d'aquesta o un grup de cèl·lules. El comptador té una pantalla integrada on hi surt la concentració (cèl·lules/ml) de forma que només quedarà determinar la quantitat de cèl·lules desitjada per a l'experiment.

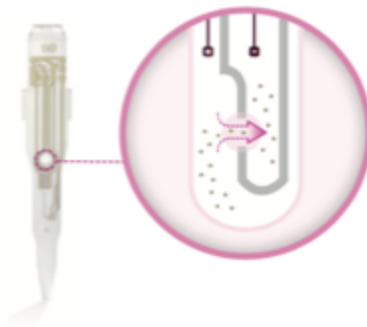


Fig. 12

Fotografia del sensor juntament a un esquema que mostra per on passen les cèl·lules.

- Centrífuga
- Tub Eppendorf
- Cubeta

-Amaxa: Màquina que fa electroporació i també nucleofecció. El seu objectiu és transferir el DNA que nosaltres barregem amb les cèl·lules al seu nucli.

Tal com s'ha explicat anteriorment (apartat 4.3.1) l'electroporació i la nucleofecció són uns procediments on s'augmenta la conductivitat elèctrica i la permeabilitat de la membrana plasmàtica cel·lular aplicant externament un camp elèctric. En aplicar el camp elèctric, es creen uns porus a la membrana de les cèl·lules que permeten l'entrada dels vectors. El DNA es transporta ràpidament al citoplasma i seguidament al nucli. Els porus es tanquen quan el pols elèctric s'acaba.

Productes:

-Gelatina: Producte gelatinós que es fa servir per crear una base dins de la placa de cultiu que millora l'adherència de les cèl·lules.

-PBS

-TripLE select

-Medi de cultiu de fibroblasts

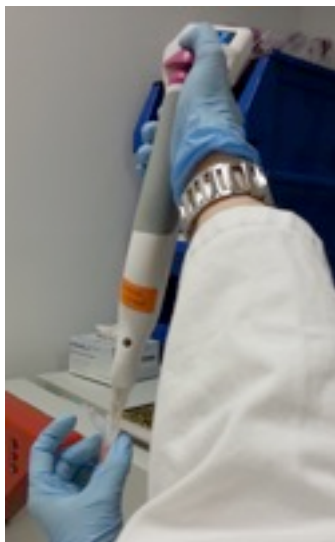
-Solució de nucleofecció: És una solució necessària per la nucleofecció que ja et ve donada per la casa comercial i depèn de la línia cel·lular que s'utilitzi.

-Plasmidis: Permeten que les cèl·lules expressin gens de pluripotència. S'introdueixen 3 plasmidis, cadascun porta part dels gens necessaris per la inducció de la pluripotència. Els plasmidis tenen un gen de resistència que s'anomena ampicil·lina que serveix per seleccionar les cèl·lules.

Procediment:

- 1- Posar una base de gelatina a un pou d'una placa de 6 pous.
- 2- Aspirar el medi del flascó on estan continguts els fibroblasts.
- 3- Netejar amb PBS.
- 4- Afegir TripLE select per desenganxar les cèl·lules. Posar a l'incubador durant 2-3 minuts. Verificar sota el microscopi que les cèl·lules s'estan desenganxant.
- 5- Afegir medi sobre el TripLE select per parar la reacció.
- 6- Desenganxar les cèl·lules utilitzant el rascador. És important passar el rascador per totes direccions per desenganxar el màxim de cèl·lules. Sempre en queden algunes d'enganxades.

- 7- Aspirar i posar-ho tot en un tub de 15 ml.
- 8- Contar les cèl·lules que tenim dins el tub utilitzant el Scepter.
- 9- Agafar el volum corresponent a 500.000 cèl·lules i transferir-les a un tub de 15 ml. Centrifugar 10 minuts a 200 G perquè les cèl·lules precipitin.
- 10- Seguidament, agafar la placa de 6 pous preparada anteriorment, aspirar la gelatina i afegir el medi de cultiu de fibroblasts. Mantenir-ho a l'incubador per tal que el medi s'escalfi.
- 11- Després de la centrifugació, aspirar el medi sense cèl·lules.
- 12- Barrejar les cèl·lules precipitades amb la solució de nucleofecció.
- 13- Transferir a un tub Eppendorf.
- 14- Afegir els plasmidis que indueixen l'expressió dels gens de pluripotència.
- 15- Transferir a una cubeta de nucleofecció vigilant que no quedin bombolles perquè sinó la corrent elèctrica no passa bé.
- 16- Inserir la cubeta a l'Amaxa i aplicar el programa corresponent.
- 17- Aspirar i transferir tot el contingut al pou de la placa de 6 pous.



A



B

A la figura A veiem la utilització del Scepter per contar les cèl·lules contingudes en el tub. (Pas 8)

A la segona figura s'insereix la cubeta a l'Amaxa per la nucleofecció de les cèl·lules. (Pas 16)

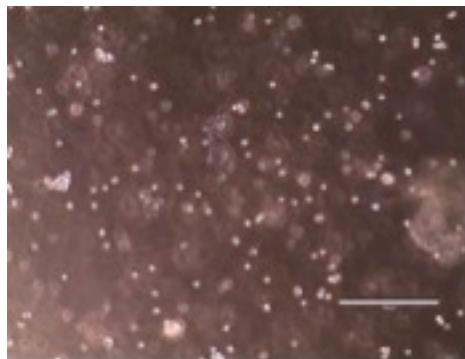
Al cap de 7 dies s'han de passar les cèl·lules a un placa de petri de 10 cm a la qual s'ha fet una base de gelatina, i s'ha d'esperar que les cèl·lules s'enganxin bé perquè sinó, al fer els canvis de medi, podríem emportar-nos les cèl·lules. El dia següent, canviar el medi de fibroblasts per medi anomenat Essential-8, que és el medi adient per cultivar les cèl·lules iPS.

Resultats:

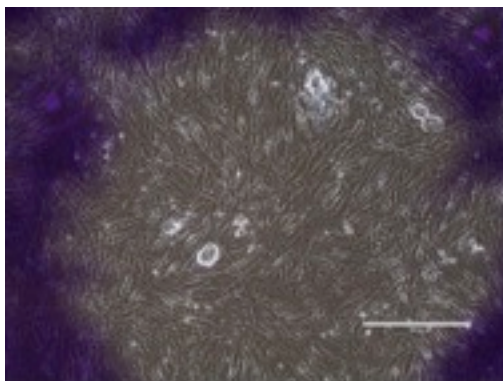
A la figura A observem els fibroblasts després de la nucleofecció. Es pot apreciar que no estan enganxats sinó que floten. Podem veure alguns grumolls de cèl·lules mortes.

A la figura B veiem els fibroblasts catorze dies després de la nucleofecció. Ja es pot veure la formació de petites colònies d'iPS.

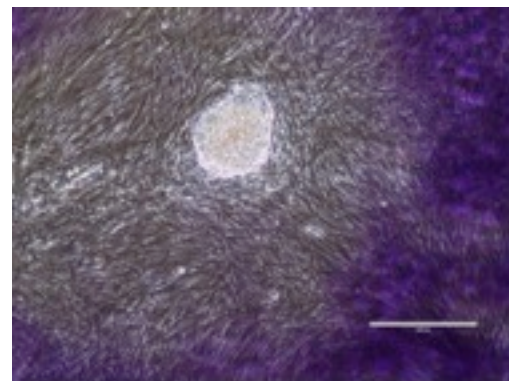
La darrera figura mostra l'aparició d'una colònia iPS ben definida, quatre dies més tard. Es pot diferenciar per la forma petita i arrodonida de les cèl·lules i la seva col·locació més junta i atapeïda.



A: Fibroblasts (Escala: 400 μ m)



*B: Fibroblasts, dia 14
(Escala: 400 μ m)*



C: Colònia d'iPS, dia 18 (Escala: 400 μ m)

7.3.1 Aïllament de les colònies de cèl·lules iPS

Objectiu: Aïllar les colònies amb millor morfologia i traslladar cada una a un pouet perquè pugui créixer independentment.

Materials:

- Microscopi amb marcador
- Pipetes i pipetejador
- Puntes per picar colònies, tenen el forat més gros que les puntes normals perquè no es trenquin les colònies
- Placa de cultiu cel·lular de 4 pous

Productes:

- Matrigel: Producte gelatinós que es fa servir per crear una base dins de la placa de cultiu que millora l'adherència de les cèl·lules. Es pot reutilitzar una vegada. És millor que la gelatina a l'hora de cultivar les cèl·lules iPS.
- Medi Essential-8: Conté 8 components essencials per al creixement de les cèl·lules iPS i per al manteniment de la pluripotència.

Procediment:

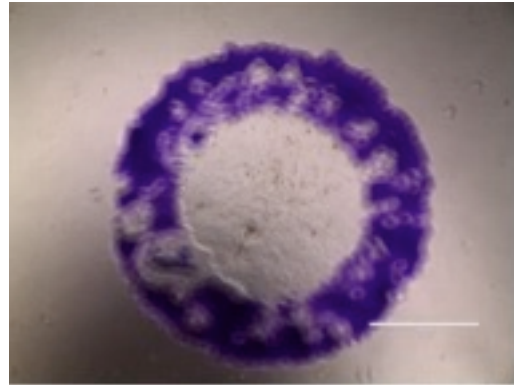
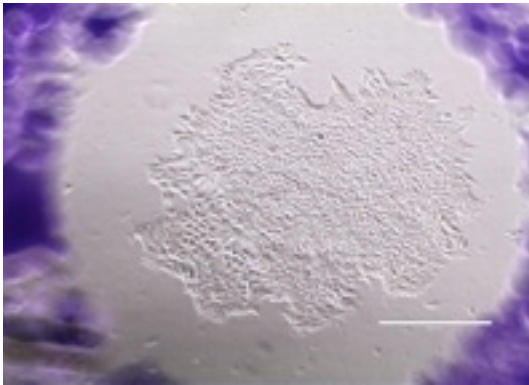
- 1- Mirar les colònies i triar les més adients. Amb un marcador especial anar marcant les colònies escollides.
- 2- Aplicar la capa de matrigel als pous per fer un substrat adient per les cèl·lules.
- 3- Després d'haver deixat que polimeritzi, aspirar el matrigel i afegir medi.
- 4- Rascar amb cura cadascuna de les colònies escollides anteriorment amb les puntes adients i aspirar la colònia amb una mica de medi de cultiu.
- 5- Col·locar una colònia a cada pou preparat anteriorment amb matrigel. A partir d'aquí, a cada colònia aïllada l'anomenem clon.

Quan ja s'han retirat totes les colònies escollides és important afegir medi a la placa general ja que al treure les colònies també hem tret medi.

Resultats:

A la figura A veiem l'aspecte del clon cinc dies després d'haver picat la colònia escollida de la placa amb els fibroblasts.

La figura B és set dies després d'haver-la picat, podem veure com va creixent amb rapidesa (el cercle lila és el mateix en els dos casos i s'observa com a la imatge B la colònia ja està sobrepassant els límits interns del cercle). En aquest punt és recomanat fer un nou passatge.



A: Colònia d'iPS, dia 5 (Escala: 400 µm) B: Colònia iPS, dia 7 (Escala: 1000 µm)

7.3.2 Passatge dels clons de cèl·lules iPS

Objectiu: Passar els clons a un altre recipient més gran perquè puguin seguir expandint-se.

Després de picar les colònies, l'únic que s'ha d'anar fent és controlar el creixement dels clons i anar expandint l'espai (canviar-los de pouet) perquè puguin créixer. El fet de canviar les cèl·lules de pouet s'anomena passatge. Això ho haurem de fer en 3 situacions:

- 1) Quan observem cèl·lules flotant, que es veuen com puntets negres al microscopi, hem de fer un passatge del clon, ja que les cèl·lules ja no tenen espai per créixer.
- 2) També és important fer un passatge dels clons quan les colònies es toquen entre elles perquè, en no tenir espai per créixer, es diferencien espontàniament, que és quelcom que volem evitar.
- 3) Quan fa més de 7 dies que estan en un mateix pouet, el matrigel ja no està en perfectes condicions. Llavors també cal canviar-los de pouet.

Materials:

- Pipetes d'aspiració, pipetes i pipetejador
- Rascador de cèl·lules
- Tub de 15 ml
- Centrífuga
- Placa de 6 pous

Productes:

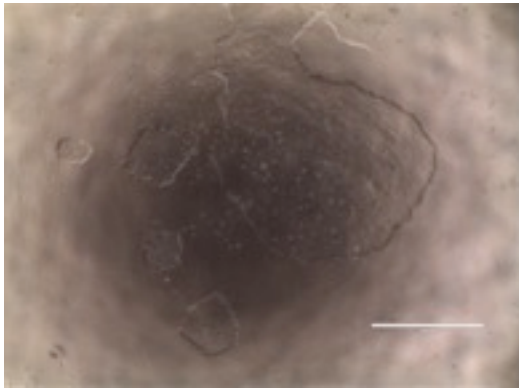
- PBS
- EDTA 0,5 mM: Per fer el passatge de les cèl·lules iPS és millor utilitzar EDTA sol en lloc de TripLE select, ja que és menys agressiu.
- Essential-8
- Matrigel

Procediment:

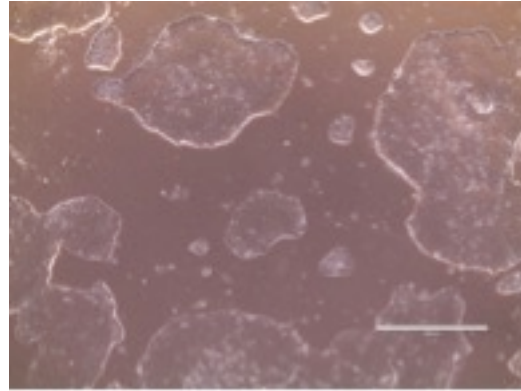
- 1- Aspirar el medi de cada pou.
- 2- Afegir PBS a cada un dels pous que vulguem utilitzar per netejar les restes de medi.
- 3- Agitar perquè es netegi bé i aspirar el PBS.
- 4- Afegir EDTA a cada pou per desenganxar les cèl·lules.
- 5- Deixar reposar 3-4 min a temperatura ambient.
- 6- Afegir medi Essential-8.
- 7- Desenganxar les cèl·lules utilitzant el rascador. És important passar el rascador per totes direccions fent una gradeta.
- 8- Traspasar una part de les cèl·lules a un nou pou que haurem recobert prèviament amb matrigel.
- 9- Anar canviant el medi cada dia.

Resultats:

A la figura A observem el clon quatre dies després del segon passatge. Podem veure una colònia gran amb forma arrodonida envoltada d'altres colònies petites. A la segona figura podem veure el mateix clon al sisè passatge. Comparant amb la fotografia A podem observar com ha augmentat molt de volum.



*A: Colònies iPS, dia 4 passatge 2
(Escala: 1000 μm)*



*B: Colònies iPS, sisè passatge
(Escala: 1000 μm)*

7.3.3 Congelació de cèl·lules iPS

La congelació de les cèl·lules iPS es fa exactament igual que el procediment explicat anteriorment pels fibroblasts però hi ha algunes petites diferències.

Les cèl·lules es desenganxen seguint el protocol descrit pel passatge de les colònies de cèl·lules iPS. La major diferència és que, en fer la gradeta per desenganxar les cèl·lules, s'ha de fer més grossa ja que és necessari que les cèl·lules iPS es mantinguin en grup perquè sinó no sobreviuen el procés de congelació i descongelació.

7.3.4 Descongelació de cèl·lules iPS

Objectiu: Descongelar les cèl·lules iPS per mantenir i expandir els clons.

Material:

- Pipetes i pipetejador
- Tub de 15 ml
- Bany de 37 °C
- Centrífuga
- Placa de cultiu cel·lular de 6 pous

Productes:

- Matrigel
- Medi Essential-8

Procediment:

- 1- Després d'haver aplicat la capa de matrigel, aspirar.
- 2- Posar medi Essential-8 a cada pou.
- 3- Posar medi Essential-8 en un tub de 15 ml.
- 4- Treure els vials de congelació del tanc de nitrogen líquid.
- 5- Ràpidament submergir-los parcialment dins el bany de 37 °C per tal que es descongelin el més ràpid possible.
- 6- Barrejar les cèl·lules amb el medi del tub de 15 ml.
- 7- Centrifugar 5 minuts a 300 G.
- 8- Aspirar el medi sense cèl·lules.
- 9- Barrejar les cèl·lules precipitades amb medi Essential-8.
- 10- Transferir les cèl·lules amb el medi als pous. Distribuït equitativament.
- 11- Guardar a l'incubador.

7.4 Caracterització de les cèl·lules iPS

7.4.1 Bases teòriques de les tècniques utilitzades per la caracterització de les cèl·lules iPS

Per tal de comprovar si les cèl·lules reprogramades expressaven gens característics de cèl·lules iPS, es van investigar els nivells d'expressió dels gens NANOG, Sox2 i Oct4 en les cèl·lules recent generades utilitzant la tècnica de la PCR quantitativa. Per tal de mirar el nivells d'expressió d'un gen, primer cal extreure RNA de les cèl·lules, convertir l'RNA en DNA complementari, i llavors es pot utilitzar aquest DNA sintetitzat com a motlle per la PCR quantitativa. A continuació es descriuen les bases teòriques de les tecnologies utilitzades i més endavant s'expliquen els protocols utilitzats al laboratori i els resultats obtinguts.

7.4.1.1 Transcripció inversa

En el nostre cas, abans de fer la PCR en temps real, vam fer la transcripció inversa que consisteix en passar l'RNA a DNA complementari. Aquest pas és important perquè la tècnica de PCR només amplifica DNA.

En tenir el DNA complementari és necessari eliminar el DNA genòmic. L'eliminació és essencial perquè es puguin obtenir uns resultats acurats sobre l'expressió dels gens. Si hi quedés DNA genòmic, els encebadors amplificarien el DNA complementari i el genòmic donant uns resultats equivocats.

7.4.1.2 La PCR

La PCR (reacció en cadena de la polimerasa) és una tècnica que serveix per obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment de DNA específic per poder-lo estudiar.

El procés de la PCR consisteix en general en aproximadament uns 40 canvis repetits de temperatura anomenats cicles. Cada cicle té 2-3 passos de canvi de temperatura.

-Desnaturalització: La mostra s'incuba a 95 °C. Això fa que el DNA perdi la seva estructura d'hèlix i que se separin les dues cadenes.

-Al segon pas es disminueix la temperatura al voltant de 60 °C i això permet l'alineament i unió dels encebadors al DNA motlle. Els encebadors actuen com a límits de la regió de la molècula per amplificar.

-Extensió: La temperatura augmenta fins als 72 °C que és la temperatura òptima pel funcionament de la polimerasa. La polimerasa és un enzim que actuarà prenent el DNA motlle per sintetitzar la cadena complementària i partint de l'encebador com a suport inicial necessari per la síntesi del nou DNA. La polimerasa sintetitza la nova cadena de DNA afegint els desoxiribonucleòtids trifosfats (dNTP), que són els monòmers que conformen el DNA (A, T, G i C).

Tot el procés de la PCR està automatitzat mitjançant un aparell que s'anomena termociclador, que permet escalfar i refredar els tubs segons la temperatura necessària a cada etapa de la reacció.

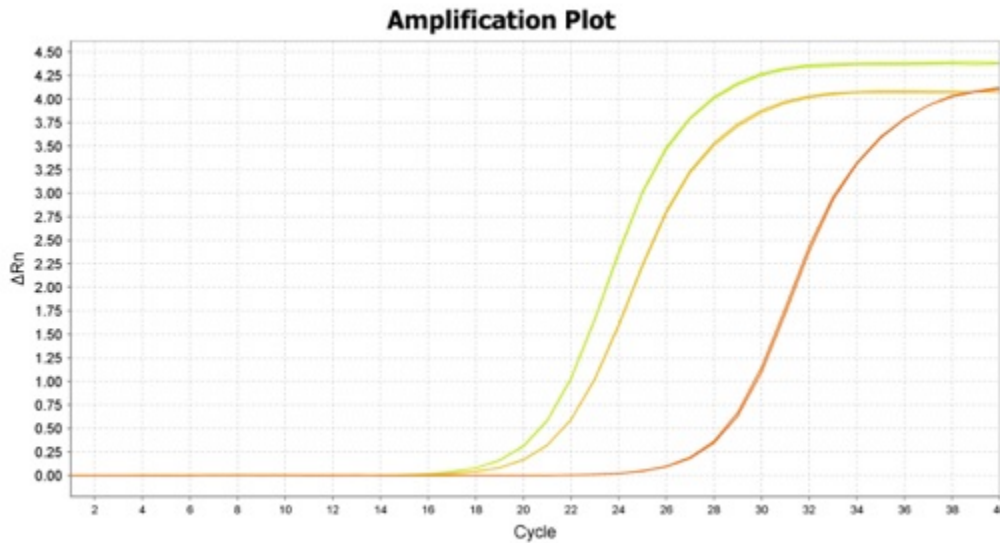
Un cop s'acaba la PCR, per tal de visualitzar el DNA amplificat, es pot córrer part del volum de la reacció en un gel d'agarosa. Un gel d'agarosa és una matriu porosa

semblant a la gelatina que permet separar les molècules de DNA segons la seva mida. En aplicar una corrent elèctrica, la mostra, que té càrrega negativa, correrà cap al pol positiu. Després de córrer el gel, aquest es pot tenyir amb molècules que s'intercalen al DNA (com per exemple el bromur d'etidi). Quan s'exposa el gel tenyit a la llum ultraviolada, es pot veure la fluorescència del bromur d'etidi, i per tant, podem veure el nostre DNA. Si només s'ha amplificat un producte durant la PCR, només veurem una banda. Si s'ha amplificat més d'un producte (amplificació inespecífica) veurem més d'una banda. És possible quantificar les bandes de gel mitjançant fluorimetria però la quantificació sempre ha de ser al final de la reacció de PCR, després de l'últim cicle. Això fa que la quantificació no sigui acurada, ja que després de tots els cicles de PCR, alguns dels components de la reacció es poden haver acabat, la polimerasa pot haver perdut eficiència, o poden haver-hi hagut altres problemes que no es poden detectar al final de la reacció.

7.4.1.3 La PCR quantitativa

Per tal de superar tots els problemes de la PCR convencional, i per tant, poder quantificar la quantitat de DNA, es va desenvolupar la PCR a temps real, també anomenada PCR quantitativa o qPCR. Aquesta tècnica és la que hem utilitzat en aquest treball.

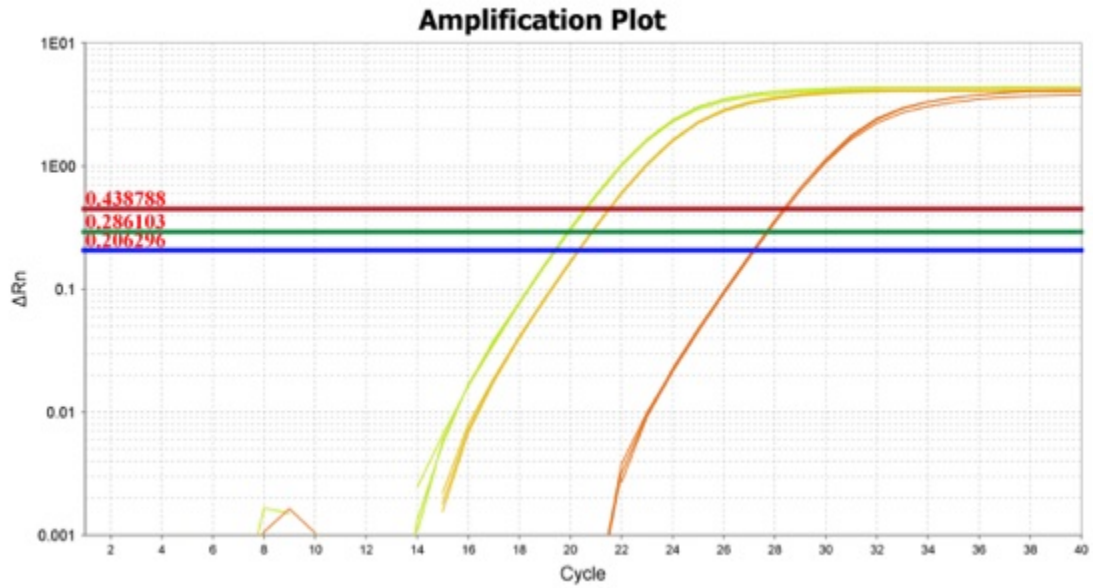
La qPCR també es duu a terme en un termociclador, que varia la temperatura de la mostra tal com s'ha descrit per la PCR convencional. La principal diferència que trobem amb la PCR convencional és que la qPCR quantifica el DNA després de cada cicle. Això és possible gràcies a que, juntament amb els altres components de la PCR, s'afegeix un fluorocrom anomenat SYBR Green que és capaç d'unir-se al DNA de doble cadena i emetre fluorescència. L'aparell de qPCR fa incidir sobre cada mostra un feix de llum i detecta la fluorescència emesa pel fluorocrom excitat després de cada cicle. A mida que vagin passant els cicles, s'anirà multiplicant el DNA, i per tant, més molècules de SYBR Green s'hi podran enganxar i més fluorescència detectarà l'aparell. El software de l'aparell mostra un gràfic d'amplificació que permet veure l'acumulació de producte durant tota la PCR.



Gràfica 1

A la **gràfica 1** observem la corba d'amplificació de 3 gens diferents en escala lineal. Al principi de la gràfica podem veure una línia plana que indica que no hi ha fluorescència. A partir del cicle 18 podem veure com la fluorescència comença a augmentar per 2 dels 3 gens. Pel tercer gen, la fluorescència comença a augmentar més tard. A mesura que passen els cicles, el número de còpies va augmentant, per tant el número de molècules de SYBR Green enganxades també augmenta, cosa que implica que la fluorescència també ascendeix. Cap als últims cicles la corba es satura i torna a formar una línia plana.

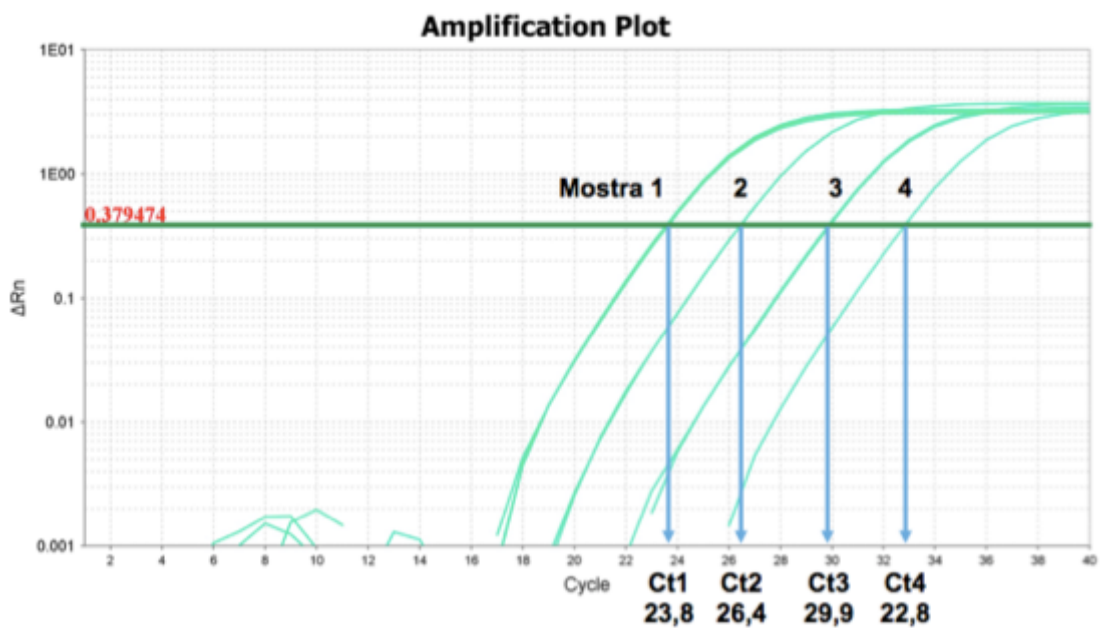
Per tal de determinar la quantitat relativa de DNA a la mostra, el programa ajusta una línia de base, anomenada en anglès *threshold*, en una zona de la corba quan l'amplificació és lineal. Per poder ajustar aquesta línia millor, cal observar la corba d'amplificació en escala logarítmica, tal i com es mostra a la figura següent.



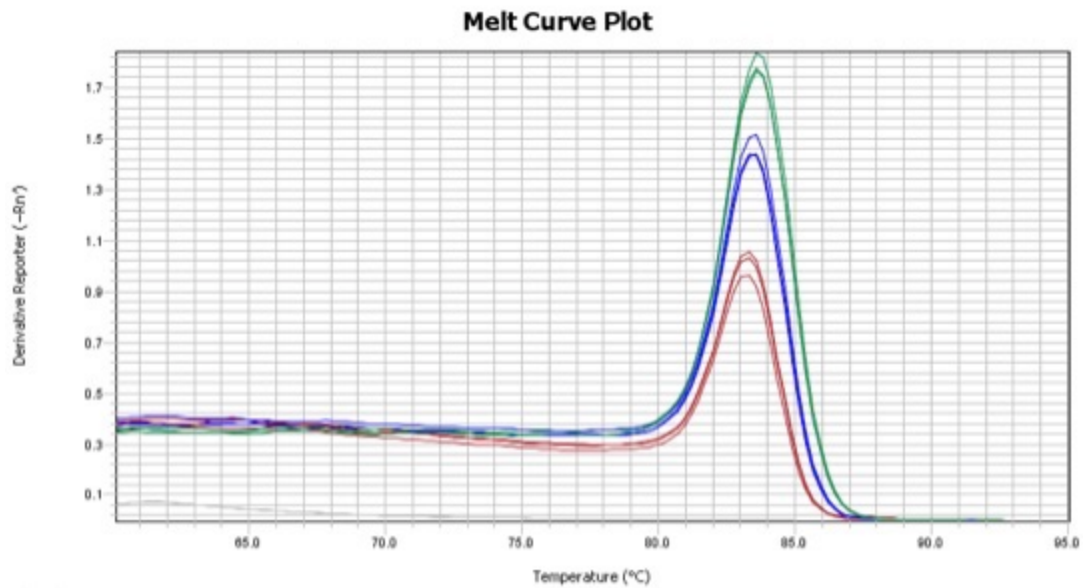
Gràfica 2

A la gràfica 2 podem veure els 3 gens diferents. A cada gen li correspon una línia basal diferent.

La intersecció de la línia basal amb la corba d'amplificació ens dóna un número de cicle (també anomenat Ct). La quantitat relativa de DNA d'una mostra problema en relació amb una mostra control es calcula utilitzant els valors de Ct d'ambdues mostres (**Gràfica 3**).



Gràfica 3



Gràfica 4

Quan treballem amb SYBR Green, donat que es pot enganxar a qualsevol molècula de DNA, cal comprovar que la PCR ha estat específica, i que per tant només s'ha amplificat el fragment desitjat. Es poden identificar els fragments amplificats de DNA concrets a partir de la seva temperatura de fusió. Després de la qPCR, la mostra es sotmet a una rampa de temperatura ascendent. Quan el fragment arriba a la seva temperatura de fusió, les dues cadenes es separen, fet que fa que el fluorocrom es desenganxi i deixi d'emetre fluorescència. Si a la nostra mostra només s'ha amplificat un mateix producte, totes les dobles cadenes se separaran a la vegada i el software ens mostrarà una gràfica amb un sol pic.

A la **gràfica 4** només podem veure un pic, que correspon al DNA. Això significa que només tenim un producte, i per tant l'amplificació ha estat específica.

7.4.2 Aplicació pràctica

7.4.2.1 Extracció de l'RNA

Objectiu: Aïllar l'RNA de les cèl·lules iPS generades.

Material:

- Columnes comercials per l'aïllament de l'RNA
- Pipetes i pipetejador
- Centrífuga
- Tub de recol·lecció
- Tub de 15 ml

Productes:

- Tampons químics comercials per l'aïllament de l'RNA
- Etanol 70%
- Aigua sense RNases
- Enzim DNasa

Procediment:

1. Desenganxar les cèl·lules seguint el protocol explicat al punt 7.3.2 i recollir-les en un tub de 15 ml.
2. Centrifugar el tub on hi ha les cèl·lules.
3. Aspirar tot el medi excepte les cèl·lules que han precipitat a baix gràcies a la centrifugació.
4. Afegir el tampó adequat per trencar la membrana de les cèl·lules.
5. Afegir etanol per precipitar el DNA i l'RNA.
6. Posar-ho tot a la columna i centrifugar. Aquesta columna té una membrana on s'enganxa el DNA i l'RNA.
7. Afegir el tampó corresponent que renta la columna.
8. Afegir l'enzim DNasa que degrada el DNA directament a la columna. Deixar 15 minuts a temperatura ambient perquè l'enzim funcioni.
9. Fer dos rentats amb un tampó de rentats.

10. Centrifugar perquè quedi la membrana de la columna seca.
11. Afegir aigua sense RNases (perquè no es degradi l'RNA).
12. Posar la columna dins d'un tub de recol·lecció.
13. Centrifugar per eluir l'RNA en el tub de recol·lecció.
14. Mantenir el tub amb l'RNA en gel.

7.4.2.2 Quantificació amb Nanodrop

Objectiu: Determinar la concentració de les mostres d'RNA.

Material:

-Nanodrop: És un tipus d'espectrofotòmetre que ens permet treballar amb un volum de mostra molt petit. Serveix per mesurar la concentració de diferents substàncies en una mostra. L'aparell fa incidir un feix de llum monocromàtica a través de la nostra mostra i mesura la quantitat de llum que la mostra absorbeix. Això ens permet saber indirectament quina quantitat de la substància que ens interessa és present a la mostra.

-Pipeta

-Gasa

Productes:

-Mostres d'RNA

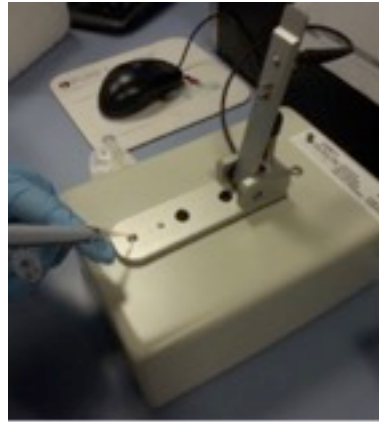
-Aigua

-Solució d'elució (aigua sense RNases)

Procediment:

1. Posar una gota d'aigua amb a pipeta sobre el sensor per mirar que la màquina funcioni bé. Ha d'estar proper a 0.
2. Eixugar el sensor.
3. Posar una gota de solució d'elució per fer el blanc. Això ens serveix per saber l'absorbància basal que presenta la solució en la qual tenim l'RNA.
4. Eixugar el sensor.
5. Posar una gota de la mostra per mirar la seva concentració i puresa. Apuntar els resultats.

6. Eixugar el sensor.
7. Posar una gota d'aigua per rentar el sensor. Comprovar que la lectura dóna propera a 0.



Nanodrop

Resultats:

Es van analitzar 3 mostres: una mostra de cèl·lules iPS control, un dels clons de cèl·lules generats, i els fibroblasts originals. Els resultats de la quantificació amb el nanodrop van ser els següents:

Mostra	Concentració (ng/μl)	Proporció (A260/A230)	Proporció (A260/A280)
Control	587.3	2.02	2.07
Clon	786.6	2.04	2.10
Fibroblasts	525.4	2.01	1.90

Els resultats mostren que les mostres tenien una concentració suficient per poder procedir amb la transcripció inversa. Pel que fa a la qualitat, els valors obtinguts ens indiquen que l'RNA és pur.

La proporció d'absorbància a 260 nm i 280 nm és utilitzada per avaluar la puresa de l'RNA i el DNA. La proporció considerada com a pura per l'RNA és d'aproximadament 2. Si la proporció estigués per sota indicaria la presència de proteïnes, fenol o altres contaminants.

La proporció d'absorbància a 230 nm i 260 nm és una mesura secundària de la puresa de l'àcid nucleic. Els seus valors són més elevats que els comentats

anteriorment, estan dins el rang d'entre 2 i 2,2. Si la proporció està per sota també indica la presència de contaminants.

7.4.2.3 Transcripció inversa

Objectiu: Convertir l'RNA a DNA complementari.

Material:

- Micropipetes i puntes
- Termociclador
- Tapa termoresistent
- Centrífuga

Productes:

- gDNA wipeout*: Serveix per eliminar les restes de DNA genòmic que hagin pogut quedar a la nostra mostra d'RNA.
- Aigua sense RNases: És important que l'aigua no tingui RNasa perquè és l'enzim encarregat de degradar l'RNA.
- Tampó de reacció: Conté tots els components necessaris per tal que l'enzim funcioni adequadament, i també els nucleòtids.
- Transcriptasa inversa: És l'enzim que catalitza el pas d'RNA a DNA complementari.
- Encebadors: Són una barreja d'oligo-dT i d'altres encebadors escollits a l'atzar. Serveixen per amplificar tot l'RNA.

Procediment:

1. Barregem el *gDNA wipeout*, l'RNA i l'aigua sense RNases en un pou d'una placa de 96 pous.
2. Centrifugar la placa perquè tots els components vagin al fons de la placa ja que sinó no es podria donar la reacció.
3. Posar la tapa a la placa perquè pugui anar al termociclador i resisteixi a les diferents temperatures. Segellar bé per tal d'evitar l'evaporació.
4. Posar al termociclador durant 2 minuts a 42 °C. Aquest pas serveix per eliminar el DNA genòmic.

5. Barregem el tampó de reacció, la transcriptasa inversa i els encebadors amb la mostra sense DNA genòmic.
6. Centrifugar la placa perquè tots els components vagin al fons de la placa.
7. Posar al termociclador durant 15 minuts a 42 °C per tal que es doni la reacció de transcripció inversa, i després 3 minuts a 95 °C per inactivar l'enzim.
8. Després d'aquest temps, la mostra ja està a punt per ser utilitzada per la qPCR. Es guarda la placa a la nevera (4°C) fins que s'hagi d'utilitzar.



A



B

A la figura A veiem la mostra abans de posar-la al termociclador amb la tapa col·locada.

La figura B mostra el termociclador.

7.4.2.4 qPCR

Objectiu: Amplificar el DNA complementari per mirar la presència dels gens de pluripotència.

Material:

-Micropipetes i puntes

-Film òptic: Permet que l'aparell de qPCR pugui registrar la fluorescència que emet a mostra.

-Centrífuga

-Aparell de qPCR

Productes:

-*Master Mix*: Solució que conté la polimerasa i els nucleòtids necessaris perquè es pugui amplificar el DNA i el fluorocrom SYBR Green.

-DNA complementari

-Aigua

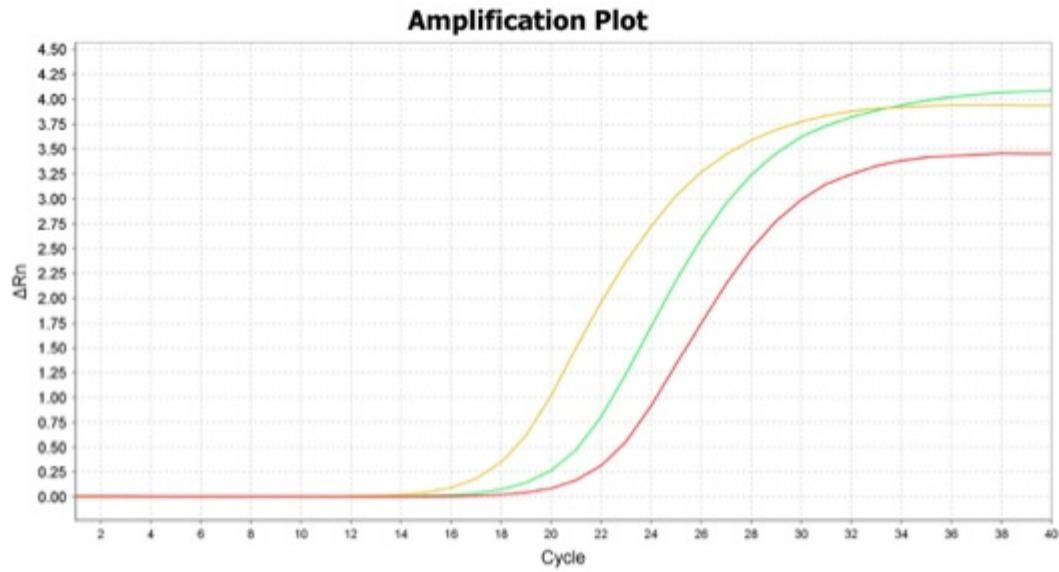
-Encebadors

Procediment:

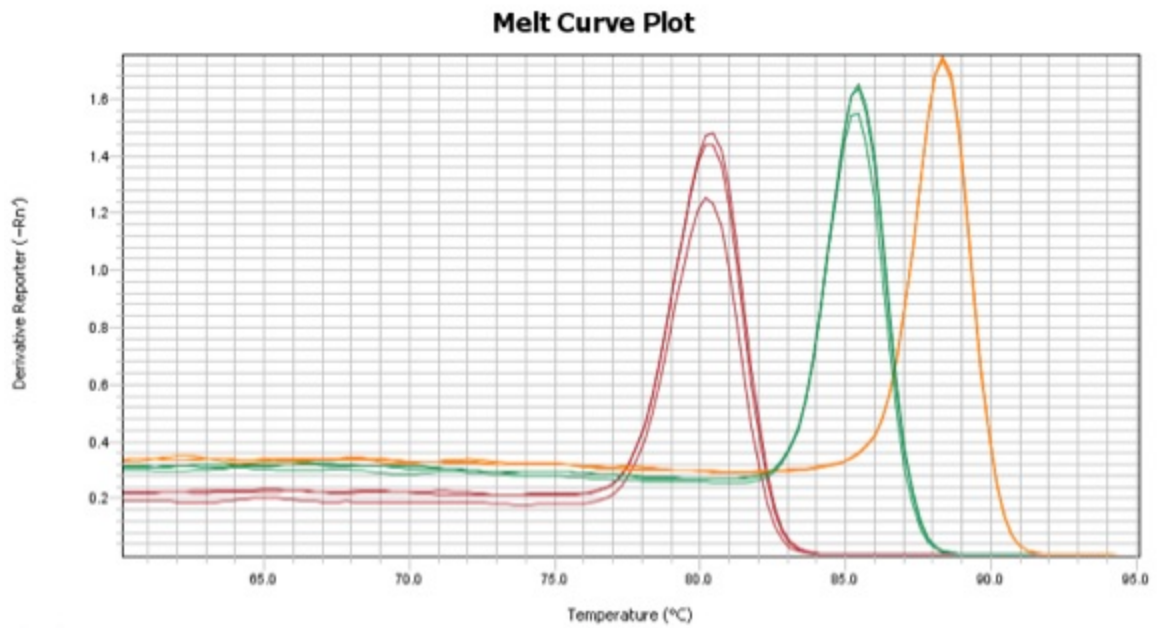
1. Barrejar el DNA complementari amb la *Master Mix*, l'aigua i els encebadors en les proporcions adequades segons el gen que vulguem estudiar.
2. Repartir en els pous d'una placa adequada per la qPCR.
3. Col·locar el film òptic sobre la placa.
4. Centrifugar perquè tots els reactius vagin al fons del pou.
5. Posar a l'aparell de qPCR programat adequadament.
6. Un cop hagi finalitzat l'amplificació, analitzem la mostra amb el programa bioinformàtic.

Resultats:

La **gràfica 5** és un exemple de les corbes d'amplificació obtingudes per una de les mostres analitzades. Cada línia representa un gen. En aquesta gràfica podem observar que hi ha hagut una amplificació correcta. Primer observem la línia plana que indica que no hi ha fluorescència. A partir del cicle 16 podem veure com la fluorescència comença a augmentar, pel primer gen. Pel segon gen comença a augmentar al cicle 18 i pel tercer gen al cicle 20. A mesura que passen els cicles el número de còpies va augmentant, per tant el número de molècules de SYBR Green enganxades també augmenta, cosa que implica que la fluorescència també ascendeix. Cap als últims cicles la corba es satura i torna a formar una línia plana.

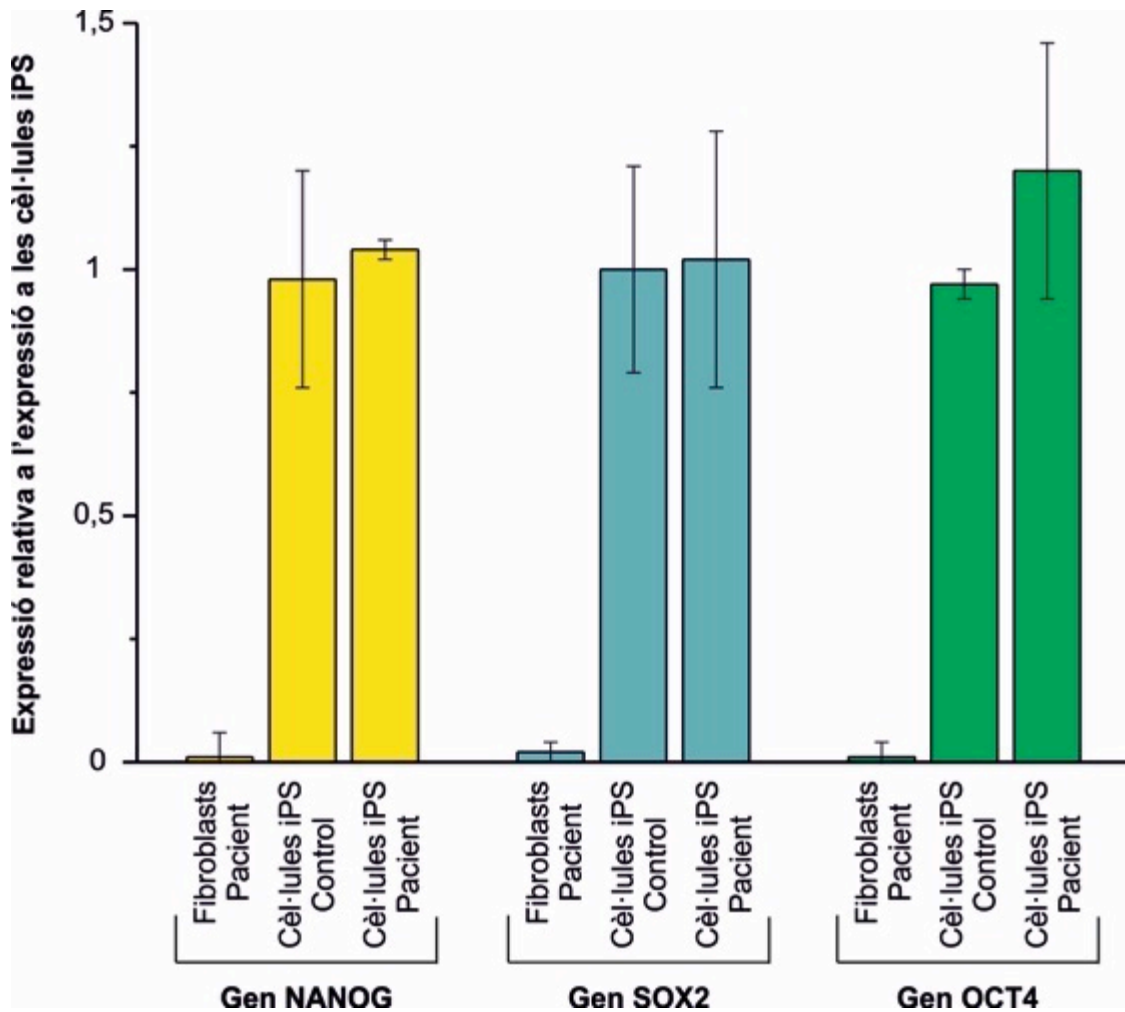


Gràfica 5



Gràfica 6

A la **gràfica 6** veiem que pels 3 gens només s'ha amplificat un producte ja que observem un sol pic per cadascun d'ells (cada color representa un gen diferent).



Gràfica 7. Nivells d'expressió dels gens de pluripotència

En la **gràfica 7** veiem l'expressió de 3 gens característics de les cèl·lules iPS. Cada gen ha estat estudiat en fibroblasts, en cèl·lules iPS control i en les cèl·lules del pacient del nostre estudi. Podem observar que en els fibroblasts l'expressió dels gens de pluripotència és pràcticament nul·la, en canvi, en els altres dos casos l'expressió és molt elevada. A més, l'expressió dels gens en les cèl·lules iPS del pacient és molt semblant a l'obtinguda en les cèl·lules iPS control.

Per tant, queda demostrat que les cèl·lules iPS que s'han generat a partir de la pell del pacient expressen els gens de pluripotència.

7.5 Diferenciació de les cèl·lules iPS a cardiomiòcits

Objectiu: Diferenciar les cèl·lules iPS a cardiomiòcits. Sabrem que la tècnica ha funcionat correctament quan veiem aquests cardiomiòcits bategant.

Material:

Dia 0:

- Pipetes i pipetejador
- Puntes estèrils
- Tub de 15 ml
- Tub Eppendorf
- Comptador automàtic de cèl·lules (Scepter)
- Tub de 50 ml
- Centrífuga
- Dipòsit per reactius estèril
- Pipeta multicanal i puntes amb filtre
- Placa de 96 pouets en V: Té forma de V perquè les cèl·lules iPS formin una esfera al fons.
- Rascador de cèl·lules

Dia 2:

- Pipetes i pipetejador
- Dipòsit per reactius estèril
- Pipeta multicanal i puntes amb filtre

Dia 4:

- Pipetes i pipetejador
- Dipòsit per reactius estèril
- Pipeta multicanal i puntes amb filtre
- Placa de 96 pouets en U: Té forma de U perquè les colònies es puguin enganxar al fons i tota la massa bategui.

Productes:

Dia 0:

-Medi RIP: Medi determinat per afavorir la diferenciació. Aquest medi conté el medi basal RPMI que ajuda en el creixement dels cultius cel·lulars, ITS, és un suplement per reduir la quantitat de sèrum fetal boví, lípids, 1-thioglycerol, PVA, BMP4, FGF i FBS.

-PBS

-EDTA

-Medi BGK: Medi de cultiu

Dia 2:

-Medi RD: Aquest medi està compost d'RPMI, 1-thioglycerol i FBS.

Dia 4 i següents:

-Medi RI: Està compost per RPMI, ITS, lípids i 1-thioglycerol.

El medis diferents en aquest cas no tenen només l'objectiu d'alimentar i fer créixer les cèl·lules sinó que estan pensats estratègicament. Cada un té una composició diferent i amb la combinació de tots els medis obtenim com a resultat la diferenciació a cardiomiòcits.

Procediment:

Dia 0:

- 1- Aspirar el medi de dos pous d'una placa de 6 pous on haurem crescut les cèl·lules iPS.
- 2- Posar PBS per rentar i aspirar.
- 3- Posar EDTA i esperar 3 minuts perquè faci el seu efecte.
- 4- Aspirar i afegir el medi BGK.
- 5- Desenganxar les cèl·lules amb el rascador de cèl·lules. Cal rascar en vertical, horitzontal i en les dues diagonals. És important intentar fer-ho molt precís i fi perquè quedin cèl·lules simples per poder-les contar bé.
- 6- Recollir-ho tot en un tub de 15 ml.

- 7- Fem una dilució 1:2 per poder contar més bé amb el Scepter. Passar una part de les cèl·lules a un tub Eppendorf i afegir el mateix volum de medi BGK.

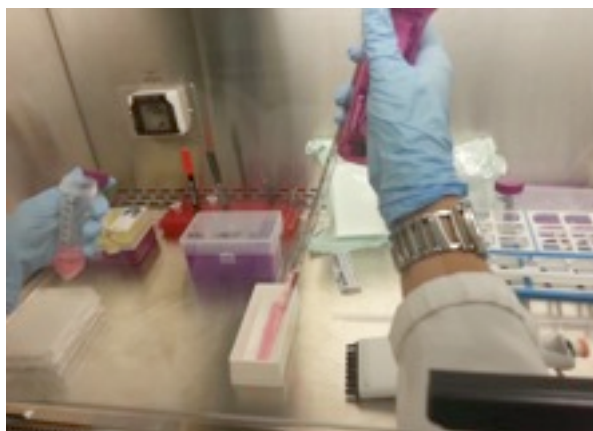
El resultat del recompte és de $1'093 \times 10^5$ cèl·lules/ml. Com que hem fet una dilució 1:2 per comptar, la concentració de cèl·lules al tub de 15 ml és de $2'186 \times 10^5$ cèl·lules/ml.

- 8- Volem posar 6000 cèl·lules a cadascun dels pouets d'una placa de 96 pouets. Cal comptar quantes cèl·lules necessitem per 100 pouets. En total volem 600.000 cèl·lules.

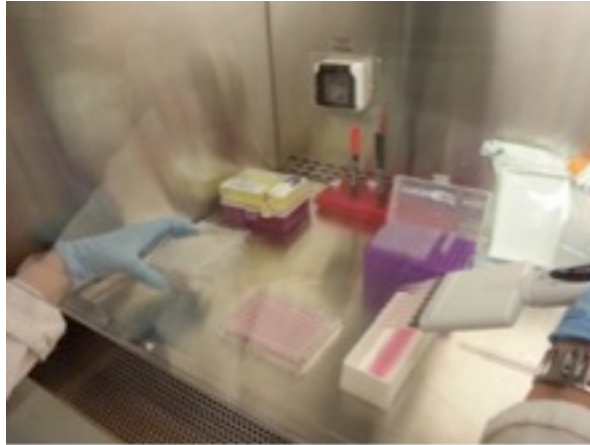
$$600.000 \text{ cèl·lules} \times 1 \text{ ml} / 2'186 \times 10^5 \text{ cèl·lules} = 3 \text{ ml}$$

Llavors, per agafar 6×10^5 cèl·lules del tub de 15 ml, s'han de pipetejar 3 ml de volum.

- 9- Transferir 3 ml al falcon de 50 ml i centrifugar 4 minuts a 160 G.
- 10- Treure el medi sense cèl·lules i resuspendre amb cura les cèl·lules amb medi RIP.
- 11- Passar-ho a un dipòsit per a reactius estèril des d'on, amb la pipeta multicanal i puntes amb filtre, ho repartim per dues plaques de 96 pouets en forma de V.
- 12- Centrifugar les plaques 5 minuts a 950 G i posar-ho a l'incubador. Donada la forma en V dels pouets, les cèl·lules s'agreguen en forma esfèrica.



A



B

A: Passar el medi amb les cèl·lules al dipòsit per reactius estèril. (Pas 9)

B: Repartir a les dues plaques de 96 pouets en V utilitzant la pipeta multicanal. (Pas 10)

Dia 2:

Al cap de 48 hores, canviar el medi a medi RD i posar a incubar a 37 °C. Aquest canvi de medi es fa aspirant el medi amb puntes de filtre utilitzant la pipeta multicanal. Posteriorment, s'afegeix el medi nou (anomenat RD) també amb la multicanal i puntes de filtre.

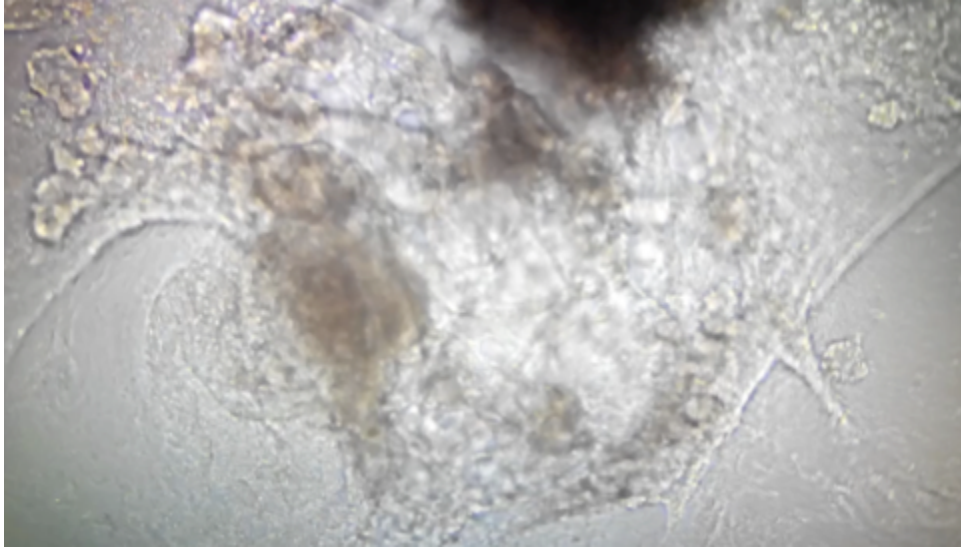
Dia 4:

Al cap de 48 hores més, canviar el medi per RI tal com s'ha explicat anteriorment. Després, pipetejar amunt i avall amb cura per desenganxar les esferes de cèl·lules i transferir-les a una placa de 96 pouets en forma de U utilitzant puntes per picar colònies i la pipeta multicanal. Deixar unes 72-96 hores a l'incubador.

Passat aquest temps s'han d'anar observant els cultius en busca de colònies bategant. S'ha d'anar canviant el medi cada 3-4 dies per medi RI nou.

Resultats:

En la fotografia següent podem veure una colònia de cardiomiòcits.



Cardiomiòcits

Després de tot aquest procés, en el QR següent, podem observar cardiomiòcits bategant.

Cada colònia batega de manera independent i irregularment. Hi ha colònies que bateguen més ràpid i d'altres que no tant.

<https://www.youtube.com/watch?v=7nYDV1OckDc>



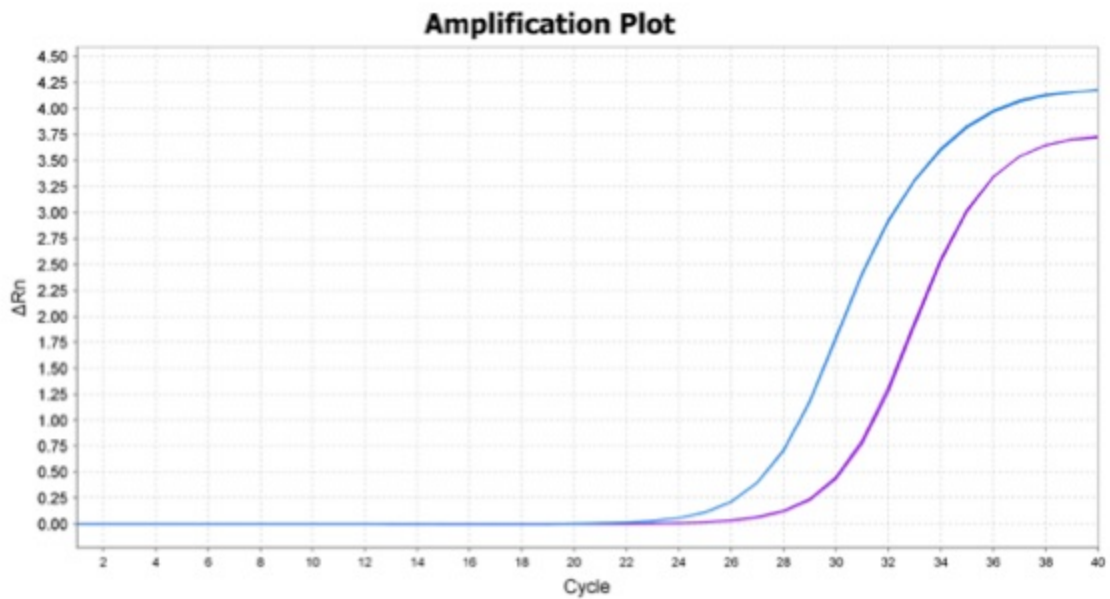
7.6 Caracterització dels cardiomiòcits

Per tal de comprovar si les cèl·lules diferenciades obtingudes expressaven gens característics de cardiomiòcits, estudiem els nivells d'expressió dels gens MYBPC3 i TNNI3 en els cardiomiòcits generats, utilitzant la tècnica de la PCR quantitativa.

Aquests dos gens són de tipus sarcomèric, encarregats de la contracció muscular i s'expressen únicament al cor.

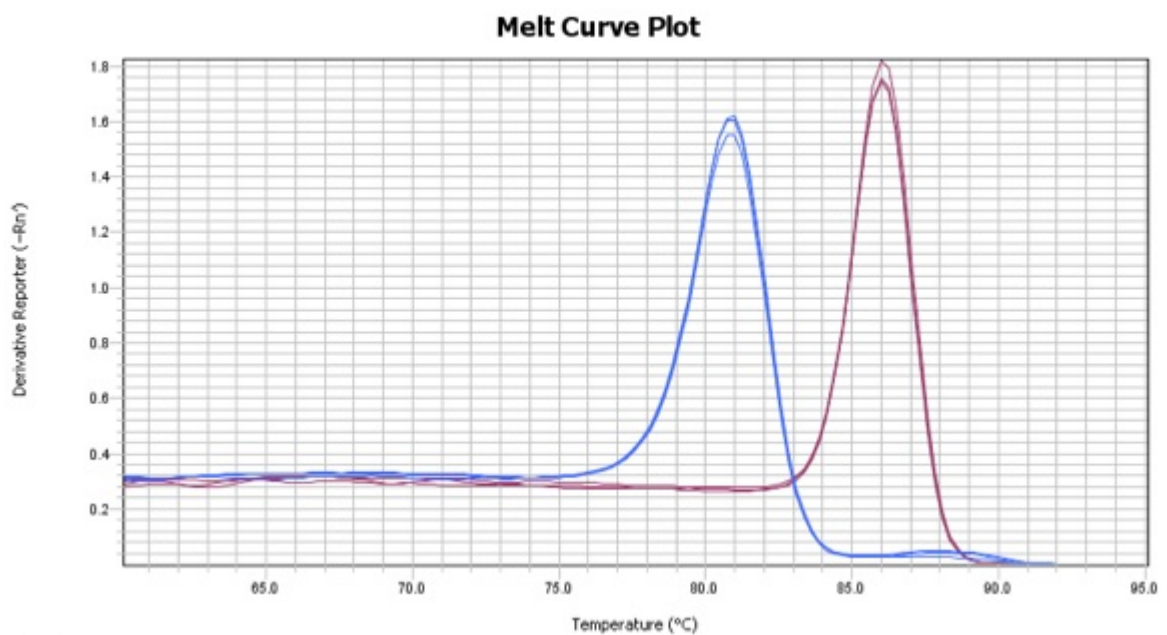
El procediment és igual a l'anterior utilitzat per caracteritzar les cèl·lules iPS. En aquest cas, estudiem els gens que s'expressen en els cardiomiòcits.

Resultats:



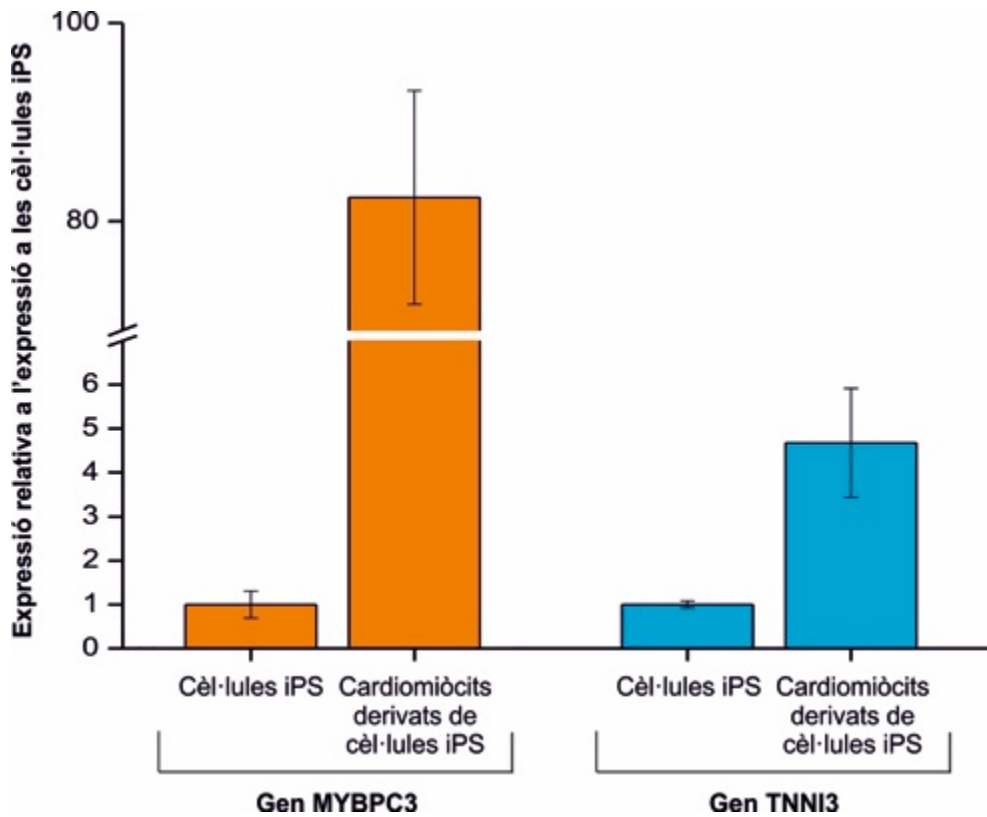
Gràfica 8

A la **gràfica 8** observem que l'amplificació és correcta per cada gen.



Gràfica 9

La **gràfica 9** ens demostra que només s'ha amplificat un producte per cada gen.



Gràfica 10. Nivells d'expressió dels gens dels cardiomiòcits

En aquesta última gràfica (**gràfica 10**) veiem l'expressió de 2 gens característics dels cardiomiòcits. Cada gen ha estat estudiat en cèl·lules iPS i en els cardiomiòcits derivats d'aquestes cèl·lules iPS. Podem observar que en les cèl·lules iPS l'expressió dels gens dels cardiomiòcits és molt poc elevada, en canvi, en els cardiomiòcits l'expressió és molt més elevada.

Per tant, queda demostrat que els cardiomiòcits generats a partir de les cèl·lules iPS expressen els seus gens característics.

Per re-afirmar la identitat dels cardiomiòcits generats també es podrien estudiar altres característiques com la morfologia, l'electrofisiologia, la força contràctil i realitzar proves amb drogues. Durant les pràctiques realitzades com a part d'aquest treball de recerca no he tingut temps de visualitzar aquests estudis complementaris, però molt possiblement podré fer-ho en una altra ocasió.

8. Conclusions

Després de totes les pràctiques realitzades i la revisió d'articles científics s'ha pogut demostrar que: **“Els cardiomiòcits creats artificialment al laboratori tenen les característiques i les propietats dels cardiomiòcits que trobem al cor i, per tant, es poden utilitzar per estudiar malalties cardiovasculars”**.

El procés va començar amb una simple mostra de pell de la qual vam aïllar els fibroblasts. La inserció dels factors de Yamanaka mitjançant la nucleofeció va permetre l'obtenció de les cèl·lules iPS, capaces de diferenciar-se en qualsevol tipus de cèl·lula. El fet de poder obtenir cèl·lules iPS a partir de fibroblasts ja és un gran assoliment però encara hi ha un pas més enllà, obtenir cardiomiòcits que bateguen. A les colònies d'iPS hi vam aplicar una combinació de diversos medis que van portar a l'obtenció d'aquestes masses bategants. L'estudi dels seus gens ens va confirmar que els cardiomiòcits creats al laboratori expressaven els mateixos gens que els cardiomiòcits que trobem al cor. Això permet estudiar els cardiomiòcits des d'una altra perspectiva, *in vivo*, sense necessitat d'una biòpsia de cor.

Els fibroblasts aïllats de la pell, les cèl·lules iPS generades i els cardiomiòcits obtinguts comparteixen el mateix DNA, que a més és el mateix que el del pacient del qual es va obtenir la biòpsia de pell. Aquesta aproximació ens permet estudiar les característiques precises d'aquestes cèl·lules específiques del pacient com si haguéssim pogut obtenir una biòpsia del seu cor. A més, si fos el cas, podríem estudiar els efectes que pogués tenir un defecte genètic causant de malaltia sobre la fisiopatologia dels cardiomiòcits, estudiar les possibles causes i experimentar solucions.

He assolit tots els objectius esmentats a la introducció del treball:

A nivell teòric he ampliat els meus coneixements sobre les cèl·lules mare: les seves característiques i aplicacions terapèutiques.

D'altra banda he conegut els diferents mètodes de generació de cèl·lules iPS i la seva utilitat en la medicina i la recerca. També he aprofundit en el seu ús com a model de malaltia.

A nivell pràctic he après i visualitzat les diferents tècniques de laboratori necessàries per l'obtenció de cardiomiòcits derivats de cèl·lules iPS obtingudes a partir d'una biòpsia de pell d'un individu sa. També he estudiat l'expressió de gens de pluripotència i de cardiomiòcits.

8.1 Valoració personal

Aquest treball m'ha aportat moltes coses positives. He après a analitzar articles científics i extreure'n el més important, a contrastar la informació i redactar-la adequadament. A més, he tingut l'oportunitat de veure el funcionament d'una sala de cultius i a seguir de prop tot el procés redactat al treball.

Per últim, com s'ha anat recalcant al llarg del treball, les cèl·lules iPS són una gran eina pel futur. Encara queda molt per descobrir però les experimentacions mai s'aturaran. Arribarà un dia que s'integraran completament a tots tipus de tractaments de malalties.

Pas a pas, cultiu a cultiu, desenvoluparem la gran aposta pel futur: les cèl·lules iPS.

9. Agraïments

A la tutora del treball de recerca, la Margarita Custey, per la seva orientació i per anar-me seguint el treball i corregint-me tot el que creia necessari.

Als meus pares per ajudar-me a entendre els articles quan em feia falta.

Al Centre de Genètica Cardiovascular de Girona per deixar-me l'espai per visualitzar i aprendre tots els passos de la meva part pràctica.

I per últim i més important, m'agradaria agrair a l'Elisabet Selga per ensenyar-me i guiar-me per tot el procés d'obtenció de cardiomiòcits. També vull donar-li les gràcies per tot el temps invertit en el meu treball de recerca corregint cada detall i explicant-me cadascun dels conceptes complicats.

Sense ella aquest treball no hauria estat possible.

10. Fonts d'informació

10.1 Pàgines web

A CLOSER LOOK AT STEM CELLS. *Stem cells*. (Fitxer informàtic). International Society for Stem Cell Research, 2014.

<http://www.closerlookatstemcells.org/learn-about-stem-cells/types-of-stem-cells>

(Consulta: 4 de juliol de 2016)

ALANCTOT. *Induced Pluripotent Stem Cells: The Future of Tissue Generation*. (Fitxer informàtic). Stanford, 2011.

http://web.stanford.edu/group/hopes/cgi-bin/hopes_test/induced-pluripotent-stem-cells-the-future-of-tissue-generation/#origin-cells-used

(Consulta: 24 de març de 2016)

BIO-RAD. *Introduction to qPCR Instrumentation*. (Fitxer informàtic). 2016.

<http://www.bio-rad.com/es-es/applications-technologies/introduction-qpcr-instrumentation>

(Consulta: 9 de setembre de 2016)

BIOTECHNOLOGY LEARNING HUB. *Timeline for stem cell research*. (Fitxer informàtic). New Zealand, 2007.

http://biotechlearn.org.nz/themes/biotech_therapies/timeline_for_stem_cell_research

(Consulta: 4 de juliol de 2016)

ENRIQUE IÁÑEZ PAREJA. *Células madre y clonación terapéutica*. (Fitxer informàtic). Universidad de Granada.

<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/clonembrion.htm>

(Consulta: 24 de març de 2016)

GENERALITAT DE CATALUNYA. *Transplantament de medul·la òssia*. (Fitxer informàtic). Gencat.cat, 2010.

http://cancer.gencat.cat/ca/ciutadans/tractaments/transplantament_de_madul-la_ossia/

(Consulta: 1 de maig de 2016)

HARVARD HEALTH PUBLICATIONS. *Repairing the heart with stem cells*. (Fitxer informàtic). 2013.

<http://www.health.harvard.edu/heart-health/repairing-the-heart-with-stem-cells>

(Consulta: 21 de juliol de 2016)

JORDI DOMÈNECH CASAL. *El llarg camí al començament*. (Fitxer informàtic). Catalunya, 2010.

<http://metode.cat/Revistes/Article/El-llarg-cami-al-comencament>

(Consulta: 9 de febrer de 2016)

LA GENÈTICA A L'ABAST DE TOTHOM. *Clonatge i cèl·lules mare*. (Fitxer informàtic). Barcelona, 2016.

<http://lagenetica.info/ca/genetica-present-i-futur/clonatge-i-cel%C2%B7lules-mare/> (Consulta: 12 d'abril de 2016)

MANAL HADENFELD. *iPS cells and reprogramming: turn any cell of the body into a stem cell*. (Fitxer informàtic). Germany, 2012.

<http://www.eurostemcell.org/factsheet/ips-cells-and-reprogramming-turn-any-cell-body-stem-cell> (Consulta: 4 de febrer de 2016)

MELISSA HENDRICKS. *Induced Pluripotent Stem Cells: Not Yet the Perfect Alternative*. (Fitxer informàtic). Hopkins Medicine, 2014.

http://www.hopkinsmedicine.org/institute_basic_biomedical_sciences/news_events/articles_and_stories/stem_cells/2010_07_pluripotent_stem_cells (Consulta: 24 de març de 2016)

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *Stem cell information* (Fitxer informàtic). Bethesda, 2015.

<http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics10.aspx> (Consulta: 2 de febrer de 2016)

PATRÍCIA MORÉN. *Es poden fer cèl·lules a la carta?* (Fitxer informàtic). 2010.

http://www.crg.eu/sites/default/files/crg_media/174628_1.PDF (Consulta: 9 de febrer de 2016)

STEM CELLS AUSTRALIA. *What are umbilical cord stem cells?* (Fitxer informàtic). Australia, 2016.

<http://www.stemcellsaustralia.edu.au/About-Stem-Cells/FAQ/What-are-umbilical-cord-stem-cells.aspx> (Consulta: 9 de setembre de 2016)

TEXAS HEART INSTITUTE. *Stem Cell Center*. (Fitxer informàtic). Texas, 2016.

http://www.texasheart.org/Research/StemCellCenter_Esp/Informacion_basica.cfm (Consulta: 24 de març de 2016)

TIMOTHY, J. NELSON, M. D., Ph. D. *The Science and Ethics of Stem Cells: A Bright Future*. (Fitxer informàtic). American College of Pediatricians, 2013.

<http://www.acped.org/the-college-speaks/position-statements/societal-issues/the-science-and-ethics-of-stem-cells-a-bright-future> (Consulta: 25 de març de 2016)

TIMOTHY KAMP, WILLIAM MURPHY. *What are iPS cells?* (Fitxer informàtic). University of Wisconsin-Madison, 2013.

http://stemcells.wisc.edu/sites/default/files/What_Are_IPS_Cells_0.pdf (Consulta: 24 de març de 2016)

UCLA. *Induced Pluripotent Stem Cells (iPS)*. (Fitxer informàtic). California, 2010.

<https://www.stemcell.ucla.edu/induced-pluripotent-stem-cells> (Consulta: 4 de febrer de 2016)

10.2 Vídeos

Cèl·lules iPS: una nova manera d'estudiar les malalties. (Vídeo educatiu). Parc Científic de Barcelona. Barcelona, 2011.

<https://www.youtube.com/watch?v=xeyNn2st00g> (Consulta: 2 de febrer de 2016)

Gel Electrophoresis. (Joc interactiu). Genetic Science Learning Center. Utah.

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/> (Consulta: 15 de juliol de 2016)

Real Time PCR: Basic simple animation. (Vídeo educatiu). MrSimpleScience. 2014.

<https://www.youtube.com/watch?v=EaGH1eKfvCO> (Consulta: 15 de juliol de 2016)

Real Time PCR: Interpretation of the amplification plot. (Vídeo educatiu). MrSimpleScience. 2014.

<https://www.youtube.com/watch?v=fSj7HwzFCdg> (Consulta: 15 de juliol de 2016)

The Polymerase Chain Reaction (PCR). (Joc interactiu). 2004.

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>
(Consulta: 15 de juliol de 2016)

10.3 Figures

Figura de la portada. El cor en una placa.

<http://healthjournal.uconn.edu/>

Fig. 1 Parts d'una cèl·lula de mamífer.

<https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustracin-clula-animal-aislada-en-el-vector-blanco-image49750438>

Fig. 3 Extracció de cèl·lules d'un embrió.

<http://www.eurostemcell.org/es/factsheet/or%C3%ADgenes-%C3%A9tica-y-embriones-las-fuentes-de-c%C3%A9lulas-madre-embrionarias-humanas>

Fig. 4 Localització de les cèl·lules limbars.

<http://bjo.bmj.com/content/83/4/414/F1.expansion>

Fig. 6 Diagrama del procés de diferenciació. Modificat del blog de Biomèdics Garbí.

<http://biomedicsgarbi.blogspot.com.es/2011/12/les-cel·lules-mare-conferencia-de-la.html>

Fig. 7 Reprogramació a l'interior d'un ésser viu.

<http://www.elperiodico.cat/ca/noticias/societat/cientifics-espanyols-aconsegueixen-cultivar-cel·lules-mare-ratolins-2649591>

Fig. 9 Estructura del cor.

[https://ca.wikipedia.org/wiki/Cor#/media/File:Diagram_of_the_human_heart_\(catalan\).png](https://ca.wikipedia.org/wiki/Cor#/media/File:Diagram_of_the_human_heart_(catalan).png)

Fig. 10 Estructura dels cardiomiòcits

http://www.nature.com/nrcardio/journal/v12/n10/fig_tab/nrcardio.2015.91_F1.html

Fig. 12 Comptador de cèl·lules

Extret d'un llibret informatiu. APPLIEDBIOSYSTEMS. *Scepter 2.0 Cell counter*.

10.4 Articles

AL-ANAZI, K. "Induced Pluripotent Stem Cells and Their Future Therapeutic Applications in Hematology". *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 2015.

ALBERCH, J. CANALS, J. "Regeneració a partir de cèl·lules mare en les malalties neurodegeneratives". *Llibre de Ponències*, 2004, p. 31-41.

BELLIN, M. MARCHETTO, M. GAGE, F. MUMMERY, C. "Induced pluripotent stem cells: the new patient?". *Department of Anatomy and Embryology*, 2012, volume 13.

BOYLE, A. SCHULMAN, S. HARE, J. "Is stem cell therapy ready for patients?" *Institute for Cell Engineering*, 2006, p. 339-352.

CASTAGNINO, J. "Células madre embrionarias". *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 2005.

FENG, C. JIA, Y. ZHAO, X. "Pluripotency of Induced Pluripotent Stem Cells". *ScienceDirect*, 2013, p. 299-303.

FLYNN, A. O'BRIEN, T. "Stem cell therapy for cardiac disease". *National University of Ireland*, 2011, p. 177-187.

GARBEM, J. LEE, R. "Cardiac Stem Cell Therapy and the Promise of Heart Regeneration". *Cell Stem Cell*, 2013, p. 689-698.

GOLDTHWAITE, C. "Mending a broken heart: stem cells and cardiac repair". *American Heart Association*, 2012.

GONZÁLEZ, F. BOUÉ, S. BELMONTE, JC. "Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte". *Center for Regenerative Medicine in Barcelona*, 2011.

HANLEY, J. RASTEGARLARI, G. NATHWANI, A. "An introduction to induced pluripotent stem cells". *British Journal of Haematology*, 2010, 151, p. 16-24.

LI, G. CHENG, G. WU, J. MA, S. SUN, C. "New iPSC for old long QT syndrome modeling: Putting the evidence into perspective". *Experimental Biology and Medicine*, 2013.

LI, G. HE, X. SUN, C. "Induced pluripotent stem cell-based therapies for inherited arrhythmias: Opportunities and challenges involved". *Department of Cardiovascular Medicine*, 2014.

MONTSERRAT, N. ARAN, B. IZPISÚA, JC. "Cèl·lules mare embrionàries: què en sabem després de trenta anys d'investigació?". *Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona*, 2012, p. 215-233.

NAGY, A. "Progress made in the reprogramming field: new factors, new strategies and a new outlook". *Genetics & Development*, 2012, p. 435-443.

OHNUKI, M. TAKAHASHI, K. "Present and future challenges of induced pluripotent stem cells". *Phil. Trans. R. Soc.* 2015.

PENN, M. MAL, N. "Stem Cells in Cardiovascular Disease". *Methods in Molecular Medicine*, 2012, p. 329-351.

PÉREZ, JC. VELOZ, I. LÓPEZ, R. "Células madre". *Medicina Universitaria*, 2007, p. 40-130.

PERIN, E. "Stem Cell Therapy for Cardiovascular Disease". *Texas Heart Institute*, 2006, p. 204-208.

RAMÍREZ, P. "Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas". *Instituto de Hematología e Inmunología*, 2009.

RAMÍREZ, P. BALEA, E. "Medicina Regenerativa. Células madre embrionarias y adultas". *Instituto de Hematología e Inmunología*, 2009.

S. P. MEDVEDEV, A. I. SHEVCHEBKO, S. M. ZAKIAN. "Induced Pluripotent Stem Cells: Problems and Advantages when Applying them in Regenerative Medicine". *Acta Naturae*, 2010, p. 18-28.

SALLAM, K. KODO, K. "Modeling Inherited Cardiac Disorders". *Stanford Cardiovascular Institute*, 2014, p. 784-794.

SANTOS, M. WILLENBRING, H. "On the Origin of the Term "Stem Cell"". *Institute for Regeneration Medicine*, 2013.

TAKAHASHI, K. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors". *Cell*, 2007, núm. 131, p. 861-872.

TAKAHASHI, K. YAMANAKA, S. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors". *Cell* 126, 2006, p. 663-676.

YEE, J. "Turning Somatic Cells into Pluripotent Stem Cells". *Nature education*, 2010.

YU, J. THOMSON, J. "Regenerative Medicine". *The Genome Center of Wisconsin*, 2006.

10.5 Notícies

ANDY COGLAN. *Blindness eased by historic stem cell treatment*. (En línia). New Scientist, 2012.

<https://www.newscientist.com/article/dn21387-blindness-eased-by-historic-stem-cell-treatment> (Consulta: 5 de setembre de 2016)

ANTONIO MADRIDEJOS. *Científics espanyols aconsegueixen "cultivar" cèl·lules mare en ratolins*. (En línia). El Periódico, 2013.

<http://www.elperiodico.cat/ca/noticias/societat/cientifics-espanyols-aconsegueixen-cultivar-cel·lules-mare-ratolins-2649591> (Consulta: 12 de febrer de 2016)

CAN RUTI. *Ús de cèl·lules mare del cordó umbilical per al tractament d'infarts o ictus*. (En línia). Empordà, 2013.

<http://www.emporda.info/salut/2013/01/07/cel·lules-mare-del-cordo-umbilical-al-tractament-dinfarts-ictus/185445.html> (Consulta: 4 de juliol de 2016)

LA MARATÓ. *Es millora la força del batec del cor en ratolins amb infart mitjançant bioimplants de cèl·lules mare*. (En línia). Fundació La Marató de TV3, 2015.

<http://blogs.ccma.cat/marato.php?catid=2361> (Consulta: 12 de febrer de 2016)

MARC TORO. *El 40% dels pacients que esperen un trasplantament de medul·la òssia no troba un donant compatible*. (En línia). Ara.cat, 2014.

http://www.ara.cat/societat/pacients-esperen-trasplantament-medulla-compatible_0_1222677870.html (Consulta: 1 de maig de 2016)

MIQUEL TUSON. *Retorn (cel·lular) al futur*. (En línia). Ara ciència, 2012.

<http://ciencia.ara.cat/laetoli/2012/10/09/retorn-cel%C2%B7lular-al-futur/> (Consulta: 12 de febrer de 2016)

MÒNICA L. FERRADO. *Trasplantament d'una tràquea artificial per primer cop al món*. (En línia). Ara.cat, 2011.

http://www.ara.cat/societat/Trasplantament-duna-traquea-artificial-mon_0_596940402.html (Consulta: 24 de març de 2016)

NUÓ DOMÍNGUEZ. *Un trasplantament de cèl·lules mare retorna la visió a persones cegues*. (En línia). El País, 2014.

http://cat.elpais.com/cat/2014/10/14/ciencia/1413306545_752044.html (Consulta: 4 de juliol de 2016)

SALUD Y CONTROL. *Nuevo método de Reprogramación Celular. Mejorando la Técnica de Yamanaka*. (En línia). Diario de Ciencias, 2016.

<http://www.diariodeciencias.com.ar/nuevo-metodo-de-reprogramacion-celular-mejorando-la-tecnica-de-yamanaka/> (Consulta: 5 de juliol de 2016)

10.6 Altres

APPLIEDBIOSYSTEMS. *Real-time PCR handbook*. ThermoFisher Scientific. (Llibret informatiu)

*També he utilitzat els protocols específics de laboratori.