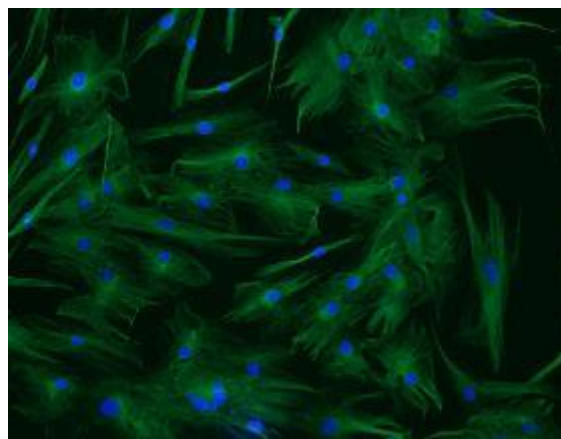
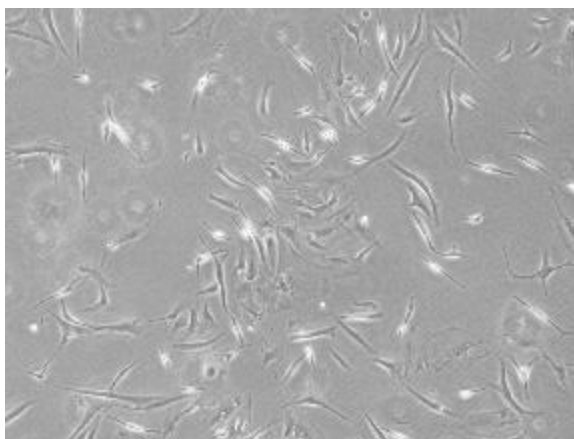


Les cèl·lules mare de la regeneració muscular



I.Pròleg per Àngel Raya



La medicina regenerativa constituye un área en desarrollo de intensa actividad investigadora en la actualidad. El enorme potencial de este tipo de estrategias necesita para que se haga realidad del esfuerzo combinado y coordinado de investigadores básicos, aplicados y clínicos, si queremos que en un futuro alcance la práctica clínica y beneficie a los pacientes. En un área de investigación joven y en desarrollo, los ojos frescos y las mentes abiertas permiten formular preguntas pertinentes e imaginar soluciones innovadoras. Mi conversación (más que entrevista) con Carola Domènech fue muy enriquecedora en este sentido para mí. No me cabe duda de que el campo necesita mentes como la suya para avanzar en el camino de solucionar los problemas que aún nos están bloqueando. El trabajo que presenta a continuación y que ha sido resultado de sus indagaciones y constante búsqueda de información refleja, por una parte, esa curiosidad innata que caracteriza a las mentes con vocación científica. Por otra parte, se trata de una memoria bien documentada desde el punto de vista formal, que, si bien contendrá (como no podría esperarse de otra manera) algunas inexactitudes, pone de manifiesto un esfuerzo considerable aplicado con método a la solución de un problema concreto. Es decir, un experimento. Mi más sincera enhorabuena a su autora –pues considero que el experimento ha salido bien; y mis mejores deseos para su futuro desarrollo personal y profesional. Asimismo, animo a quien vaya a leer este trabajo a que lo haga con la tranquilidad de que la mayoría de información que encontrará es conforme a lo que se piensa científicamente correcto en la actualidad, pero también con el escepticismo necesario para cuestionar lo que considere que no le convence. Únicamente así podremos avanzar entre todos, como Carola bien ha comprendido.

Barcelona, 10 de octubre de 2014.



Àngel Raya
Profesor d'Investigació ICREA,
Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC)
Director,
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB)

II. Pròleg per Eduard Gallardo

Tot i que el terme cèl·lules mare s'ha popularitzat relativament fa pocs anys, la recerca en aquest tipus de cèl·lules ja fa molts anys que està en marxa. De sempre s'ha conegut/sospitat que els teixits tenen capacitat de regenerar-se ja sigui després d'un dany o com a part d'un procés normal de renovació. Aquesta idea ha fascinat als científics i als metges que han vist en elles la solució per a la curació de moltes malalties. Les cèl·lules amb capacitat de participar en aquests processos són diferents depenent del teixit que estiguem estudiant. Dit això existeixen unes cèl·lules en els embrions que són capaces de formar un individu complet. Les que trobem als teixits tenen capacitats més limitades que es restringeixen a aquell teixit en particular.

Des d'els anys 60 es realitzen transplantaments de moll d'os com a teràpia per a malalties hematològiques però no es parlava de cèl·lules mare. Però en realitat el que es fa en un transplantament de moll d'os és injectar cèl·lules mare hematopoètics al donant que seran capaces de repoblar totes les línies de cèl·lules de la sang.

Per altra banda, la utilització de cèl·lules mare amb fins terapèutics a trobat alguns entrebancs de tipus ètic sobretot si ens referim a les embrionàries. De fet en molts països no és permès fer recerca amb aquest tipus de cèl·lules. Es per això que s'ha treballat molt en aconseguir identificar-les i aïllar-les de teixits adults i per altre banda s'ha aconseguit reprogramar cèl·lules adultes diferenciades com ara els fibroblastes i convertir-les amb cèl·lules mare. De tota manera els primers estudis in vivo amb aquestes cèl·lules han mostrat que encara queda camí per recórrer fins arribar als assaigs clínics

En l'actualitat ja s'estan utilitzant aquestes cèl·lules en diferents especialitats mèdiques amb èxit variable. La utilització de cèl·lules mare mesenquimals del propi pacient en lesions de genoll sembla que està donant bons resultats.

Pel que fa a les malalties neurològiques i en concret en el cas de les malalties neuromusculars encara no s'ha aconseguit aplicar la teràpia amb èxit en cap cas. S'han intentat assaigs clínics amb mioblastes obtinguts de les cèl·lules satèl·lit musculars però la seva capacitat per a colonitzar el múscul del donant es limitada. A més, o bé es modifiquen les cèl·lules mare del donant amb teràpia gènica o bé s'utilitzant les d'un donant sa amb els problemes de rebuig immunològic que això comporta. Actualment s'estant fent assaigs clínics amb altres tipus cel·lulars com són els mesonagioblasts que tenen millor capacitat de colonització i en els que s'han publicat resultats prometedors en un model caní de distròfia muscular de Duchenne. De moment encara no tenim resultats però hi ha possibilitats de que funcioni.

En conclusió, tot i que s'està investigant intensament, encara hi ha una sèrie de barreres que hem de superar i per tant s'ha de seguir treballant sense pausa.

En aquest treball, l'alumna s'ha introduït en les tècniques necessàries per a l'estudi de dos tipus de cèl·lules mare musculars com són els mioblastes i els mesoangioplastes. D'on s'obtenen, com s'aïllen, com es mantenen en cultiu..... A més ha pogut veure com és una sala blanca de recent construcció en el nostre hospital i que és una instal·lació que reuneix les condicions necessàries i imprescindibles (manipulació en condicions d'esterilitat extremes) per a la obtenció i expansió de cèl·lules mare que després s'hauran d'injectar en un pacient.

Dr. Eduard Gallardo, Investigador Titular
Laboratori de Malalties Neuromusculars
Institut de Recerca Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. U.A.B.

1. Introducció

El tema d'aquest treball l'he triat perquè està totalment encarat al que m'agrada, al que vull estudiar i treballar en un futur. Sempre m'ha agradat la biologia, però quan vaig sentir el concepte de cèl·lules mare per primer cop em vaig quedar fascinada, unes cèl·lules que poden regenerar teixits! De mica en mica quan vaig anar indagant en la qüestió em van anar fascinant més i més, fins que va arribar l'hora de fer el treball de recerca. No em va costar gaire triar de què el faria, tenia clar que volia que fos alguna cosa d'investigació actual i que a mi em motivés. Aleshores volia anar a un centre de recerca per veure com fan les investigacions allà i veure com és treballar en un laboratori, així que vaig enviar correus a un munt de llocs que vaig trobar per internet, s'ha de dir que molt pocs van contestar... però l'Hospital de Sant Pau i Santa Creu ho va fer. Em van permetre anar a observar com era la investigació allà durant un mes i també vaig poder fer la part pràctica del meu treball allà. Em van posar amb la unitat de neuromuscular, on treballaven amb cèl·lules mare musculars. Així que em vaig informar de què són les distròfies, com es podrien curar amb cèl·lules mare, com són aquestes cèl·lules mare, etc. Quan estava allà em van deixar tenir cèl·lules satèl·lit, un tipus de cèl·lules mare musculars, observar-ne la diferenciació i fe'ls-hi una immuno-citoquímica. A part, vaig estar allà durant el dia a dia veient les pràctiques que es duen a terme normalment, em van ensenyar els conceptes bàsics del laboratori, em van deixar dur a terme alguna pràctica molt senzilla que allà ells fan un munt de cops al dia normalment, a més a més de deixar-me tenir un cultiu de mioblasts. A més els investigadors d'allà m'explicaven quines investigacions estaven fent en el moment.

El cos del treball està estructurat d'una manera que hi hagi tots els conceptes necessaris per després entendre la part pràctica, i les aplicacions d'aquesta al món real. Estan explicats començant pel més bàsic que serien les cèl·lules mare, les seves característiques, els mètodes d'obtenció, etc., més endavant hi ha

l'apartat de la regeneració muscular, on s'expliquen les cèl·lules mare encarregades de dur a terme aquest procés, junt amb l'explicació de la regeneració muscular. Després, per entendre on es poden aplicar aquestes cèl·lules mare a la realitat, s'expliquen les distròfies musculars, les quals es podrien solucionar amb l'aplicació de cèl·lules mare musculars. Aquesta s'explica inclosa en l'apartat de més endavant, el qual també conté conceptes de l'aplicació de cèl·lules mare en general, és a dir, com és el procediment, quins tractaments ja hi ha, futurs tractaments, etc. Finalment hi ha la part pràctica dels dies que vaig estar al laboratori de malalties neuromusculars a l'Hospital de Sant Pau i Santa Creu, en el qual em van ajudar moltíssim, juntament amb una entrevista amb l'Ángel Raya, un home molt ben situat en el món de les cèl·lules mare, per tant té un grans coneixements sobre aquestes.

La informació l'he hagut de treure tant de llibres com d'internet, però tota la que està treta d'internet ha sigut contrastada. A més al poder estar a l'Hospital de Sant Pau i Santa Creu molta informació me l'han explicada allà, la qual és totalment fiable, ja que són experts en aquest tema.

2. Cèl·lules mare

2.1. Història de la investigació de cèl·lules mare

Les cèl·lules mare tenen una història interessant, a causa de la controvèrsia que han suposat per a l'ètica i la moralitat.

- 1908: Alexander Maksimov va ser un històleg (la histologia és l'estudi de l'anatomia microscòpica de plantes, cèl·lules animals i els teixits), que va ser el primer a plantejar la hipòtesi de l'existència de cèl·lules mare hematopotètiques (les que són les de la sang).

- 1960: Joseph Altman (Fig. 1), investigador especialista en neurobiologia. Va ser el que va proposar per primera vegada l'activitat de la neurogènesi (naixement de noves neurones) adulta en el cervell. Aquesta teoria va ser totalment ignorada per la comunitat científica, perquè en aquest moment es creia que era impossible el naixement de noves neurones.

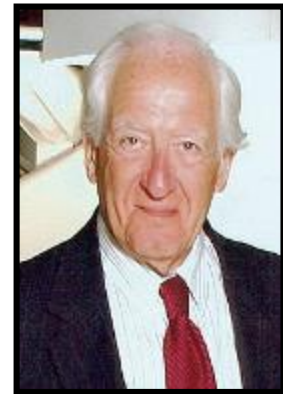


Fig. 1

- 1963: James Edgar Till , juntament amb Ernest McCulloch, van ser els primers a demostrar l'existència d'autorenovació de cèl·lules en medul·la òssia de ratolí. També havien descobert l'existència de cèl·lules mare hematopotètiques.
- 1968: el primer trasplantament de medul·la òssia es va realitzar amb èxit entre dos germans per primera vegada.

- 1978: cèl·lules mare hematopotètiques van ser descobertes en la sang del cordó umbilical humà.

- 1981: La primera extracció d'embrions i el cultiu de cèl·lules mare del blastocist de ratolins va ser realitzada per Martin Evans, juntament amb Matthew Kaufman, els quals es dedicaven a la investigació. En la Fig. 2 podem veure al Martin Evans a l'esquerra, i a la dreta el Matthew Kaufman.



Fig. 2

- 1981: Gail R. Martin (Fig. 3) va descobrir diferents tècniques d'extracció de cèl·lules mare d'un embrió. Aquest descobriment va ser contemporani a l'esmentat anteriorment, ja que tots tres investigadors treballaven en la mateixa universitat, però individualment.



Fig. 3

- 1989: Sally Temple, neurocientífica cofundadora i directora del “Neural Stem Cell Institute” i professora a “l'Albany Medical College”, va dissenyar un sistema de cultiu en el qual les cèl·lules progenitores individuals del sistema nerviós central poden dividir-se i diferenciar-se en clons de neurones i cèl·lules glials (són, juntament amb les neurones, les cèl·lules que formen el sistema nerviós. Aquestes cèl·lules donen suport i protecció a les neurones, unint-les. A més ajuden a mantenir l'homeòstasi cel·lular de les neurones i les alimenten). Això va conduir a la identificació de diferents classes de

cèl·lules progenitores en el prosencèfal embrionari (part del cervell), incloent-hi les cèl·lules mare multipotencials.

- 1997: molts descobriments van ocórrer a la vegada:
 - John E. Dick, investigador i professor a la vegada, va publicar el primer estudi que suggereix l'existència de cèl·lules mare del càncer. Aquest descobriment va ser gràcies a la identificació les cèl·lules mare cancerígenes en diferents tipus de leucèmia, fet que va permetre entendre que no totes les cèl·lules del càncer són les mateixes, cosa que va obrir una nova direcció en la investigació del càncer.
 - Ian Wilmut i els seus companys van aconseguir clonar el primer animal: l'ovella Dolly. El que van fer és agafar un òvul d'una ovella i treure-li el nucli. Després van agafar el nucli d'una cèl·lula adulta d'una altra ovella, ho van fusionar i en van fer un petit cultiu, el qual van inserir a una altra ovella perquè l'embrió es desenvolupés correctament. L'ovella que va sortir era idèntica a la que li havien tret la informació genètica (Fig. 4). Aquest experiment va obrir moltes portes en la investigació de cèl·lules mare a l'hora de clonar embrions per tal d'aconseguir cèl·lules mare. La Dolly va morir patint malalties que són pròpies d'ovelles molt velles, hi ha una teoria que diu que va ser perquè els telòmers de l'ADN no es van allargar, de manera que tenia l'edat genètica de la ovella adulta de la qual havien agafat l'informació. Aquesta teoria és falsa, ja que en els laboratoris actualment duen a terme la mateixa pràctica i els telòmers s'allarguen. A més més endavant sí que hi va haver experiments clonant animals que van funcionar. No és pas estrany que la Dolly morís amb les condicions en les que vivia.

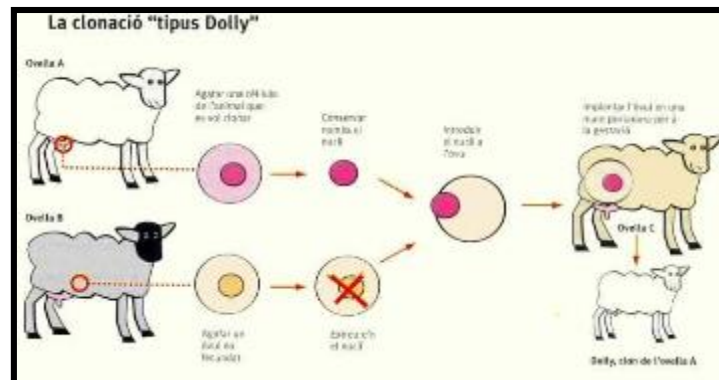


Fig. 4: procés de clonació de l'ovella Dolly.

- 1998: En aquest any que van passar dos fets importants de manera simultània:

- James Thomson i el seu equip van aconseguir aïllar cèl·lules mare de la massa cel·lular interna del blastocist d'un embrió humà. Podem veure el procés il·lustrat en la Fig 5.

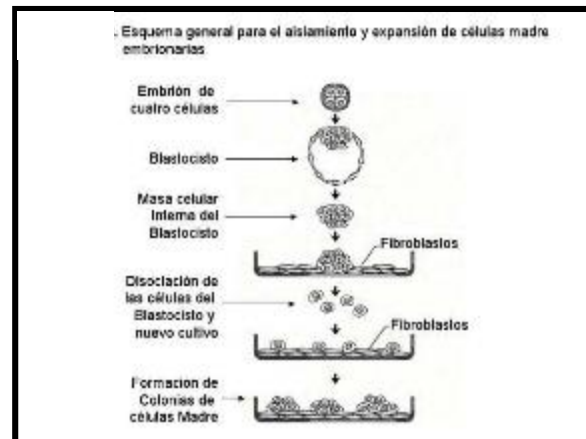


Fig. 5

- Gearhart, coetàniament amb Thomson, extreu les cèl·lules germinals (les que produeixen el creixement dels gàmetes dels organismes que tenen una reproducció sexual) de teixit gonadal fetal (que és on es guarden aquestes cèl·lules germinals) i les cultiva. Tots dos investigadors van ser els primers a aconseguir fer un cultiu de cèl·lules mare humanes però extraient-les de diferents llocs.

- 2001: Els investigadors van aconseguir clonar embrions humans que es trobaven en un estadi recent, de 4-6 cèl·lules, seguint el mateix procés que amb la Dolly.
- 2005: Van arribar a recuperar parcialment la mobilitat d'un ratolí amb danys de columna mitjançant l'ús de les cèl·lules neuronals.
- 2006: Shinya Yamanaka, metge i investigador especialitzat en cèl·lules mare, i John Gurdon, biòleg especialitzat en biologia del desenvolupament (Fig. 6) expliquen un mètode per extreure cèl·lules mare d'un embrió sense la necessitat de destrossar-lo. Aquest es duu a terme reprogramant cèl·lules mare adultes insertant gens clau. Les cèl·lules

obtingudes s'anomenen cèl·lules mare de pluripotència induïda (iPS). Aquest descobri-



ment ha resultat ser dels més profitosos

Fig. 6

de tota la història de cèl·lules mare, ja que permet la manipulació d'aquestes sense haver de confrontar els problemes ètics que les embrionàries comporten.

- 2013: Charles Vacanti junt amb Haruko Obokata descobreixen que qualsevol cèl·lula pot ser retornada a un estadi preembrionari, això vol dir fer una vida nova a partir d'una de vella, renovar les cèl·lules. Aquesta tècnica que només dura uns 30 minuts de fer s'anomena "Stimulus-triggered acquisition of pluripotency" (STAP), que en català seria "Utilitzar un estímul per aconseguir pluripotència", com diu el nom es tracta de sotmetre la cèl·lula sota la influència d'un estímul, cosa que

produeix que la cèl·lula es converteixi en pluripotent. El que fan exactament és desmetilar els factors epigenètics els quals regulen l'expressió d'un gen baixant el nivell de Ph. En aquest cas fan que els gens reguladors de pluripotència, que es troben en un estat de quiescència, s'expressin gràcies a la desmetilització dels factors epigenètics, que són un grup de molècules que regulen l'expressió d'un gen determinat segons el nivell de metilació (com més grups metil menys s'expressa aquest gen), entre altres factors. Aquesta pràctica semblava molt senzilla, fins i tot massa perquè durant aquest 2014 s'ha descobert que l'article publicat a la revista "nature", una de les més prestigioses en el món de la investigació, estava bastant farcit d'errors, falsificacions de resultats... Això va sortir a la llum en el moment en què altres investigadors van intentar reproduir aquesta pràctica i tots van fallar, de manera que es va fer un "review" on es va descobrir tot. Al final els que dirigien la investigació han hagut de dimitir i ara tenen una gran taca a la seva carrera.

2.2. Definició

Les cèl·lules mare són cèl·lules no diferenciades que es poden diferenciar (que en termes biològics significa que una cèl·lula menys especialitzada es torna més especialitzada) en cèl·lules especialitzades.

D'altra banda són capaces de dividir-se, a través de la mitosi, per produir més cèl·lules mare idèntiques (excepte mutacions). A més, a causa de les seves propietats, totes les cèl·lules somàtiques procedeixen de cèl·lules mare.

La funció de les cèl·lules mare és especialitzar-se en les cèl·lules convenients, tant pot ser per reparar teixits, com crear-los al principi de la formació de l'individu.

2.3. Propietats

- **Autorenovació:** capacitat de dividir-se en dues cèl·lules filles mantenint l'estat d'indiferenciació. Una de les filles no estarà diferenciada, serà igual que la mare, i l'altra adquirirà la capacitat de diferenciar-se, sempre que les condicions ambientals ho permetin, això s'anomena obligotarietat de reproducció asimètrica. Gràcies a aquesta propietat, molts dels teixits adults tenen una reserva de cèl·lules mare que es van dividint i substituint a les cèl·lules que moren, però a la vegada no s'acaben les cèl·lules mare, ja que una de dues es manté indiferenciada. En el cas que una cèl·lula mare en produeixi dues de diferenciades, automàticament una altra cèl·lula mare farà mitosi i produirà dues cèl·lules filles sense diferenciació.

- **Potencialitat:** Capacitat que tenen les cèl·lules mare per especialitzar-se en cèl·lules d'un altre teixit. En la Fig. 7 podem veure un esquema dels diferents tipus amb exemples. Segons la seva capacitat de diferenciació trobem les cèl·lules mare:



Fig. 7

- Totipotents: són les que són capaces de créixer fins a generar un individu complet, per tant, poden convertir-se en tota mena de cèl·lules. Aquestes cèl·lules són les que trobem quan l'òvul i

l'espermatozoide s'uneixen i formen el zigot. Les cèl·lules que trobem en les primeres divisions també són totipotents.

- Pluripotents: són les descendents de les totipotents, per això aquestes no tenen la capacitat de formar un individu sencer sinó que es poden diferenciar en tots els teixits del cos. Aquestes les trobem en la massa cel·lular interna del blastocist, que és un estadi recent del desenvolupament embrionari el qual està constituït per una capa externa (troblast) d'unes 70 cèl·lules, i una massa interna d'unes 30 cèl·lules que són aquestes les cèl·lules mare i és d'aquí d'on molts cops les extraiem.
- Multipotents: Són les que només poden produir cèl·lules mare del mateix llinatge d'origen embrionari (Fig. 8), és a dir que dins de les tres fulles embrionàries (ectoderma, mesoderma i endoderma) de les quals surten tots els teixits del cos poden generar qualsevol cèl·lula d'aquests. Un exemple molt clar serien les cèl·lules mare hematopoiètiques (les de la sang) que es poden diferenciar en plaquetes, glòbuls blancs, limfòcits, etc.

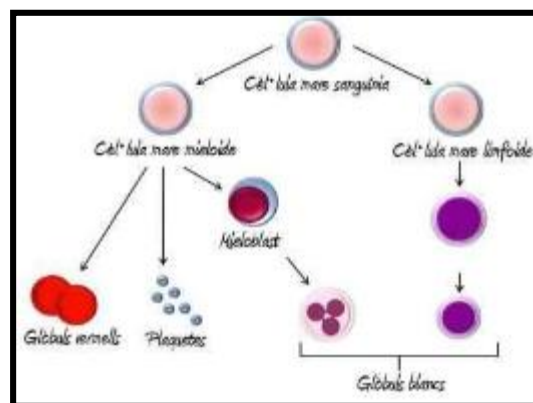


Fig. 8: multipotencialitat de les cèl·lules hematopoiètiques

- Unipotents: Són les que només es poden dividir en un mateix tipus de cèl·lules però mantenen la capacitat d'autorenovar-se (això les diferencia de les altres). Per exemple les cèl·lules mare musculars només es poden diferenciar en cèl·lules del múscul.

2.4. Classificacions

Podem classificar les cèl·lules mare tenint en compte en l'estadi de desenvolupament en el qual es troben, segons això canvia la seva capacitat de diferenciació (Fig. 9).

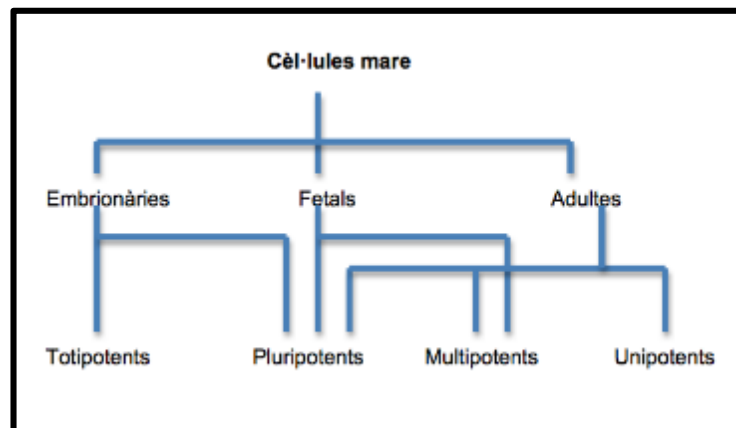


Fig. 9: classificació de cèl·lules mare i la seva potencialitat.

2.4.1. Embrionàries:

Són les cèl·lules mare que extraïem de les primeres fases del desenvolupament de l'embrió o dels embrions "sobrants" de la fecundació in vitro. Just en el moment de la fecundació, les primeres cèl·lules són **totipotents**. Més tard quan s'ha desenvolupat una mica més l'embrió arribem a l'etapa del blastocist, que està compost d'unes 50-150 cèl·lules, en aquest moment extraïem les cèl·lules mare **pluripotents** de la massa interna d'aquest. Aquestes es poden diferenciar en teixits sencers o fins i tot individus complets.

El problema que poden comportar aquests tipus de cèl·lules és que poden generar tumors, ja que estan en un estadi tan prematur que, com que es poden dividir en tants tipus de cèl·lules, poden produir un tumor. A més hi ha la possibilitat que el pacient les rebutgi.

La manipulació de cèl·lules mare embrionàries ha comportat molts problemes ètics a causa de la necessitat de manipular un embrió.

2.4.2. Fetals:

Són les que trobem al fetus, que aquest és a partir de la setmana 10 de gestació, aproximadament. S'obtenen de l'avortament de fetus o embrions. Als teixits del fetus s'hi troben gran quantitat de cèl·lules mare que són les que n'impulsen el creixement, per això, si les extraïem d'aquí poden ser tan **pluripotents** com **multipotents**.

2.4.3. Adultes:

Les cèl·lules mare adultes, que també es poden anomenar somàtiques, es troben en els teixits adults per tal d'anar-lo reparant. Són cèl·lules indiferenciades que estan de reserva en els teixits, un cop van morint les cèl·lules del teixit aquestes s'especialitzen i les substitueixen. A part de substituir-les també formen més cèl·lules mare que es queden de reserva com les anteriors, això vol dir que d'una cèl·lula mare en surt una d'especialitzada i l'altra que no. Per tant, d'aquí n'extraïem les **multipotents**, les **unipotents** i **pluripotents** però aquestes últimes només exclusivament d'alguns teixits com el del cordó umbilical.

Les cèl·lules mare adultes, que s'extreuen dels teixits adults, s'han utilitzat molt per la teràpia de la leucèmia. L'avantatge de l'ús d'aquestes cèl·lules és que no presenten cap mena de controvèrsia

ètica, ja que la seva extracció no comporta la manipulació d'un embrió. A més es poden extreure del mateix pacient, de manera que no hi ha rebuig.

2.5. Mètodes/llocs d'obtenció

Podem classificar els mètodes segons el lloc d'on les extraiem. (Fig. 10):

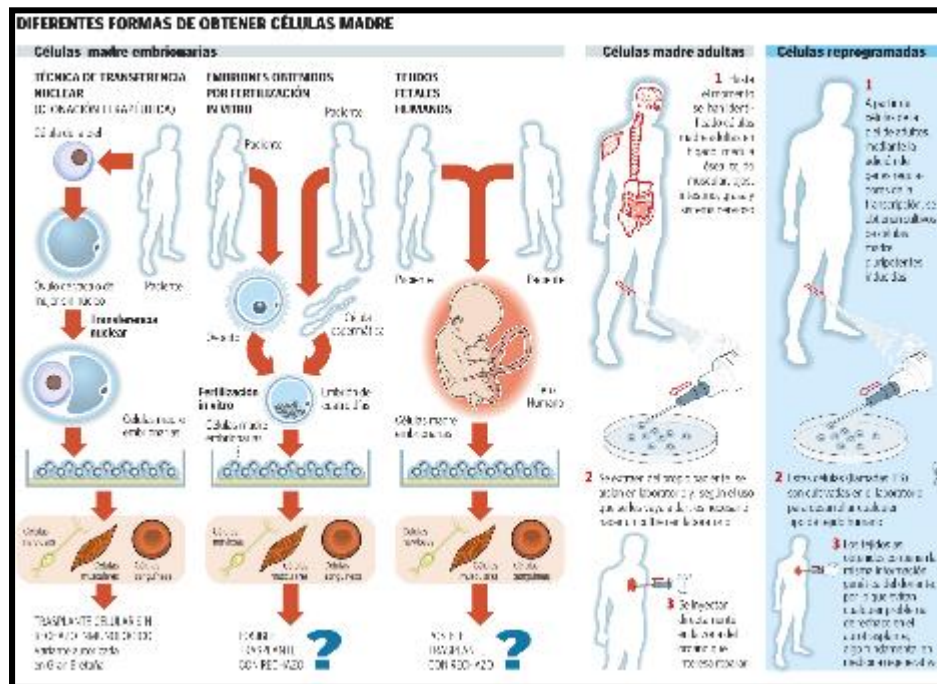


Fig. 10: petita classificació d'algunes de les diferents formes d'obtenció. En la il·lustració classifica les reprogramades a part, en el treball estan considerades com adultes.

2.5.1. Embrió:

- **Clonació terapèutica (“tècnica de transferència nuclear”)**

És un mètode d'obtenció que consisteix en utilitzar la tècnica de clonació per arribar a crear un embrió, de manera que d'aquest en podem extreure les cèl·lules mare pròpies d'un embrió. Es fa a partir d'un òvul no fertilitzat, sense nucli, i del nucli d'una cèl·lula somàtica adulta de la mateixa persona que necessita ser tractada. De manera que quan introduïm el nucli de la cèl·lula somàtica en l'òvul trobem

que es reprograma fent-se així una cèl·lula mare de manera natural. Això passa perquè el nucli s'ha trobat el medi on la informació ha de ser la d'una cèl·lula mare.

Aleshores la cèl·lula es reproduïx formant un blastocist del qual extraurem les cèl·lules mare, com que són extreïdes d'aquí són cèl·lules mare **totipotents** o **pluripotents**, depenent de l'estadi de desenvolupament del blastocist.

Aquest mètode té molts avantatges, ja que ens permet triar la informació genètica que volem, i així formant l'embrió amb la informació de la persona a qui li aplicarem les cèl·lules mare, evitant el problema del rebuig. L'inconvenient d'aquestes cèl·lules és que en reproduir-se de manera tan ràpida és molt probable que es generi un tumor.

- **Fertilització in vitro:**

Quan una parella decideix fer la fertilització in vitro, que és fecundar l'òvul i l'espermatozoide de manera artificial, no es fecunda un sol òvul amb un sol espermatozoide, ja que seria una pràctica quasi impossible de dur a terme. Per tant, es posen diferents òvuls amb espermatozoides, de manera que moltes vegades es fecunden més embrions dels desitjats, i si la parella vol, els poden donar a la recerca. Aleshores d'aquests embrions sobrants s'extreuen cèl·lules mare pluripotents i totipotents, igual que sempre que les extraïem del blastocist.

Però aquests embrions també es poden posar a congelar amb nitrogen líquid (com a màxim durant 5 anys, perquè és el que el govern permet) per aturar les funcions cel·lulars i així poder-lo observar.

- **Extracció directa del blastocist (“teixits fetals humans”)**

Extreure una sola cèl·lula del blastocist, quan està a l'estadi de 8-10 cèl·lules, està comprovat que si només n'extraïem una o dues no afecta el desenvolupament de la resta del blastocist. La cèl·lula obtinguda la posem en un cultiu que es vagi reproduint, de manera que si no es diferencien, aconseguim una línia de cèl·lules mare totipotents que poden ser congelades i compartides amb diferents laboratoris.

2.5.2. Líquid amniòtic

S'ha descobert que en el líquid amniòtic (és el líquid que protegeix el fetus) hi trobem una alta quantitat de cèl·lules mare molt actives, les quals presenten molts avantatges: creixen molt ràpidament i tenen la mateixa capacitat de diferenciació com les embrionàries i són **multipotents**. A diferència de les embrionàries presenten un gran avantatge que és que es desenvolupen sense crear tumors.

2.5.3. Cordó umbilical

En el moment de néixer la sang que hi ha al cordó umbilical, que és d'on són obtingudes, conté moltes cèl·lules mare que comparteixen les característiques de les cèl·lules mare embrionàries i hematopotètiques, per això aquestes es poden diferenciar en cèl·lules de la sang i del sistema immunològic. El que es fa amb la sang del cordó és congelar-la per si s'ha de fer servir alguna vegada. Són cèl·lules **multipotents**.

Gràcies a la seva baixa immunogenitat s'utilitzen per curar malalties de la sang o restablir el sistema sanguini després del tractament del càncer.

2.5.4. De l'embrió avortat:

Podem obtenir-les de l'avortament d'un embrió amb el permís de la mare. D'allà podem extreure cèl·lules de diferents tipus, segons l'estadi de desenvolupament. Com més desenvolupat està més especialitzades són les cèl·lules.

2.5.5. Cèl·lules somàtiques (d'un adult):

- **Cèl·lules mare amb pluripotència induïda (iPS):**

Són les cèl·lules mare **pluripotents** que s'obtenen a partir de la reprogramació de cèl·lules somàtiques adultes ja especialitzades. Aquesta experiència té l'objectiu d'aconseguir que uns gens que van deixar d'expressar-se durant una etapa cel·lular (quan una cèl·lula s'especialitza, deixa d'expressar alguns gens per poder-se diferenciar i així especialitzar-se), es tornin a manifestar induïnt-ne la seva expressió. Això s'aconsegueix mitjançant la introducció de reovirus programats per introduir gens a l'ADN de les cèl·lules i les reprogramen, aconseguint així cèl·lules que expressen els gens que les fan actuar com cèl·lules mare embrionàries.

Les cèl·lules mare embrionàries i les iPS presenten diverses semblances com la morfologia, el mateix temps d'expressió de certs gens i proteïnes, la capacitat de diferenciació a cèl·lules d'altres teixits, etc.

Aquestes comporten molts avantatges, ja que no cal manipular un embrió per obtenir-les, sinó que les podem obtenir amb la mateixa potencialitat des de cèl·lules adultes.

Com s'ha explicat abans al primer apartat, les persones descobridores d'això van ser Shinya Yamanaka i John Gurdon al 2006. Es va descriure per primera vegada aquest procés a partir de

fibroblasts (cèl·lules musculars) d'un ratolí utilitzant retrovirus (un tipus de virus) que induïen la expressió de diversos gens exògens. Aquesta experiència va ser un dels avanços més grans en l'àmbit de la biomedicina.

Les iPS tenen aplicacions com fer models per l'estudi de malalties, possibles usos terapèutics, bàsicament per la investigació. Per exemple es va aconseguir curar l'anèmia al laboratori amb ratolins. El que fan és agafar cèl·lules de la pell del ratolí i fer un cultiu d'aquestes. Introdueixen uns reovirus dins d'aquest cultiu aconseguint així que es tornin cèl·lules iPS. Després aquestes cèl·lules són corregides substituint el gen defectuós pel gen de les cèl·lules normals. Tornen a especialitzar aquestes cèl·lules, aquesta vegada en cèl·lules mare de la sang, i les introdueixen al ratolí de manera que aquest es cura, ja que les seves cèl·lules ara sí que produeixen ferro. Això demostra que les cèl·lules mare iPS tenen la mateixa aplicació que les mateixes cèl·lules embrionàries. (Fig. 11)

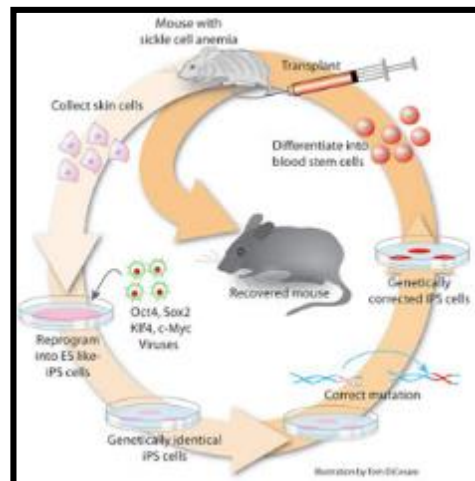


Fig. 11: començant pel ratolí de dalt de tot, aquesta imatge il·lustra l'aplicació de les cèl·lules iPS en el cas explicat.

- **Teixits adults:**

En segons quins teixits hi ha cèl·lules mare de diferents tipus, en podem trobar en el nerviós, muscular, en l'epitelial, en el cardíac, en el sanguini, etc. En aquest últim hi ha la medul·la espinal que és una de les fonts que es creu que té més futur en la cura de malalties immunològiques, i amb els que més s'ha avançat. Segons cada teixit les cèl·lules s'aïllen de diferents maneres.

- Teixit sanguini: És el teixit que conté les cèl·lules hematopotètiques, són les cèl·lules mare que substitueixen a les de la sang quan és necessari. Per tant, aquest teixit conté les cèl·lules que més tard es poden especialitzar en tots els tipus de cèl·lules de la sang, per això són **multipotents**.

S'obtenen de la medul·la espinal, i el que es fa en extreure'n cèl·lules (punxant a llocs estratègics) pot ser fer-ne un cultiu o bé fer un trasplant de la medul·la sencera (tant per un mateix pacient com per fer una donació).

Del teixit de la sang també es poden extreure les cèl·lules a nivell de sang circulant. En aquesta normal no n'hi ha grans quantitats, però el que sí que es pot fer és mobilitzar les de la medul·la espinal fins a la sang, des d'on poden ser recollides (extraient sang de les venes) sense necessitat d'anestèsia general (a diferència de l'extracció en la medul·la), per tant, aquesta pràctica en facilita molt l'extracció.

Aquestes pràctiques serveixen per curar les malalties immunològiques. És una pràctica molt cara de dur a terme, això es creu que és pels problemes amb les farmacèutiques, dels quals en parlarem més endavant en l'apartat d'aplicació de cèl·lules mare.

- Teixit nerviós: de moment només se sap que hi són des de l'any 2000 gràcies a un experiment amb ratolins que va demostrar la seva presència. Aquestes tenen una gran aplicació en un futur de cara a les malalties neurodegeneratives. Encara s'està recercant un bon mètode d'extracció d'aquestes cèl·lules en animals per després aplicar-ho a les persones.
- Teixit muscular: són les que substitueixen a les cèl·lules musculars quan van morint. Són la reserva de cèl·lules multipotents esperant que morin les cèl·lules musculars especialitzades per poder-se especialitzar i posar-se en el seu lloc a fer la seva feina. Aquestes van ser aïllades per primer cop el 2002, i es va poder mantenir en cultiu durant més de 60 divisions sense anomalies cromosòmiques. Depenent del tipus de cèl·lula que es necessiti s'extreu de maneres diferents. Més endavant aprofundirem amb l'extracció d'un tipus de cèl·lules mare d'una distròfia.

3. Regeneració del teixit muscular estriat

3.1. El teixit muscular

Està format per unes cèl·lules allargades que s'han especialitzat molt per tal de poder-se contraure en el moment que reben un impuls nerviós (a través de l'axó d'una neurona motora que està unit a cada fibra) i de relaxar-se quan aquest cessa, aquest moviment és gràcies a l'actina i la miosina, proteïnes, entre moltes d'altres, que permeten que no es danyin les fibres. A més tenen molts capil·lars i vasos que irriguen la sang al teixit. Depenent de la funció, la morfologia i el lloc del teixit n'hi ha de tres tipus:

- El cardíac: forma la massa muscular del cor i el voltant d'alguns vasos. Les cèl·lules que el formen són allargades, estriades, mononuclears (tenen un nucli situat al centre de la cèl·lula), ramificades i unides entre si formant una malla. La seva estimulació depèn del sistema nerviós autònom i és ràpida i involuntària. (Fig. 12).

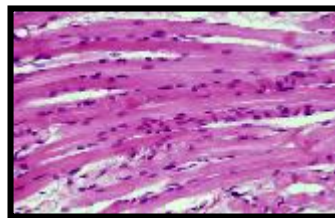


Fig. 12: organització del teixit cardíac sota el microscopi.

- El llis: és propi d'òrgans interns els quals tenen una contracció lenta i regular controlada pel sistema nerviós autònom. Les cèl·lules que el constitueixen són fusiformes, allargades, i tenen un únic nucli al centre. (Fig. 13)

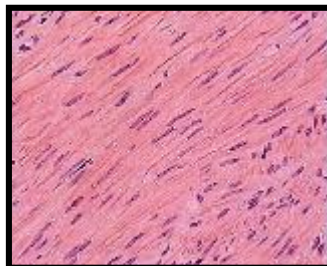


Fig. 13: biòpsia de teixit muscular llis. Podem veure que té unions molt fortes comparades amb les del cardíac.

- L'estriat o esquelètic: és el que forma tots els músculs que tenen moviment voluntari. És de moviment molt ràpid. Les cèl·lules que el formen són molt llargues i multinucleades, perquè són la fusió de diferents miòcits (cèl·lules provinents de la diferenciació mioblasts) que es converteixen en miotúbuls, que més endavant diferencien en miofibretes, envoltades per la làmina basal. Els nuclis es troben a prop del sacrolemma (sinònim de la membrana; es diu així perquè les cèl·lules musculars s'han especialitzat tant que alguns orgànuls reben un nom diferent). Al voltant de les miofibretes hi ha la làmina basal (capa de la matriu extracel·lular secretada per les cèl·lules epitelials que tenen diverses funcions, com l'organització de proteïnes dels sacrolemmes adjacents, regular la proliferació i la diferenciació i la concentració de factors de creixement) que les recobreix. (Fig. 14).

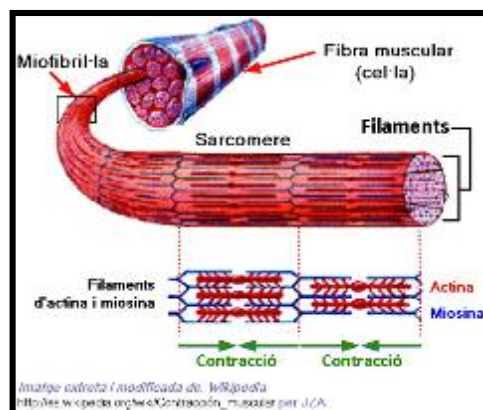


Fig. 14: parts d'una fibra muscular amb els noms de cada part indicats. També hi ha les proteïnes responsables de la contracció muscular marcades i anomenades.

3.2. Cèl·lules que contribueixen en la regeneració muscular

Quan hi ha el desenvolupament embrionari hi ha un moment en què tenim tres capes de cèl·lules de les quals sortiran totes les estructures del cos, aquestes són l'ectoderma, el mesoderma i

l'endoderma. De cada capa surten diferents teixits; el muscular, entre d'altres, surt del mesoderma, per tant, totes les cèl·lules que tenen alguna cosa a veure amb el múscul provenen inicialment del mesoderma. A mesura que l'embrió es va desenvolupant hi ha el teixit mesenquimal, el qual és una mica més específic que el mesoderma, és a dir que no pot fer tants teixits, tot i així té la capacitat de fer el teixit muscular, connectiu i alguns teixits epitelials. Aquest està format per cèl·lules mesènquimes que són pluripotents i d'aquestes en deriven les cèl·lules que intervenen en la formació del teixit muscular, és a dir les cèl·lules satèl·lit, els fibroblasts, els pericits i els mesoangioblasts:

- Cèl·lules satèl·lit o mio blasts: són cèl·lules mare unipotents fusiformes, allargades, uninucleades (Fig. 15), que es troben entre la làmina basal i el sarcolemma. Normalment es troben en un estat quiescent en el qual tot el funcionament està força aturat i sense gastar energia. En el moment en el que hi ha un dany a les miofibretes s'activa tota la "maquinària" de la cèl·lula, diferencia i comença a regenerar el teixit d'una manera que s'explicarà detalladament en l'apartat següent. En estat quiescent veiem que la cèl·lula presenta més heterocromatina perquè no es fa servir gran part del DNA, en aquest estat també s'observa que hi ha pocs orgànuls. En canvi quan s'activa hi ha molta eucromatina perquè la cèl·lula comença a transcriure i traduir tota

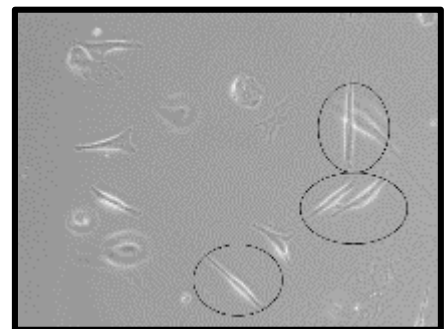


Fig 15: trobem senyalats uns quants mio blasts (cultivats in vitro) no diferenciats, no tots estan senyalats.

la informació i apareixen orgànuls com l'aparell de Golgi, el reticle endoplasmàtic i els ribosomes.

- **Fibroblasts:** són cèl·lules multipotents amb la capacitat de fer teixit connectiu, matriu extracel·lular, col·lagen... La seva funció és la de mantenir la rigidesa del múscul mantenint les fibres unides, cosa que fan gràcies a la seva inflexibilitat. Són les principals que formen el teixit connectiu; quan estan quiescents s'anomenen fibroblasts però quan hi ha un dany al teixit connectiu s'anomenen fibròcits, aleshores s'activen iniciant mitosi i, si cal, migren per tal d'ajudar a regenerar el teixit. El problema de vegades ve quan la fibra està feta malbé els fibroblasts creixen en excés perquè volen regenerar el teixit, però acaben provocant fibrosi (rigidesa dels músculs), per culpa de la seva rigidesa. Podem veure la seva forma en la Fig. 16:

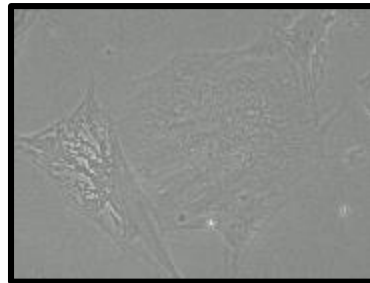


Fig. 16: fibroblasts al primer plà (cultivats *in vitro*).

- **Pericits:** són un tipus de cèl·lules multipotents que ajuden a la regeneració del teixit endotelial. Es troben en contacte amb les cèl·lules endotelials (són les que recobreixen venes i capil·lars) formant una unió de tipus gap permet el pas de molècules gràcies a un petit espai de comunicació entre citoplasmes amb les cèl·lules endotelials. A la part del capil·lar que està tocant el teixit muscular els pericits toquen a la làmina basal, tal com podem observar en la (Fig. 17):

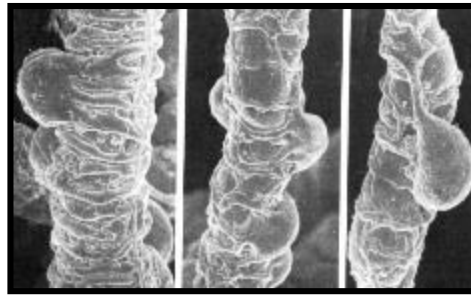


Fig. 17: pericits enrotllant capil·lars.

- **Mesoangioblasts:** són molt semblants als pericits, també es troben al voltant dels vasos sanguinis. Són unes cèl·lules quasi indiferenciades capaces d'especialitzar-se amb cèl·lules del llinatge endotelial o del mesoderma. La funció dels mesoangioblasts *in vivo* no queda clara, no hi ha suficient informació sobre això com per poder dir quina funció té en el cos. (Fig. 18).

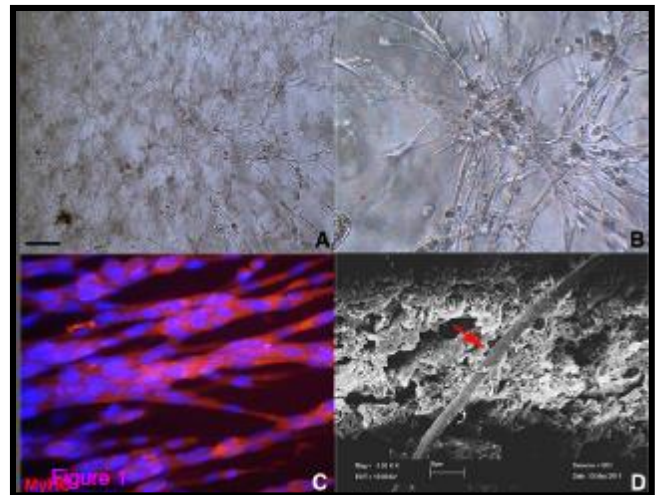


Fig. 18: A, B: mesoangioblasts al microscopi de contrast, donant lloc a miofibres robustes; C: immunofluorescència ensenyant fibres multinucleades procedents de mesoangioblasts; D: fibres al microscopi electrònic, senyalada amb una fletxa n'observem una.

3.3. Procés de regeneració muscular

La regeneració muscular passa per tres estats diferents: la resposta inflamatòria, l'activació i diferenciació de les SC (satellite cells en anglès, fa referència a les cèl·lules satèl·lit) i per últim la maduració i remodelació de les noves miofibres. Quan hi ha la degeneració muscular el primer que passa és la necrosi (mort cel·lular no programada) de les fibres musculars

danyades, fet que provoca resposta inflamatòria durant la qual diferents cèl·lules inflamatòries s'infiltraen al múscul danyat i fagociten la matèria que s'ha d'eliminar.

Després hi ha l'activació de les SC (satellite cells en anglès, són les cèl·lules satèl·lit), aquesta ve causada per diferents factors del niche (el medi, tot el que envolta la cèl·lula que afecta el seu comportament) en el que es troben. Els factors que fan que s'activin es creu que són emesos per les fibres danyades, les cèl·lules en necrosis... Les SC un cop activades poden migrar entre miofibres, però també s'ha vist que poden migrar entre làmines bassals o entre teixits connectius. Quan ja no estan quiescents proliferen (en aquest moment és quan s'anomenen mioblasts), un cop ja n'hi ha suficients per poder-se unir per formar miotúbuls comencen a diferenciar s'uneixen a les miofibres sobrants i les reparen fusionant-se amb aquestes. El que passa *in vivo* (Fig. 19) és diferent del que passa *in vitro*, ja que *in vivo* quan hi ha un dany les SC utilitzen les fibres sobrants i les reparen, en canvi *in vitro* no hi ha fibres restants sinó que formen miotúbuls (els precursors de les miofibres) directament (Fig. 20).

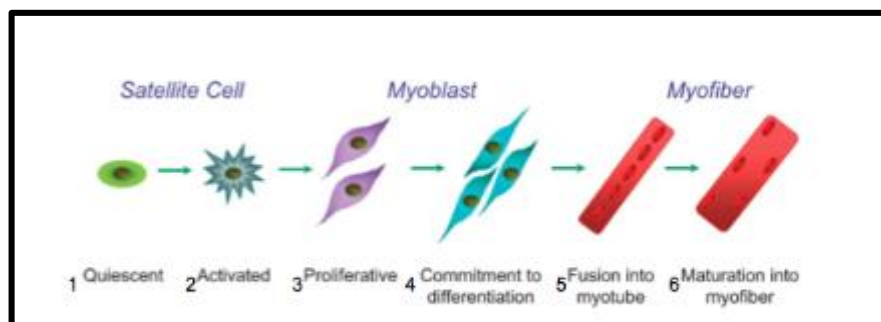


Fig. 19: 1. Estat quiescent, 2. S'activen, 3. Proliferen, 4. S'uneixen, 5. Formen miotúbuls, 6. S'uneixen els miotúbuls formant una miofibra.

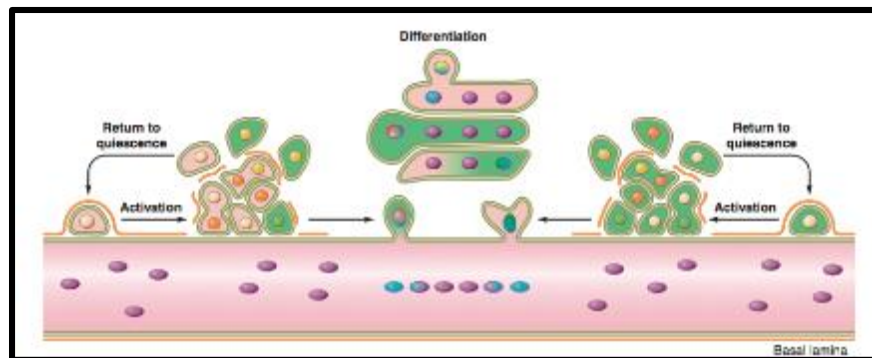


Fig. 20: procés de reparació in vivo, quan les SC es fusionen amb les miofibres. Les SC s'activen, proliferen, es fusionen amb la fibra després d'haver-se diferenciat, i a més algunes tornen a l'estat de quiescència com a reserva per la pròxima vegada que passi això (capacitat d'autorenovació).

Les SC no són les úniques que contribueixen en la regeneració muscular, hi ha moltes altres cèl·lules com els mesoangioblasts (cèl·lules molt semblants als pericits que tenen la capacitat de regenerar el teixit muscular esquelètic), els pericits o els fibroblasts que també hi contribueixen.

Tal com s'ha explicat, en primer lloc els leucòcits i macròfags envaeixen el múscul per tal d'eliminar les fibres danyades, aleshores les cèl·lules satèl·lit s'activen, comencen a proliferar i després a diferenciar regenerant les fibres de mica en mica. De moment encara no està molt clara la funció de les altres cèl·lules, però s'estan investigant. Les que més s'han estudiat són els pericits, que segons un article del març del 2013 es creu que n'hi ha de dos tipus, el tipus-1 que contribueix a la distribució del greix però no a la regeneració muscular; en canvi, el tipus-2 funciona al revés, contribueix a la regeneració muscular, però no a la distribució del greix, per tant, en total ajuden a la regeneració del múscul. No només els pericits tenen capacitat miogènica, sinó també els mesoangioblasts, aquests són els que probablement tindran més aplicació en el futur, ja que s'han realitzat experiments en els quals les injecten dins l'artèria de ratolins amb distròfia muscular, i aquests migren fins allà on hi ha el dany i reparen les

fibres, aquest experiment ha arribat a funcionar amb gossos. Aquests no s'han pogut realitzar en persones per diversos problemes com la dificultat d'obtenir diferents biòpsies d'un mateix pacient o no poder injectar cèl·lules modificades genèticament a pacients amb la malaltia.

Encara que s'hagi observat que totes aquestes cèl·lules tenen la capacitat de diferenciar-se en fibra muscular, les protagonistes d'aquest procés són les cèl·lules satèl·lit.

4. Distròfies musculars

4.1. Definició:

Són un grup de més de 30 trastorns musculars hereditaris progressius que provoquen la debilitat dels músculs a causa de l'alteració en un gen, cosa que afecta la síntesi d'una proteïna (se'n produeix massa o massa poca), per tant, la seva funció també queda trastornada. Això ens fa veure que és un trastorn hereditari: va passant a l'ADN de generació en generació.

La majoria afecten els músculs de moviment voluntari, però també poden afectar els que són de moviment involuntari com el cor, el sistema gastrointestinal, el cervell, etc. Aquesta malaltia impedeix que les persones puguin tenir una vida normal, ja que afecta als músculs de manera que els debilita provocant que la persona no els pugui moure, fins i tot en les formes més greus de distròfies el patidor pot arribar a morir perquè els músculs respiratoris s'atrofien i no permeten la respiració.

4.2. Tipus i característiques

Es classifiquen en 9 tipus diferents segons als músculs que afecten, tot i que dins de cada tipus n'hi poden haver més. Els tipus són:

- **Duchenne:** Comença, entre els 2 i 6 anys, a les cames i a la pelvis desenvolupant-se molt ràpidament fins al punt de no poder moure cap part del cos. Ve produïda per una deleció, en la que s'elimina un nucleòtid de manera que es produeix un corriment en l'ordre de lectura del gen, que provoca un codó STOP. Aleshores el ribosoma deixa de sintetitzar la proteïna abans d'hora, i això fa que els patidors tinguin menys distrofina (proteïna estructural que té l'extrem C-inicial lligat a proteïnes transmembranoses, les quals estan lligades a la matriu extracel·lular i l'N-terminal a les fibres d'actina del citoesquelet, cosa

que permet dissipar la força contràctil evitant el trencament de les cèl·lules musculars, per tant permet la contracció amb la seva estructura). Aquest gen, anomenat DMD, amb 2 milions de parells de bases és el gen humà més gran conegut. La pèrdua de la distrofina provoca que l'actina no es fixi bé, per tant altera el citoesquelet de la fibra muscular dificultant el moviment contràctil, i fent així que es trenqui provocant una atròfia muscular.

- Becker: És una distròfia muscular que consisteix en la debilitat de les cames i la pelvis, els primers símptomes normalment apareixen als 12 anys. Té una progressió lenta comparada amb la de Duchenne. Són molt semblants perquè les dues són distrofinopaties, la diferència és que en comptes de fer-se un codó STOP es produeix una mutació en la seqüència del gen, cosa que fa que hi hagi una alteració en la funció de la proteïna però aquesta segueix present, per això és més lenta que la de Duchenne.
- Miotònica o d'Steinert: és la més patida per adults. Provoca molts símptomes diferents no només propis d'una distròfia, sinó que afecta moltes altres parts del cos a part dels músculs. Les persones patidores tenen una cara particular (Fig. 21)



Fig. 21: cara particular dels patidors de la distròfia muscular Miotònica. En la primera imatge la forma és molt exagerada, en canvi en la imatge de la dreta és més dissimulada.

- Distal: És una malaltia que provoca debilitat als músculs voluntaris propers a les mans i els peus. És molt poc coneguda, ja que dins de la distal hi ha diversos tipus diferents de distròfies, els quals poden tenir diferents mutacions i això la fa complicada d'estudiar. El que se sap és que molts tipus estan lligats amb algun problema en la disferlina (proteïna de membrana que té la funció de reparar-la quan hi ha algun dany).
- Congènita: Com el nom indica, apareix al naixement i dura per tota la vida. Pot progressar molt diferent segons la persona, hi ha casos que es queden estables, fins i tot sembla que augmenta la força amb l'edat, tot i que això simplement és el fet del creixement dels músculs, en aquest cas potser pot portar una vida força normal. En canvi hi ha casos que moren a causa d'un problema respiratori. Fins i tot pot ser que un nen aprengui a caminar però que més endavant (al cap d'uns 5 anys) deixi de caminar a causa del pes. També és possible que mai aprengui a caminar.
- Emery-Dreifuss: És un tipus estrany de distròfia muscular que apareix entre la infantesa i els primers moments de l'adolescència, afectant només a homes perquè segueix un patró ginàndric. Comença amb contractures a la infantesa al coll, els genolls, colzes... aleshores de mica en mica els músculs de les espatlles, de la part superior dels braços es van debilitant. Normalment tenen deformitats de les articulacions. Si la malaltia avança molt, pot arribar a produir la mort del pacient per culpa de problemes cardíacs. La mutació es produeix als gens EMD i LMNA que sintetitzen unes proteïnes que formen part de l'embolcall nuclear. La majoria de Emery-Dreifuss són causades pel gen EMD que produeix una alteració a la proteïna emerina que resulta

essencial per un bon funcionament del múscul esquelètic i del cardíac. Encara no se sap perquè la falta d'aquesta proteïna produeix els efectes d'aquesta patologia. Quan ve produïda per el gen LMNA el que passa és que la laminina A i la C (glicoproteïnes de la làmina basal que es cuiden d'ancorar les cèl·lules epitelials a aquesta entre altres coses) surten alterades, de moment encara s'està investigant.

- Fascioescapulohumeral: tal com diu el nom debilita principalment els músculs de la cara (facio), espatlles (escapulo) i braços (humeral).
- De cintura: Afecta els músculs de la cintura, tal com el nom indica, però també afecta als del voltant de les espatlles. No ve causada per la mutació en un mateix gen, sinó que dins de dominant i recessiu n'hi ha molts tipus, amb variacions als símptomes. Els tipus són els que trobem en la Fig. 22

Família	Herència	Tipus	OMIM	Gen	Locus	Característiques
LGMD1	autòsòmic dominant	LGMD1A	155000	TTIP		
		LGMD1B	155001	LMNA		
		LGMD1C	607801	CAYB		
		LGMD1D	605511	DNAAF3		
		LGMD1E	601419	OES		
		LGMD1F	606485	TNPO2	7q37.1-4q32.2	
		LGMD1G	609115		4q21	
		LGMD1H	612880		3q25.1-4q29	
		LGMD2A	253600	CAPN3		
		LGMD2B	253601	DYSF		
LGMD2C	253700	SGCG				
LGMD2D	608099	SGCA				
LGMD2E	604986	SGCB				
LGMD2F	601987	SGCD				
LGMD2G	601954	TGIF				
LGMD2H	254110	TNMD3				
LGMD2I	607155	FKBP				
LGMD2J	606807	TTN				
LGMD2K	605908	POMT1				
LGMD2L	611807	ANKS				
LGMD2M	611588	FKBP				
LGMD2N	607439	POMT2				
LGMD2O	606822	POMGNT1				
LGMD2Q	613725	PLEC1				

Fig 22.

- Oculofaríngea: Es presenta a l'edat adulta tenint uns primers símptomes als ulls, tenen les parpelles caigudes i se'ls debiliten els músculs del

voltant dels ulls. Després la debilitat es troba en els músculs del coll. Amb operacions intenten millorar l'efecte que produeix aquesta malaltia tant als ulls com al coll, per intentar millorar la qualitat de vida d'aquestes persones

Cap d'aquestes té una cura definitiva sinó que tenen tractament per intentar millorar la qualitat de vida de les persones, la cura definitiva s'està recercant. Una investigació que té molt de futur per tractar les distròfies seria l'aplicació de cèl·lules mare, explicada en el següent apartat.

5. Aplicació de cèl·lules mare

5.1. Definició

L'aplicació de cèl·lules mare o teràpia cel·lular consisteix a aplicar cèl·lules mare a un teixit danyat per tal de substituir les cèl·lules perjudicades per cèl·lules sanes, és a dir que es reproduïxen bé, generades fora de l'organisme, de manera que regeneren el teixit, convertint-se així en cèl·lules pròpies del pacient. La medicina que utilitza aquesta tècnica s'anomena medicina regenerativa.

El problema és que molts dels tractaments per diferents malalties encara s'estan investigant a nivell de laboratori, així que de moment no són aplicables a humans, però això no exclou que en un futur no gaire llunyà la majoria de malalties degeneratives siguin tractades amb cèl·lules mare. Però tot i això sí que hi ha malalties que es tracten amb les cèl·lules mare.

5.2. Passos a seguir

Els processos que se segueixen a l'hora d'aplicar-les és el següent (Fig. 23):

- 1) Extraïem cèl·lules mare del mateix pacient o del donant (depenent de diferents factors com la preferència del pacient o el tipus de malaltia).
- 2) Després fem un cultiu d'aquestes, depenent del cas de vegades es posen en crioscòpia.



Fig. 23: il·lustració dels diferents passos implicats en la teràpia cel·lular

- 3) Les modifiquem genèticament per aconseguir diferenciar-les en el tipus de cèl·lula que necessitem.
- 4) Injectem les cèl·lules mare finals de manera que si tot ha anat bé creixeran fent la funció que han de fer dins de l'organisme del pacient, regenerant així el teixit que abans estava fet malbé.

5.3. Aplicació a les distròfies

Actualment no hi ha un tractament definit per les distròfies musculars, sinó que trobem que encara s'està recercant. Hi ha un munt d'investigacions a diversos llocs del món que busquen un tractament amb l'àmbit de l'aplicació de cèl·lules mare.

El tractament ideal seria injectar cèl·lules mare de manera que regeneressin el múscul. En el cas de les distròfies l'inconvenient és que si aquestes cèl·lules mare són del mateix pacient no regeneraran correctament, ja que tenen un gen defectuós; i si no són seves, el més probable és que hi hagi rebuig. Per tant l'ideal seria trobar la cèl·lula mare muscular capaç de regenerar el múscul, modificar-la genèticament arreglant el problema defectuós i reinjectar-la al pacient, de manera que no hi ha rebuig perquè són pròpies i a més són sanes perquè s'han arreglat.

En l'apartat de cèl·lules mare musculars, hem vist que hi ha diferents cèl·lules amb la capacitat de regenerar el teixit muscular, en les investigacions s'ha vist que cada cèl·lula presenta avantatges i inconvenients a l'hora d'aplicar-les per tractar una distròfia:

- **Els mioblasts:** varis centres de recerca que tenen l'objectiu de curar algun tipus de distròfia han mirat d'utilitzar aquests perquè *in vivo* són les cèl·lules que tenen el paper més important en la regeneració muscular. S'ha vist que si en un ratolí distròfic se li injecten mioblasts

sans (són unipotents), aquests es fusionen amb les fibres fetes malbé, de manera que regeneren parcialment el teixit i la producció de distrofina. El risc d'aquesta tècnica és que el receptor pateixi un rebuig, per això es va pensar que potser una altra solució podria ser la modificació genètica de les cèl·lules del mateix ratolí, "arreglant-les" genèticament i tornant-les a injectar, així segur que no hi ha rebuig. Aquestes tècniques sonen molt bé a la teoria, però un cop es posen en pràctica es comprova que no tot són avantatges, sinó que aquestes cèl·lules tenen grans inconvenients com per exemple la seva poca capacitat de migració, això vol dir que no tenen la capacitat de travessar la paret dels capil·lars sanguinis un cop han estat injectades allà, sinó que han de ser injectades al lloc exacte perquè es regeneri el múscul. Això ens porta a veure un altre inconvenient que és que n'hauríem d'injectar a molts llocs diferents perquè les distròfies afecten una àmplia diversitat de músculs.

- **Pericits:** aquests són tant recents que encara no s'han pogut veure gaire els avantatges o inconvenients que comporten. Però, igual que les altres cèl·lules, aquestes són capaces de fer fibra muscular. Recents estudis han demostrat que aquestes actuen de manera semblant als mesoangioblasts o a les cèl·lules satèl·lit, es veu que quan s'han injectat en ratolins patidors de distròfies, els pericits tenen la capacitat d'envair el teixit i a més es veu que expressen la distrofina, cosa que és avanatjosa per totes les distròfies provocades per un dèficit de disferlina. Aquestes encara s'han d'investigar molt, ja que són molt recents, però de moment sembla que tenen un gran futur.
- **Mesoangioblasts:** són unes cèl·lules que, com els mio blasts, tenen la capacitat de generar fibres musculars. A diferència d'aquests, són multipotents, de manera que es poden diferenciar també amb cèl·lules

del llinatge endotelial o del mesoderma. També presenten un avantatge sobre els mio blasts: tenen capacitat de travessar la paret dels capil·lars, per tant si són injectades, amb suficient quantitat, al corrent sanguini poden arribar a tots els músculs que ho necessitin del cos. Amb aquestes s'ha arribat a millorar la mobilitat dels músculs de gossos i ratolins amb distròfia DMD, a més també s'ha restablert la producció de distrofina. Però, com abans, ens trobem amb el problema del rebuig si les cèl·lules que injectem no són les pròpies, per això el que s'està recercant actualment és agafar els propis mesoangioblasts dels pacients, modificar-los genèticament arreglant la proteïna que no tenen correctament i reinjectant-los. El problema que presenten és que els pacients de distròfia normalment en tenen molt pocs com per injectar-los perquè regenerin tot un múscul, ja que no són gaire abundants al nostre cos. Tot i això aquestes són de les que tenen més futur gràcies a les característiques anomenades anteriorment i pels resultats a nombrosos experiments en els quals els mesoangioblasts han aconseguit millorar i, fins i tot, de vegades curar la mobilitat del patidor i restaurar la distrofina.

- **IPS:** per solucionar el problema esmentat sobre els mesoangioblasts (que no n'hi ha suficients) els científics han recorregut a les cèl·lules mare de pluripotència induïda. L'avantatge que presenten aquestes és que es poden agafar cèl·lules de la pell del mateix pacient, reprogramar-les amb el mètode de Yamanaka, quan han tornat a ser cèl·lules mare pluripotents es poden diferenciar en mesoangioblasts, de manera que aquests no provocaran rebuig, a més en podem agafar amb molta quantitat o agafar-ne i fer-les créixer *in vitro* per després seguir el procés. Aquest mètode és molt recent, per això encara hi ha un llarg camí per investigar si és aplicable a humans, però de moment és el que

té més pinta de funcionar. A més com que es podrien injectar al corrent sanguini serviria per curar molts tipus diferents de distròfies musculars.

5.4. Tractaments actuals

On hi ha més aplicació actualment és en les malalties hemapoiètiques, com la leucèmia o les malalties autoimmunitàries.

En la leucèmia (o les malalties hematopoiètiques):

La leucèmia és un càncer que afecta els glòbuls blancs, que són les cèl·lules de la sang encarregades de defensar-nos contra els organismes patògens que infecten el nostre cos. Amb la leucèmia els glòbuls blancs ja no creixen ni funcionen tan eficaçment com haurien de fer-ho. Els òrgans es veuen afectats de manera que el pacient es torna vulnerable a les infeccions a causa de la debilitat del sistema immunològic.

Per tal de tractar la leucèmia el que s'ha de fer és eliminar els glòbuls blancs anòmals amb quimioteràpia, la qual deixa el sistema hematopoiètic molt dèbil, i per tal de recuperar-lo es fa el **trasplant de medul·la òssia** d'un donant que la té sana. S'injecta en el torrent sanguini del pacient, de manera que es substitueixen les cèl·lules anòmales per cèl·lules mare de la sang sanes (es renova la medul·la òssia) i es reforça el sistema immunitari del pacient, obtenint així un pacient amb un sistema immunitari normal i sa.

El problema del trasplant és que el donant ha de ser compatible amb el pacient per tal d'evitar el rebuig. En les noves tècniques els investigadors han trobat maneres d'ajudar a les cèl·lules mare del donant a multiplicar-se cosa que ajuda que el tractament sigui més efectiu. Però encara s'ha de fer recerca per fer la cura contra les malalties sanguínies per fer el tractament més precís. Aquest mateix tractament es duu a terme amb els càncers i/o malalties que afecten les cèl·lules de la sang.

5.5. Futurs tractaments

- Utilitzar les cèl·lules mare per **provar els medicaments** provant-los en cèl·lules que són humanes (després d'haver-los provat en animals seguint tota la metodologia). Aquesta aplicació sembla molt útil, ja que actualment la prova es fa en animals i encara que a ells els funcioni després, algunes vegades, en fer la prova amb humans veiem que el medicament té més efectes perjudicials que favorables (havent afectat a la salut de les persones voluntàries que s'han posat sota el tractament experimental). Per això si tenim l'oportunitat de provar els medicaments amb cèl·lules humanes abans que amb els humans podrem veure si hi ha molt efectes nocius. De manera que en el cas que sigui molt danyós no es provarà després en persones i directament es buscarà una manera de millorar el medicament sense haver fet "mal" a cap humà.
- **Proliferar les cèl·lules mare del cordó umbilical** per tal d'utilitzar-les en un futur si és necessari.
- **En les malalties degeneratives** com l'Alzheimer, el Parkinson, la diabetis, etc. Totes aquestes malalties es podrien curar o tractar injectant cèl·lules mare allà on són necessàries, i que aquestes es converteixin en el tipus de cèl·lules fetes malbé, per tal de substituir-les regenerant així el teixit.

En tots aquests camps actualment hi ha un camp molt ampli d'investigació per aconseguir fer els tractaments contra les malalties més precisos i menys perjudicials, d'aquesta manera s'aconseguirà millora la qualitat de vida de les persones.

6.Pràctica

Per fer la meua part pràctica vaig poder estar al departament de malalties neuromusculars de l'hospital de Sant Pau de Barcelona, on vaig poder observar diferents pràctiques que ells duen a terme al dia a dia.

6.1. Diagnòstic distròfies mitjançant biòpsies musculars

- Una biòpsia muscular primer de tot el que s'ha de fer és congelar-la en nitrogen líquid per tal de conservar-la dins de bombones (Fig. 24)



Fig. 24: podem observar un investigador extraient caixes de biòpsies musculars de dins la bombona on hi ha el nitrogen líquid.

- El que es fa després és tallar-la amb una gavineta molt fina i molt precisa, la qual està a -20 graus. Funciona posant la biòpsia en aquesta placa negra i després movent la gavineta, que és la placa gris, amunt i avall, de manera que va fent talls molt fins (Fig. 25).

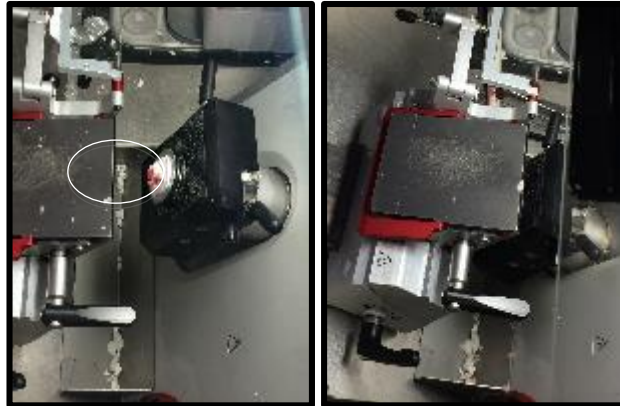


Fig. 25: En la imatge de l'esquerra veiem la ganiveta abans de tallar la biòpsia, que és el que està encerclat; en la de la dreta ja s'ha realitzat el tall i està sobre la ganiveta.

- Un cop tenim el tall agafem un porta, l'apropem al tall a dins de la màquina i aquest s'enganxarà sol per diferència de temperatures.
- Ara el que passa és que no es distingeixen les fibres perquè el múscul no està tenyit, per això primer de tot fan una tinció (hi han molts tipus de tincions, aquí explicaré les que he pogut observar de més a prop) de les fibres per tal de veure l'estat del múscul, i més endavant es realitza una immunohistoquímica segons els símptomes del pacient per saber quina distròfia pateix.
- **TINCIÓ AMB HEMATOXILINA I EOSINA:**
Són uns reactius que tenyeixen els nuclis de color blau i el citoplasma rosa, de manera que podem veure l'estat del múscul i pensar quina distròfia pot estar patint només veient la forma de les distròfies musculars i la disposició dels nuclis. Si està malament el que es fa és realitzar la immunohistoquímica segons la distròfia que creiem que té per corroborar les hipòtesis. Aquesta és una pràctica molt bàsica que simplement es basa en reaccions de neutralització, com que l'ADN és un compost àcid si hi tirem una base (l'hematoxilina) reacciona tenyint-

lo de blau; passa el mateix amb el citoplasma però al revés, ja que aquest és bàsic i l'eosina que hi tirem és un component àcid. Per tant són simples reaccions de neutralització. Aquí podem veure la primera imatge d'un múscul sa, i la segona que és un múscul distròfic molt deteriorat (Fig. 26), ja que en segueix el patró:

- Les fibres tenen diferents mides.
- Els nuclis es troben al mig, en contres d'aprop de la membrana.
- Hi ha molt més teixit connectiu del que hi havia.
- Apareix teixit adipós.
- Fibres rodones amb nuclis grans, anomenades fibres regenerants.

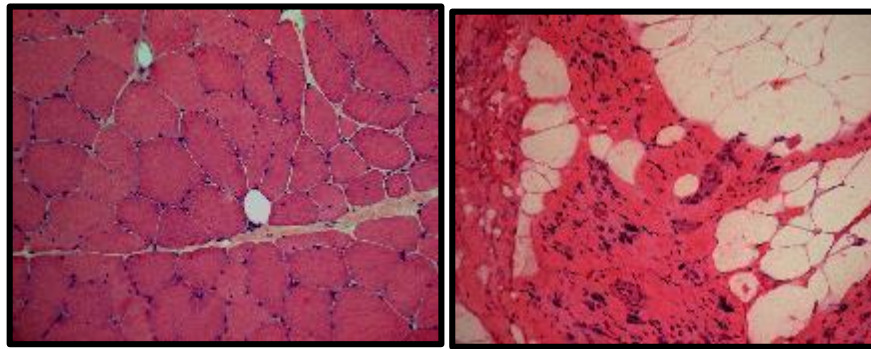


Fig. 26: observem a la dreta un biòpsia muscular sana i a l'esquerra una de distròfica.

- **IMMUNOHISTOQUÍMICA:**

És una pràctica que utilitza la base del sistema immunitari del cos per detectar la proteïna que necessitem trobar. Aquest funciona generant anticòssos contra els antígens aliens que amenaçen al cos. La propietat d'aquest mecanisme és que cada anticòs és específic per una proteïna, per tant si nosaltres el que volem és detectar una proteïna perquè no sabem si hi és, o no en sabem la quantitat, el que fem és posar aquest anticòs en contacte amb la biòpsia muscular, en aquest cas, ja que estem buscant una proteïna en el múscul. De manera que ho deixem incubar donant temps als anticòssos per s'enganxar's-hi. En el cas que

la proteïna que busquem hi sigui, l'anticòs s'hi haurà enganxat, per això l'haurem detectat (marcatge directe). Aquesta és la teoria bàsica, però perquè es vegi bé allà on està la proteïna el que es fa molts cops és fer la immuno amb dos anticossos (marcatge indirecte), és a dir un primari que s'enganxi a la proteïna i un secundari que s'enganxa al primari. L'avantatge d'aquest és que no només un secundari s'enganxa al primari, sinó que varis ho fan de manera que queda molt marcat allà on està la proteïna. A partir d'això, un cop hem tenyit el múscul, podem veure si el múscul té la forma que ha de tenir i si hi ha la quantitat de proteïna normal. En les següents imatges podem veure un múscul molt deteriorat, i sabem que aquesta persona pateix una distròfia, ja que compleix les condicions d'un patró distròfic (Fig. 27)

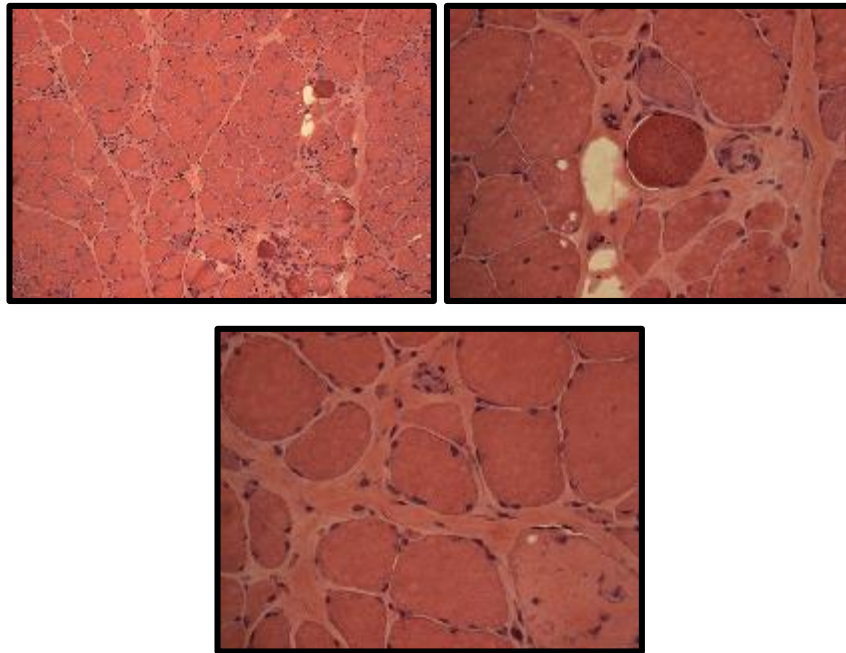


Fig. 27: Biòpsia muscular distròfica. Els experts mirant imatges com aquestes ens podrien dir quina distròfia creuen que el pacient pot estar patint només amb les condicions que té la biòpsia.

- **EXEMPLE:**

Per deixar-ho ben clar posarem l'exemple d'un pacient que va al metge i explica que havia sigut esportista. Quan li fan l'examen per saber què té veuen que té una lleu atrofia al bessó esquerre i que li costa posar-se de puntetes. Aleshores decideixen fer-li una biòpsia muscular i fer-li diferents proves. (Fig. 28)



Fig 28: A: Tinció hematoxilina-eosina: veiem que el múscul està correcte, encara que sembli irregular, això és la direcció del tall.

B: immunohistoquímica de la disferlina del control.

C: immunohistoquímica de la disferlina del pacient, com s'observa en la imatge, no hi ha disferlina a la membrana de les fibres, per tant aquest pacient és patidor d'una distròfia per dèficit de disferlina.

Per tant amb aquesta pràctica es pot veure que una gran part de la feina del diagnòstic de malalties, tal com la distròfia, es realitza al laboratori, fent les proves adients.

6.2. Tractant amb mioblasts

Al laboratori vaig tenir la possibilitat de realitzar la següent pràctica amb mioblasts.

Al final del treball hi ha un annex amb les fotografies en gran per tal de poder-les veure amb detall.

Objectiu:

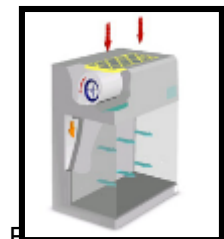
Ens en vam plantejar dos:

1. Diferenciar mioblasts (cèl·lules satèl·lit activades) a miotúbuls utilitzant primerament un medi de proliferació i més endavant un de diferenciació.
2. Observació del citoesquelet de les cèl·lules diferenciades realitzant una immunocitoquímica de la tubulina, ja que és la proteïna bàsica del citoesquelet.

Fonament teòric:

- Aspectes a vigilar dins del laboratori:

→ Tots els procediments amb cèl·lules els realitzem obligatòriament sota una campana perquè fa que estiguem treballant en un medi estèril. Té aire que va de dalt a baix formant com una capa laminar que no permet que entrin bacteris, també hi ha pressió de dins cap a fora tal com s'il·lustra en la Fig. 29. A més abans d'utilitzar-la es posen rajos ultraviolats que esterilitzen l'ambient.



ig. 29

- Quan es treballa amb cèl·lules sempre s'han de tenir en compte molts aspectes: que el material que utilitzes no toqui enlloc ni surti de la campana perquè si tens brutícia (no observable a simple vista) se't contamina el cultiu i les cèl·lules poden morir. També s'ha de vigilar que res no estèril no entri a un lloc on hi ha material estèril perquè sinó l'estèril es contamina. Cada cop que algú utilitza la campana l'ha de netejar després amb alcohol perquè no hi quedi cap brutícia. Quan utilitzes flascons s'han de portar sempre amb una inclinació contrària al tap perquè no entri líquid a aquest, ja que aleshores no hi haurà l'intercanvi de gasos necessari per a la vida de les cèl·lules. Cada cop que utilitzem un estri amb algun element i toquem les cèl·lules no podem fer servir el mateix material si ha tocat a algun lloc o si hem de tirar-hi alguna substància diferent que la d'abans, així que el més segur és canviar-la a cada acció diferent que fem. Cada cop que tirem alguna substància sobre les cèl·lules hem de vigilar de tirar-la sobre una paret en la qual no hi hagi les cèl·lules perquè si no les podríem desenganxar. Quan agafem els cobres on hi ha cèl·lules amb pinces hem de procurar agafar-los per el costat per no endur-nos cèl·lules. Quan hem de posar els cobres on hi ha cèl·lules en contacte amb algun element hem de tenir en compte tota l'estona on estan les cèl·lules perquè sinó no farà efecte sobre aquestes.
- Respecte al material hem de vigilar coses com: apuntar l'últim cop que s'ha realitzat alguna pràctica, anotar què hi ha a l'interior d'un recipient i el nom de la persona que se'n cuida. Quan agafem cobres amb pinces vigilar de no estrènyer massa perquè si no se'ns poden trencar.

- Teoria de la immunocitoquímica:

La teoria és la mateixa que en la immunohistoquímica explicada anteriorment, la diferencia és que s'aplica a cèl·lules. A part en el nostre cas volem que sigui amb fluorescència i que es vegi molt bé per tant ho fem amb marcatge indirecte, en el que l'anticòs secundari porta un fluorocrom que permet la fluorescència. En aquesta pràctica en concret volem marcar la tubulina, per tant primer es posa l'anticòs primari, que és el que s'enganxa a la proteïna. Nosaltres utilitzem un anticòs primari de mouse, per tant és un anticòs que s'ha extret de ratolins tirant-els-hi uns antígens que han provocat que el sistema immunitari del ratolí generi molts anticossos contra la tubulina en el nostre cas. Després d'aplicar l'anticòs primari hem hagut de posar blocking goat que ens fa assegurar que l'anticòs secundari de goat-anti mouse (cabra en anglès) que després posarem no s'enganxi a proteïnes pròpies de cabra però que no siguin els anticossos primaris de mouse, que són els que interessa que s'hi enganxin. Per això posem el blocking que és sèrum de cabra que s'enganxarà als elements que detecti pròpies de cabra, de manera que bloquejarà tot allò en el que el secundari es podria enganjar per error, així ens assegurem que el secundari només vagi a l'anticòs primari. Després dels rentats, i tot el que s'explica detalladament després, es posa el secundari que en aquest cas és de goat contra mouse, és a dir, són anticossos generats en una cabra per enganjar-se als de mouse, i a més tenen un fluorocrom. Aquesta tècnica és de marcatge indirecte perquè utilitzem un secundari que ens marca visiblement la proteïna. Si fos directe utilitzaríem un primari amb un fluorocrom, el problema és que si només utilitzem primari, el marcatge queda molt més fluix perquè només un anticòs s'enganxa a l'antígen. En canvi si ho fem amb el secundari, es marca més perquè més d'un secundari s'enganxa en un mateix primari, de manera que queden diversos secundaris amb

fluorocrom enganxats en un primari, així queda la proteïna molt més marcada. (Fig. 30)

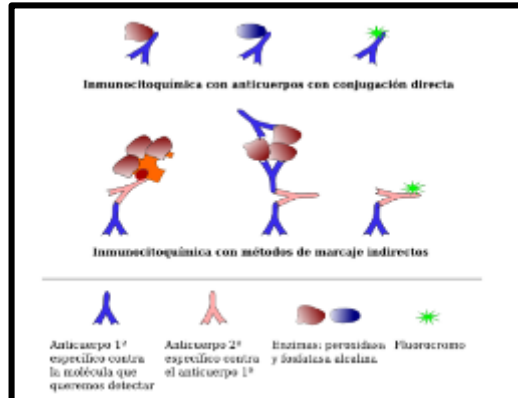


Fig. 30 : Marcatge directe o indirecte. També es veu que es poden utilitzar les reaccions d'alguns enzims per marcar.








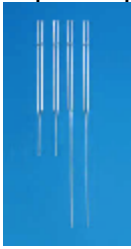




Hipòtesi inicial:

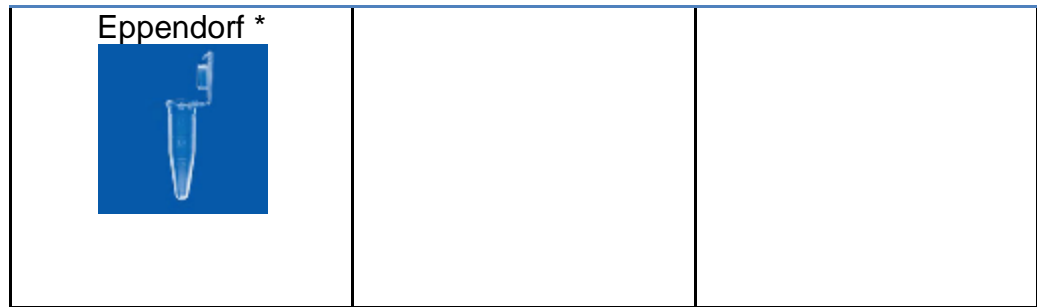
Tenim uns mioblasts, els quals sabem que són cèl·lules mare multipotents que per si soles es diferencien en miotúbuls, per tant si nosaltres traiem els factors de creixement del medi, mantenint la resta de components, les cèl·lules deixaran de proliferar, així que passaran a la nova fase (sempre que hi hagi suficients cèl·lules perquè es puguin unir) i es diferenciaran. També s'unirien si en contres de canviar el medi de proliferació al de diferenciació les deixéssim créixer fins que toquessin les unes a les altres, per contacte algunes acabarien diferenciant. Però donarà més resultat si els canviem el medi, per tant és el que farem en aquesta pràctica.

La immunocitoquímica en teoria, com s'ha explicat abans, si posem correctament les cèl·lules en contacte amb els anticòsps i fem les dissolucions com s'han de fer, hauria d'anar tot correctament. Només incubarem un dels cobres amb l'anticòsps primari perquè l'altre faci de control negatiu. Això ho fem perquè l'altre cobre sí que l'incubem amb el secundari, i també li posem bloquant, per tant si amb el negatiu surt

alguna cosa marcada voldrà dir que el secundari s'ha enganxat a altres elements que no són l'alticòs mouse enganxat a la tubulina, per tant estaria marcant altres coses que no ho són. En teoria el negatiu ha de sortir tot negre si el bloqueig s'ha posat correctament, i l'altre ha de sortir tota la tubulina marcada.

Material:

Flascó de cultiu cel·lular * 	Placa de petri * 	Pinces 
Pipeta automàtica * 	Puntes per la pipeta 	Microscopi 
Aspiradora 	Punta per aspirar 	Cobre 
Porta 	Pipeta pasteur 	Tub Falcon 



* Flascó de cultiu cel·lular: serveix per guardar les cèl·lules amb el seu medi de cultiu, té un tap especial que és el que permet l'intercanvi de gasos idoni per la vida de les cèl·lules. N'hi ha de diverses mides segons la pràctica que hagi de realitzar, si necessites moltes cèl·lules o poques, si vols un medi molt confluent, etc.

* Placa petri: serveix per diverses coses, en aquesta pràctica hi vam tenir les cèl·lules amb els cobres.

* Pipeta automàtica: s'utilitza molt per agafar la quantitat exacta alguna substància i deixar-la tota sense perdre'n ni una mica, però sempre amb un volum micromètric, és a dir que la seva mesura són microlitres. Per tal de poder deixar tota la substància té tres posicions, a l'agafar s'apreta només fins al primer "tope", s'agafa la substància i ja es pot desapretar; per deixar-la s'apreta fins al fons, de manera que segur que no ens queda res a dins. Quan s'enganxa la punta (de la mida que tu vols) s'ha d'apretar perquè ha de fer el vuit, si no no agafa el volum desitjat. N'hi ha de diferents mides, es pot regular el volum que es vol però cada pipeta té un mínim i un màxim, per això n'hi ha de diferents mides.

* Eppendorf: com que és molt petit, s'hi posen substàncies mesurades amb microlitres com per exemple els anticossos.

Material reactiu:

<p>PBS *</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>IX</th> <th>CF</th> <th>250 mL</th> <th>500mL</th> <th>1000mL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl</td> <td>138 mM</td> <td>2.015 g</td> <td>4.03 g</td> <td>8.06 g</td> </tr> <tr> <td>KCl</td> <td>3 mM</td> <td>0.055 g</td> <td>0.11 g</td> <td>0.22 g</td> </tr> <tr> <td>Na₂HPO₄</td> <td>8.1 mM</td> <td>0.2875 g</td> <td>0.575 g</td> <td>1.15 g</td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>1.5 mM</td> <td>0.05 g</td> <td>0.10 g</td> <td>0.20 g</td> </tr> <tr> <td>dH₂O</td> <td>—</td> <td>cbp 250 mL</td> <td>cbp 500 mL</td> <td>cbp 1 L</td> </tr> </tbody> </table>					IX	CF	250 mL	500mL	1000mL	NaCl	138 mM	2.015 g	4.03 g	8.06 g	KCl	3 mM	0.055 g	0.11 g	0.22 g	Na ₂ HPO ₄	8.1 mM	0.2875 g	0.575 g	1.15 g	KH ₂ PO ₄	1.5 mM	0.05 g	0.10 g	0.20 g	dH ₂ O	—	cbp 250 mL	cbp 500 mL	cbp 1 L	<p>Medis de cultius *</p> 	<p>Vectashield *</p> 
IX	CF	250 mL	500mL	1000mL																																
NaCl	138 mM	2.015 g	4.03 g	8.06 g																																
KCl	3 mM	0.055 g	0.11 g	0.22 g																																
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM	0.2875 g	0.575 g	1.15 g																																
KH ₂ PO ₄	1.5 mM	0.05 g	0.10 g	0.20 g																																
dH ₂ O	—	cbp 250 mL	cbp 500 mL	cbp 1 L																																
<p>Aigua destil·lada</p> 					<p>Tripsina</p> 																															

Material reactiu:

* PBS (Phosphate Buffered Saline): dissolució que es prepara al laboratori amb els elements a la fotografia i s'utilitza per fer rentats. A la vista és com aigua.

* Medis de cultius: canvia de color segons el Ph, com més vermellós més bàsic i com més grogós més àcid, d'aquesta manera podem saber si les cèl·lules es troben en un medi a simple vista, quan el color canvia el més recomanable és canviar de medi i posar-ne de nou.

* Vectashield: serveix per tenyir els nuclis amb fluorescència i que quedin de color blau.

Procediment:

Per fer tota aquesta pràctica vam haver de fer molts procediments diferents, primer vam fer un pase d'un medi de cultiu primari (vol dir que les cèl·lules havien estat extretes pel mateix laboratori des d'una biòpsia muscular i per tant com que no són comercials són més dèbils i més fàcils de morir) a un flascó. Un cop ja les teníem en un pot diferent les vaig anar fent créixer mitjançant el medi de proliferació. Després quan vam veure que ja hi havia suficients cèl·lules vam canviar el medi de proliferació pel de diferenciació, de manera que ara les cèl·lules comencessin a convertir en miotúbuls. Un cop vam tenir miotúbuls vam fer la immunocitoquímica de la tubulina, però de dos cobres amb cèl·lules només en vam fer amb un dels dos perquè l'altre servís de control negatiu. Tots aquests passos s'expliquen detalladament al següent apartat:

Metodologia:

- **Extracció de cèl·lules mare des d'una biòpsia muscular:** en la Fig. 31 podem observar com descongelen una biòpsia. Aquest pas jo no el vaig poder observar, per això no en conec els detalls, però sé que és com es van extreure les cèl·lules meves. A grosso modo puc explicar que és posant la biòpsia muscular en una placa amb medi i al cap d'uns dies s'observa que les cèl·lules han anat sortint de la biòpsia i s'han anat alliberant, de manera que les extreuen d'allà i se'n fan les línies que siguin necessàries.



Fig. 31: dins de la mateixa màquina on es fan els talls es descongela la biòpsia per després obtenir-ne els cèl·lules. En la imatge veiem un tècnic de laboratori desconelant una biòpsia.

- **Pase del cultiu** per fer la meva línea:
 1. Posar la gelatina en el flascó on posarem les cèl·lules perquè és sobre aquesta on s'enganxen les cèl·lules. Per tal que la gelatina es dipositi bé la posem en la incubadora a 37 graus i la deixem allà durant tot el procediment.
 2. Treure el medi amb una pipeta i dipositar-lo en un tub falcon.
 3. Tirar PBS a les cèl·lules per tal de netejar la brutícia i tirar-lo al tub falcon.
 4. Tirar tripsina, que és un enzim digestiu que desnatura les proteïnes de membrana que fan que s'enganxin les cèl·lules al fons de la placa, de manera que fa que les cèl·lules es desenganxin del fons.
 5. Mirem al microscopi les cèl·lules a veure si s'han desenganxat, això ho sabem per la forma, les veurem més rodones perquè ja no estan esteses pel fons i si movem el flascó, veurem que es mouen, a diferència de quan estan enganxades. Si observem que encara n'hi ha moltes podem colpejar suaument el fons del flascó per intentar que es desenganxin. Tot el procediment quan hi ha la tripsina actuant sobre les cèl·lules ha de ser ràpid, ja que si es deixa durant massa estona, començarà a actuar sobre altres proteïnes i pot arribar a matar a les cèl·lules.
 6. Tirem medi de cultiu en les cèl·lules per fer que la tripsina deixi d'actuar, ja que la tripsina es desnatura amb dos dels components del medi: el calci i el magnesi. Així segur que les nostres cèl·lules no moren.
 7. Agafem tot el que tenim dins del pot (ara ja estem agafant cèl·lules i tot) i ho posem en el tub on hi ha tot el que hem anat tirant.

8. Centrifuguem el tub, com que només n'hi ha un n'hem de posar un altre que pesi igual, a l'altre cantó de la centrifugadora de manera que quedi de manera simètrica estant així equilibrada.
 9. Ara veurem que al fons del tub hi ha un pellet (és com un tel blanc) que és on hi ha les cèl·lules, doncs aspirem el sobrenadant però deixant una mica menys de mig dit de medi junt amb el pellet. En aquest moment hem de vigilar de no fer gaires moviments amb el tub perquè si no se'ns tornarà a barrejar tot i aspirarem les cèl·lules sense voler.
 10. Posem mig dit més de medi del nou (aquest l'hem tret de la nevera una mica abans de posar-lo a les cèl·lules per fer que es temperés, és a dir que agafes temperatura ambient), barregem tot el que tenim, posem la resta de medi.
 11. Aspirem la gelatina sobrant que havíem deixat a reposar.
 12. Ho dipositem en el nou flascó (el qual ja té la gelatina correctament). Les cèl·lules tardaran un dia més o menys a tornar-se a enganxar.
- **Canvi de medi** cada 2 o 3 dies (canviar sobretot si veiem que té un color més taronja, perquè això vol dir que el Ph és més àcid del que hauria de ser i pot ser perillós per les cèl·lules):
 1. Traiem el medi de proliferació de la nevera i el posem a la campana a temperar. Els elements que porta el medi de proliferació són:

MEDI CULTIUS

Medi amb 10% FBS i factors de creixement.

	100 ml	200 ml	500 ml
D-MEM (ml)	64.8	129.6	324.0
M-199 (ml)	21.6	43.2	108.0
FBS (ml)	10.0	20.0	50.0
Insulina (ml)	1.0	2.0	5.0
Glutamina (ml)	1.0	2.0	5.0
FGF (ml)	0.5	1	2.5
EGF (ml)	0.1	0.2	0.5
PSF (ml)	1.0	2.0	5.0

D'aquesta llista tot són dissolucions riques en proteïnes, lípids, glúcids, glucosa, aminoàcids, vitamines, antibiòtic, i moltes altres substàncies que fan que es mantinguin tots els elements perquè la cèl·lula pugui tenir un bon metabolisme en funcionament, mantenint-les així en vida. Els dos últims components (FGF, EGF) són els principals encarregats que les cèl·lules proliferin perquè són els factors de creixement.

2. Aspirem el medi que hi ha inclinant el pot i aspirant-lo des d'una paret que sabem que no hi ha cèl·lules enganxades per tal de no aspirar-les sense voler.
3. Tirem PBS per netejar la brutícia, l'agafem amb una pipeta, el dipositem sobre les cèl·lules (tirant-ho sobre una paret on no n'hi hagi)
4. L'aspirem canviant de punta, vigilant de no tocar el fons on hi ha les cèl·lules.

5. Agafem medi de cultiu amb una pipeta i el dipositem a les cèl·lules.
- **Pase:** vam passar d'un flascó a una placa de petri petita amb dos cobres. Fem els mateixos passos d'abans, amb la diferència que al pas 1 en posar la gelatina hi posem també els cubres ben enfonsats, i ho deixem igual a temperatura 37 durant tot el procediment que és exactament el mateix.
 - **Canvi de medi de proliferació al de diferenciació** quan veiem que ja està confluent perquè els mioblasts es comencin a diferenciar. El medi de proliferació conté aquests elements:

	200 ml	500 ml
Medi de diferenciació 2% FBS sense factors de creixement		
D-MEM (ml)	142,5	356,3
M-199 (ml)	47,5	118,5
FBS (ml)	4	10
Insulina (ml)	2	5
Glutamina (ml)	2	5
PSF (ml)	2	5

Com veiem a la llista, en aquest no hi ha els factors de creixement, això és perquè les cèl·lules un cop paren de proliferar passen a la següent fase que és la diferenciació, així que de mica en mica aniran diferenciant fins que arribem a tenir miotúbuls.

- **Immunocitoquímica de la tubulina** (tots aquests passos no cal que siguin en un medi estèril perquè matarem igualment a les cèl·lules):
 1. Aspirar el medi que hi ha i tirar PBS per rentar la brutícia directament a la placa de petri.
 2. Tirem metanol fred (amb una pipeta) després d'haver aspirat les substàncies d'abans, el deixem durant 5 minuts. El metanol fred el que fa és matar les cèl·lules i les deixa quasi igual de quan estaven vives, d'això se'n diu fixació.
 3. Aspirem el metanol i fem un rentat amb PBS, és a dir que el tirem a la placa (amb una pipeta) i després l'aspirem.
 4. Posem bloquing goat, que és una substància que impedeix que l'anticòs secundari s'enganxi a proteïnes que no busquem, és a dir que bloqueja tota proteïna que és de goat i en la qual el secundari s'hi podria enganxar per error, d'aquesta manera ens assegurem que només ens marqui la tubulina. El bloquing el dissolem amb tween (0,1% d'aquest) perquè és un detergent que permeabilitzarà la membrana plasmàtica, ja que és lipídica i el detergent també. Necessitem que ens la permeabilitzin perquè la proteïna que volem marcar està dins de la cèl·lula, d'aquesta manera els anticòssos poden entrar a la cèl·lula per marcar la tubulina (proteïna del citoesquelet). Aquesta dissolució la deixem aplicant a les cèl·lules durant 30 minuts.
 5. Fem la dissolució de l'anticòs primari (mouse que s'enganxen a la tubulina) amb la d'abans, 1/100 (1 microlitre d'anticòs amb 100 microlitres de bloquing + tween), la fem amb una pipeta dins d'un eppendorf.
 6. Fem una bombolleta de 40 microlitres de la dissolució amb l'anticòs sobre un plàstic que hem preparat amb una pipeta.
 7. Agafem el cobre de la placa de petri que sabem que té més cèl·lules tenint en compte on estan les cèl·lules (estan a dalt del

cobre quan les traiem) i hem de procurar que les cèl·lules quedin en contacte amb la bombolleta perquè l'anticòs es pugui enganxar correctament a la tubulina de les cèl·lules, l'altre cobre amb poques cèl·lules el farem servir de control negatiu de tubulina, per això no el posem ara amb l'anticòs, sinó que el deixem amb el bloquing. Deixem això incubant overnight a 4 graus en aquest cas (havent-ho tapat amb una tapa coberta per paper d'alumini perquè així la fluorescència no marxa), perquè si fós al matí ho podríem haver deixat durant 1 hora a temperatura ambient.

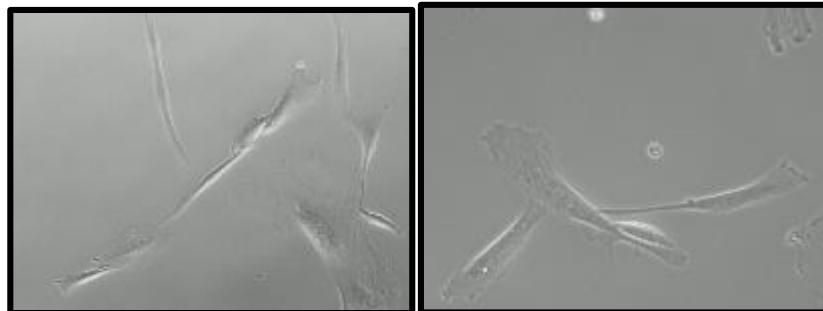
8. L'endemà al matí rentem amb PBS passant el cubre per tres pous amb aquest per tal que quedi ben net, com que l'altre està amb bloquing no cal que el rentem, simplement el posarem directament amb el secundari (goat anti mouse 488, és el que té fluorescència i que sigui 488 vol dir que serà de color verd).
9. Fem la dissolució del secundari amb el bloquing + tween 1/200.
10. Fem dues bombolletes com la del primari (40 microlitres cada bombolleta) però amb el secundari.
11. Agafem els dos cobres ara i els posem sobre la bombolleta de manera que les cèl·lules estiguin en contacte amb el secundari.
12. Ho deixem incubant durant 1 hora a temperatura ambient, també tapant-ho.
13. Fem un rentat amb aigua destil·lada passant per tres pous també.
14. Agafem un porta i hi tirem dues gotes de vectashield (producte que tenyeix el nucli amb fluorescència), una per cada cobre i posem els cobres.

Resultats i conclusions:

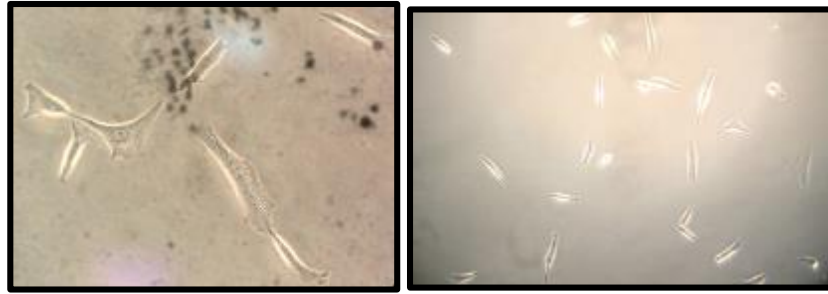
Diferenciació:

En aquest apartat explicarem dia per dia què vam fer i posarem les imatges que vam fer alguns dies per tal de poder veure un progrés, i al final es farà un resum amb les fotografies més significatives per poder-ne treure conclusions:

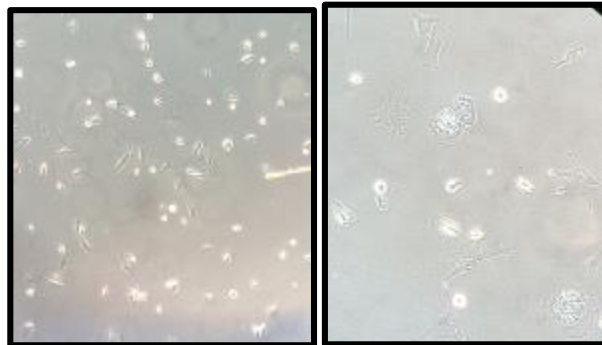
- Dia 1: fotos del cultiu primari obtingut directament d'una biòpsia muscular, porten dos dies en aquest flascó. En aquesta imatge podem observar que hi ha molt poques cèl·lules, encara que sembli que s'estiguin alineen, el flascó era molt poc confluent, és casualitat haver trobat cèl·lules que s'uneixen, perquè en aquest moment només estaven amb medi de proliferació.



- Dia 6: fem la meva línia de l'anterior fent els passos explicats abans.
- Dia 12: els hi vaig canviar el medi per primer cop jo mateixa i vam fer fotos d'abans de canviar el medi. Com podem veure en les imatges és un medi molt poc confluent i tenim molt poques cèl·lules.



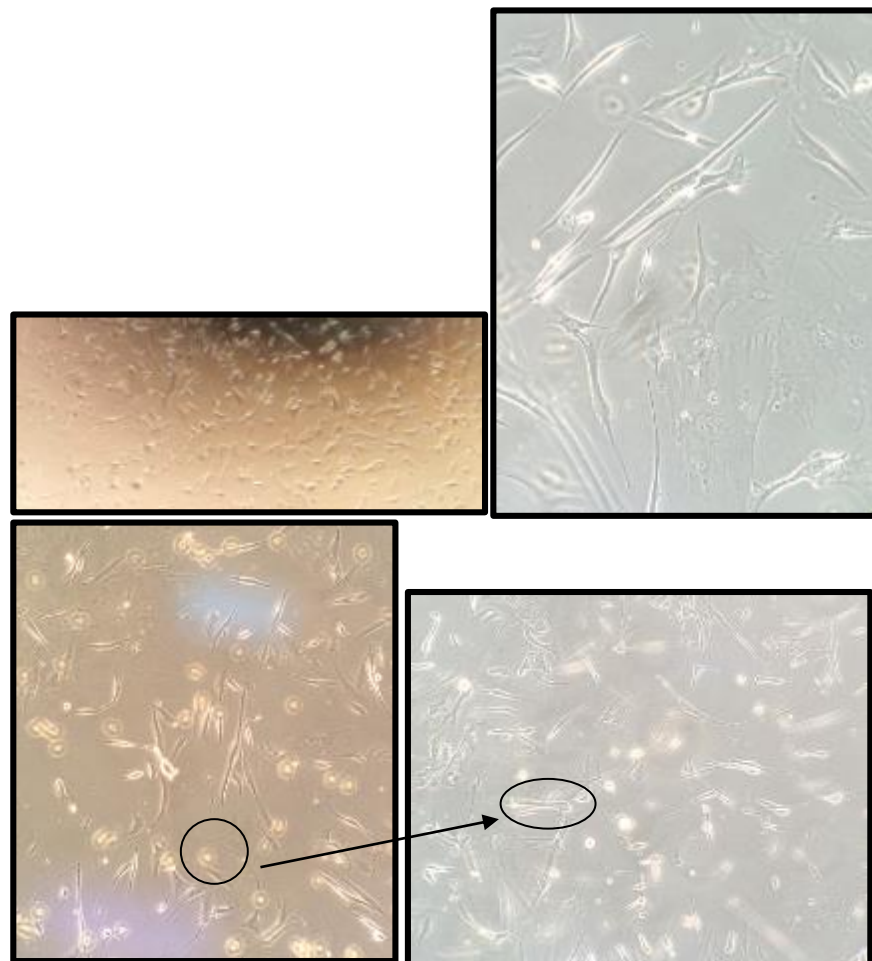
- Dia 13: vam decidir canviar-les de pot a un de més petit perquè es fessin més confluents amb menys temps i així poder fer la diferenciació abans. Vam fer fotos després d'això, de manera que veiem les cèl·lules rodones en contres d'allargades perquè encara no s'han enganxat. En la segona imatge es veuen com ous ferrats, això és perquè la vaig fer bastant més tard que la primera i les cèl·lules ja s'havien començat a enganxar.



- Dia 19: podem veure en la imatge que ara hi ha molta més confluència que la que hi havia.

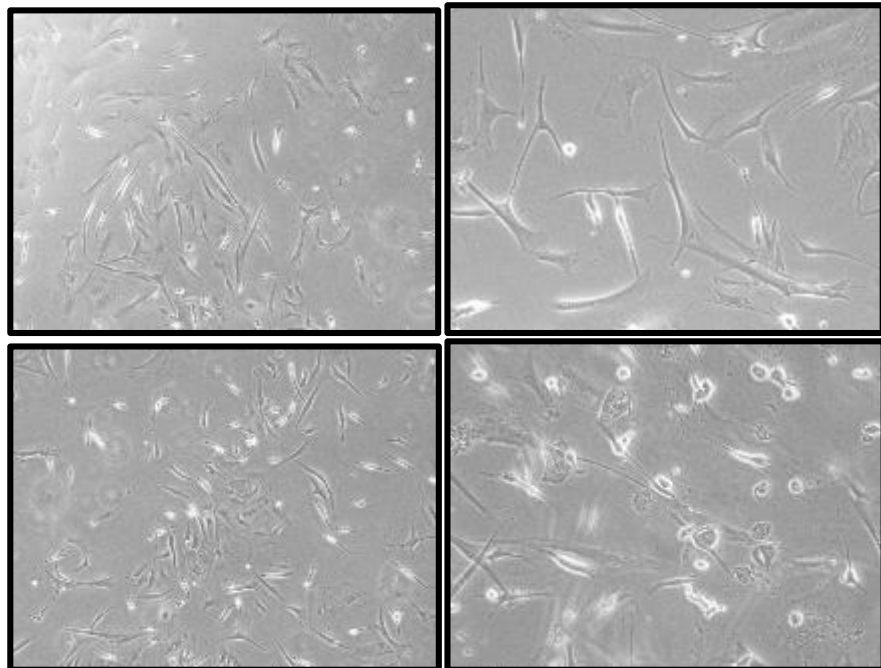


- Dia 20: Va ser el dia que vam canviar el medi cap al de diferenciació, ja que, com podem observar ja estan suficient confluents perquè es diferenciïn. El problema que vaig tenir aquest dia va ser que després de canviar el medi em van caure a terra, i això em va portar problemes per fer la pràctica perquè per culpa d'això es van perdre moltes cèl·lules (es van desenganxar, ho sabem perquè es veuen unes coses rodonetes en un pla diferent de l'enfocat que són cèl·lules flotant desenganxades), per tant es va tornar tot menys confluent i va costar més de veure miotúbuls. Si ens hi fixem, en la segona imatge podem veure que les cèl·lules estaven més allargades i grans.



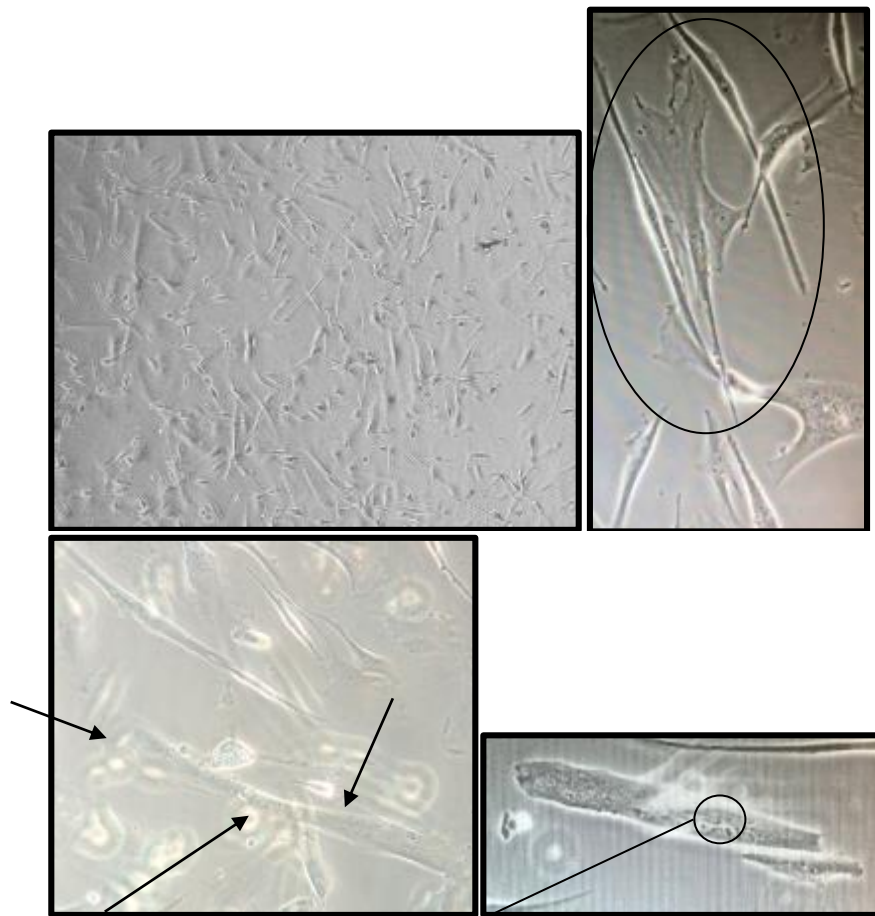
Quan enfoquem les rodonetes de la tercera foto veiem unes figures que es veuen molt deformades, moltes amb el cap rodó, estan senyalades en la última imatge i a darrere queden desenfocades les cèl·lules vives ben enganxades.

- Dia 21: ja portaven un dia amb el medi de diferenciació, i per sorpresa nostra vam veure menys confluència encara, i veiem dos plans de cèl·lules, aleshores ens vam fixar bé en què passava i vam deduir que algunes cèl·lules havien quedat a sota aixafades, per arreglar això vam agafar una punta i vam pressionar una mica els cobres per tal de tornar-los a enganxar al fons. Tot i això les cèl·lules que estaven bé, com podem veure, es començaven a allargar, alinear-se i a tocar-se amb les dels costats per fer miofibrils. En la quarta imatge veiem clarament cèl·lules desenganxades perquè es veuen les rodones.



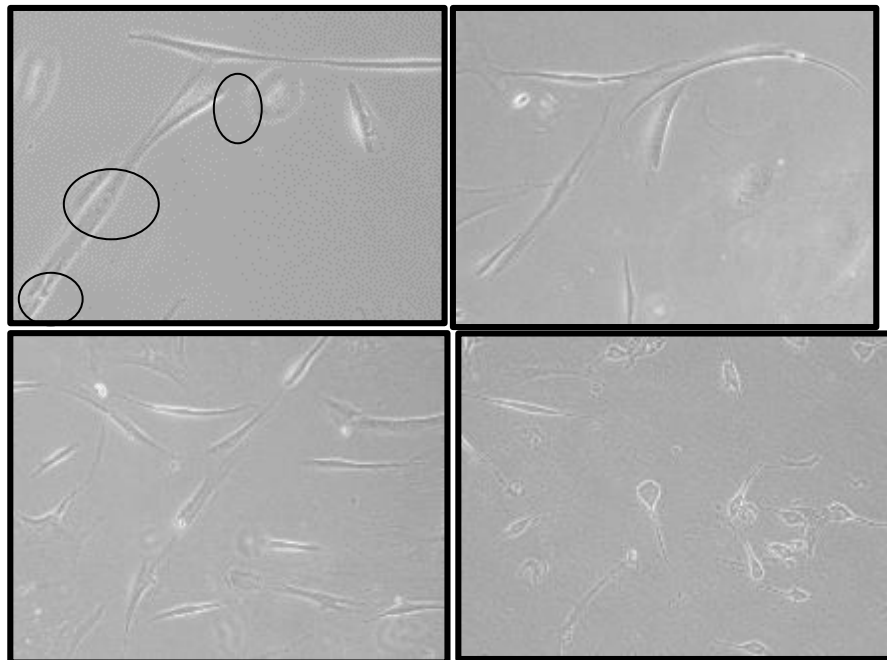
- Dia 22: Podem veure que ha augmentat la confluència des del dia anterior, però com veiem en la primera imatge, moltes d'aquestes cèl·lules estan trencades degut a la caiguda (ho sabem perquè tenen com el cap rodó). Tot en general estava força igual al dia

anterior, però per sorpresa nostra vam veure els primers dos miotúbuls en el medi, els quals corresponen a la tercera (el miotúbul queda una mica tapat per les cèl·lules que es troben a un altre pla, per això està senyalat) i quarta imatge, sabem que són miotúbuls perquè es veu clarament que una sola cèl·lula conté diversos nuclis. En la primera imatge veiem la confluència, en la segona veiem clarament com aquest munt de cèl·lules, encerclades el que faran serà unir-se i formar un gran miotúbul.

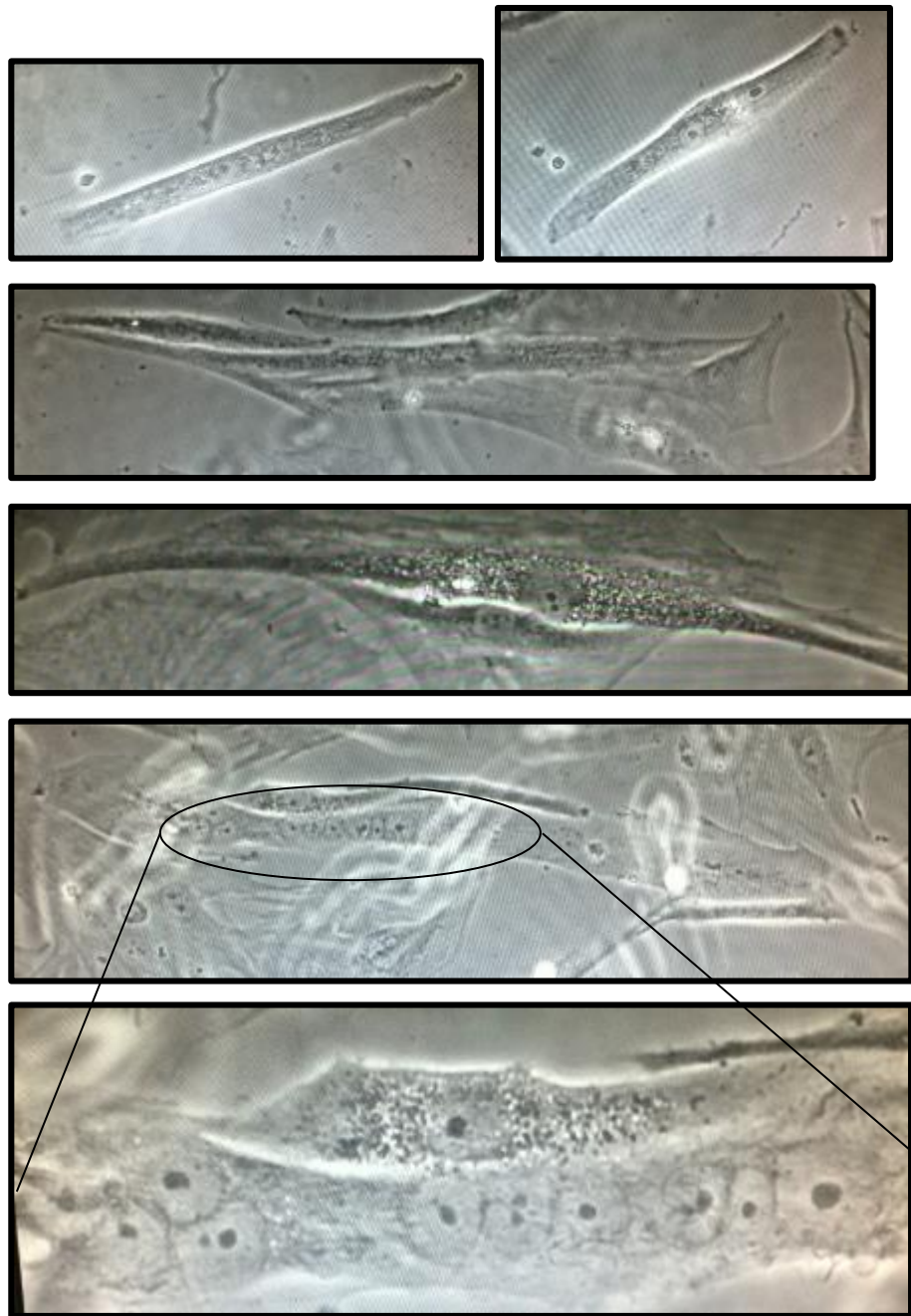


Nucli senyalat, només n'hi ha un de marcat perquè es vegi com és un nucli però si ens hi fixem bé n'hi han varis als dos muotúbuls.

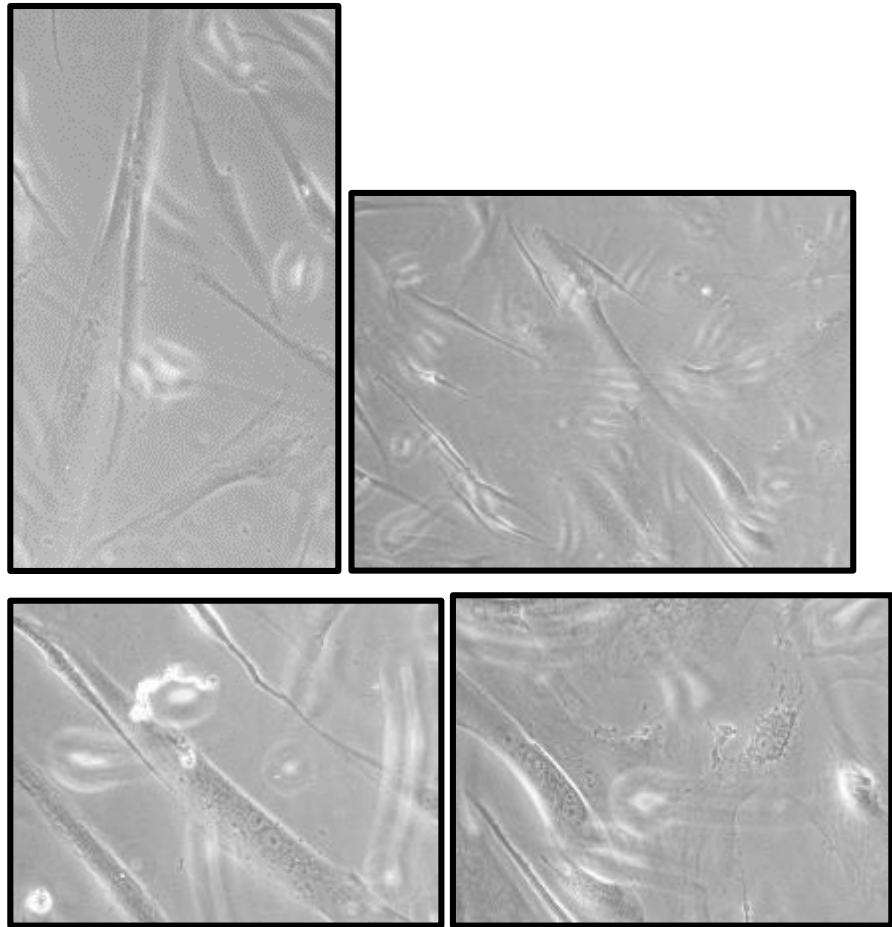
- Dia 25: aquí ja veiem més miotúbuls i a més podem veure com s'estan enganxant a noves cèl·lules. En la primera fotografia es veu un miotúbul amb múltiples nuclis unint-se amb una altra cèl·lula, com que es veu una mica borrosa els nuclis es troben marcats amb un cercle. En la segona i tercera imatge podem veure com diverses cèl·lules s'estan unint per arribar a formar miotubuls. I per últim veiem les cèl·lules partides deteriorant-se, es veuen més fosques, més seques, com si s'estiguéssin pansint.



- Dia 26: ara ja teníem les cèl·lules en un estadi de diferenciació força avançat, com podem observar en les imatges: miotúbuls ja formats, altres unint-se per formar cèl·lules gegants, fibroblasts unint-se amb mioblasts (3^a fotografia), cèl·lules que al ser massa velles formen un granulat que indica que entren en apoptosi (4^a fotografia). Fins i tot vam tenir la sort de trobar el miotúbul del dia anterior (el del dia 22 a la tercera fotografia) molt més ben definit, està a les dues últimes fotografies.



- Dia 27: aquí ja vam poder observar molts miotúbuls, cosa que volia dir que ja estaven a punt per fer la immunocitoquímica. En les imatges es veuen diferents miotúbuls i en les dues ultimes veiem múltiples nuclis.

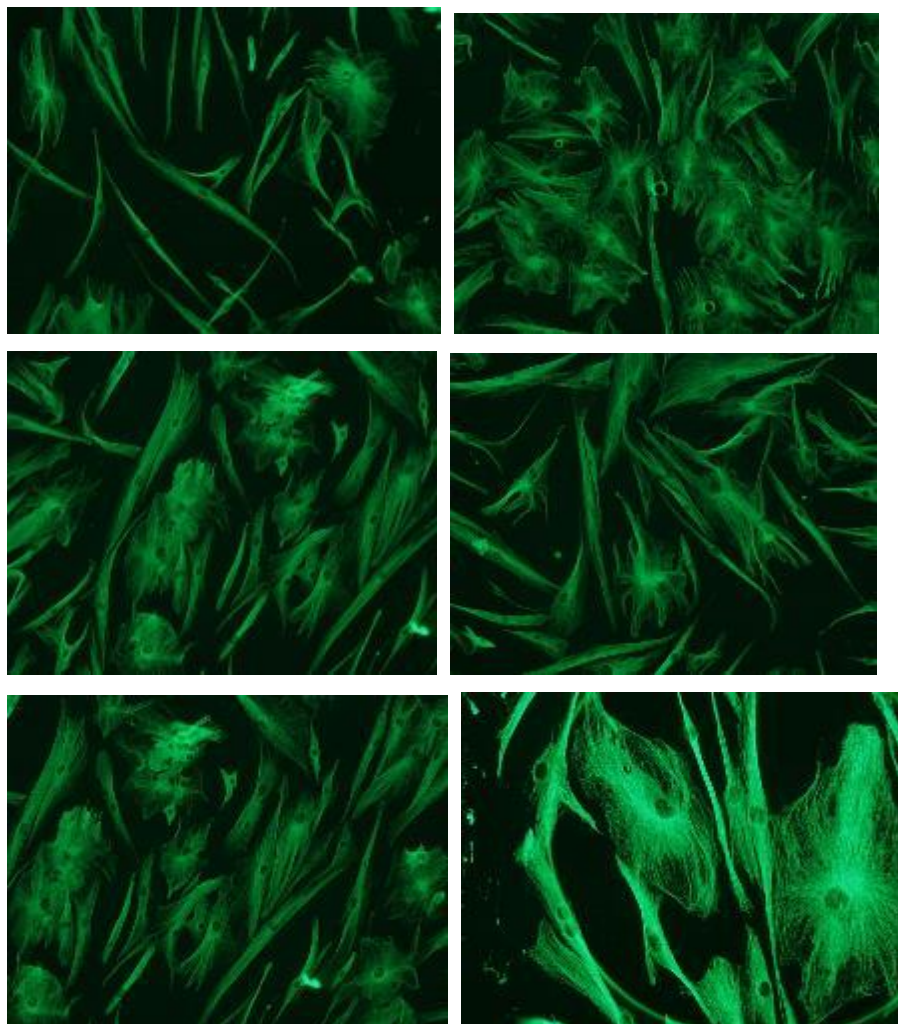


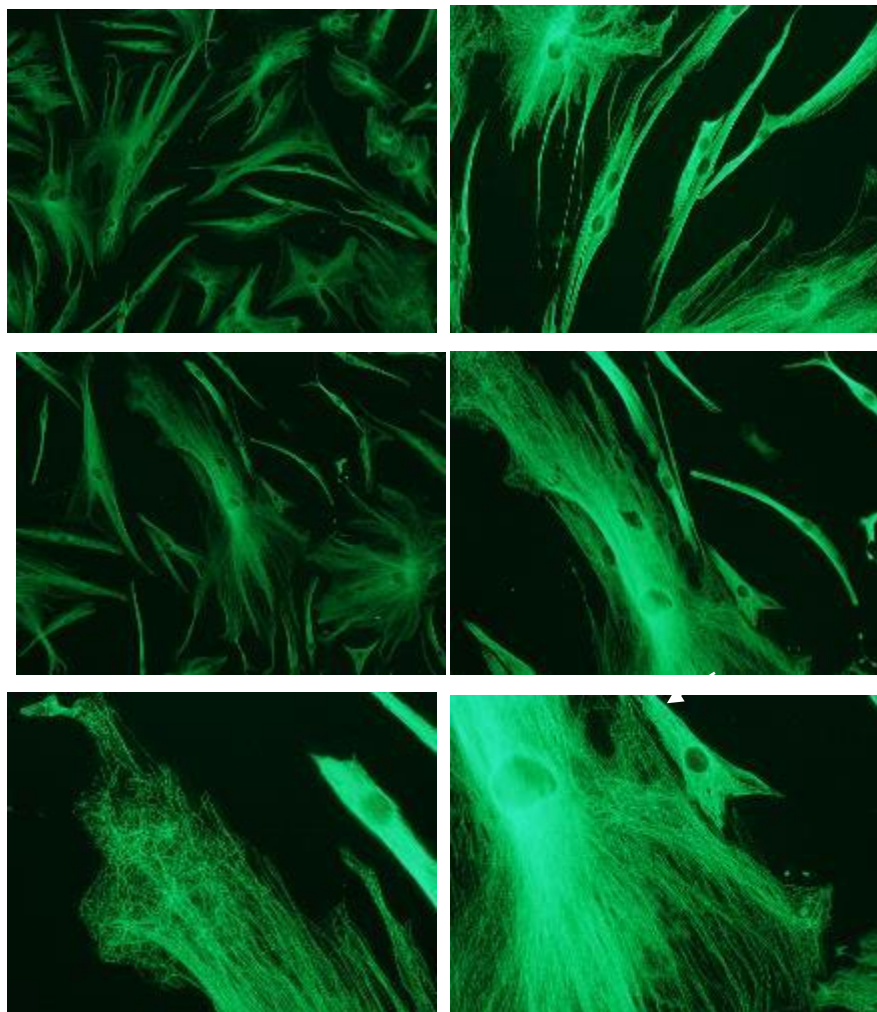
He aconseguit assolir l'objectiu plantejat al principi, ja que he arribat a veure pas per pas com es diferencien els mioblasts, tot i haver tingut alguns problemes com la caiguda de les cèl·lules la hipòtesi plantejada s'ha complert, i he pogut observar uns miofibrils gegants amb els seus múltiples nuclis. He pogut veure en directe tota la teoria que he après sobre les cèl·lules satèl·lit, observant que són unes cèl·lules diferents i especials, ja que són les úniques que de diferents cèl·lules en creen una de gran i multinucleada. Ara em resulta més fàcil pensar com s'activen aquestes cèl·lules al cos en el moment que hi ha una lesió i col·laboren per reparar el teixit, podent-me imaginar com és el procés de regeneració muscular a la vida real, ja que arribant a

veure miotúbuls costa poc d'imaginar que els mioblasts després arriben a ser miofibretes, després fibres i al final arriben a formar el múscul.

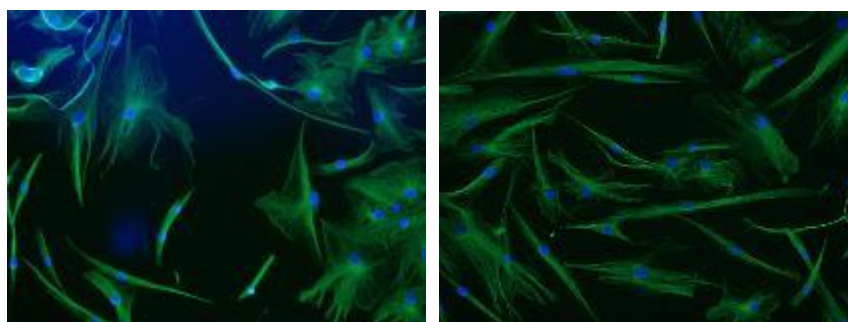
Imunocitoquímica

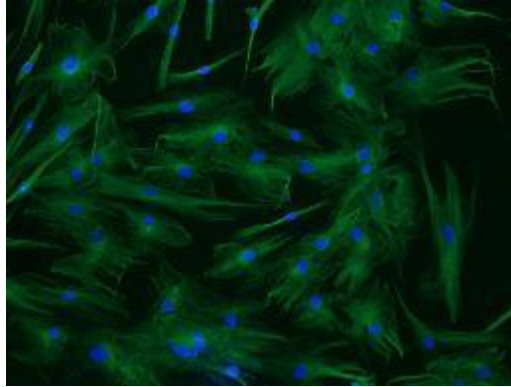
En aquest apartat posarem les fotografies dels resultats observats amb el microscopi especial amb rajos per poder veure la fluorescència. Així és com queden les imatges de les cèl·lules amb la tubulina marcada:



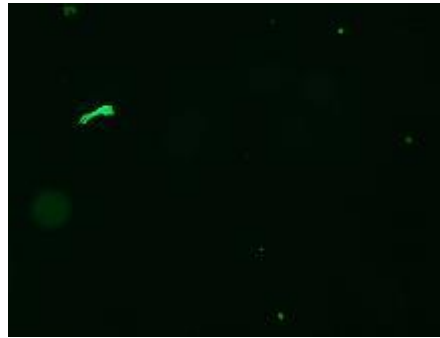


Marcant els nuclis de blau veiem això:





En la següent imatge veiem el control negatiu, en el qual només hi observem uns puntets verds, però no queda pràcticament res marcat comparat amb el cobre positiu.



Fent la immunocitoquímica he pogut veure com funciona la teoria dels anticossos enganxant-se a les proteïnes específiques, de manera que realitzant tota la pràctica he pogut acabar de comprendre com funciona el sistema d'anticòs-antigen. He assolit l'objectiu d'observar el citoesquelet marcant la tubulina, ja que ha quedat marcada molt precisament i es veu cada petit filament marcat, el podem veure que va per tota la cèl·lula per tal de poder regular tots els moviments que aquesta ha de fer. En aquesta segona part de la pràctica no vam tenir cap mena de problema, per això va quedar ben marcada la tubulina, perquè seguint els passos de la pràctica tal i com es donen s'obté el resultat esperat. No només el cobre on hi havia cèl·lules va sortir correctament, sinó que el control on no hi havia anticòs primari però si

secundari va ser negatiu tal com havia de ser, gràcies a aquest control sabem que el que es va marcar en el cobre on sí que hi havia el primari és el correcte, això em permet veure la importància que té realitzar un control cada cop que fas una pràctica, de manera que et permet corroborar d'alguna manera o altra el teu resultat, si el control no surt com s'espera la pràctica s'ha de repetir perquè vol dir que alguna cosa ha anat malament per tant aquella pràctica no és fiable.

6.3. Visita a la sala blanca

Amb la unitat de malalties neurodegeneratives vam poder visitar la futura sala blanca. Aquesta serveix perquè després d'haver provat una possible droga primer amb cèl·lules in vitro, després amb diferents animals, aquestes es posen a prova amb humans voluntaris, la qual s'ha de fer amb unes mesures extremament estrictes d'higiene, per això s'ha de realitzar a una sala blanca. La sala blanca està destinada únicament i exclusivament a aquest objectiu, té un munt de mesures de seguretat: en primer lloc només hi poden entrar persones especialitzades en això, en entrar aquestes persones només entrar primer de tot en una mena de rebedor s'han de treure tota la roba que porten i posar-se un vestit semblant al d'astronauta, que tapa qualsevol forat que hi pot haver, per assegurar-se ells mateixos que no tenen forat hi ha un mirall en un passadís sortint del rebedor (Fig. 31), tancant la porta que separa aquests dos espais per seguretat. En aquest lloc hi ha una pressió que va de dins de la sala cap a fora de manera que és impossible entrar brutícia, en cas que marxés la llum hi ha un generador d'emergència perquè no es pari el funcionament de la pressió, en el cas que s'aturés tot el que hi ha a dins s'hauria de llençar directament, considerant-ho contaminat. Els aparells els fan el màxim de fins i enganxats a la paret de manera que no ocupin volum i així no acumulen pols, ja que pot ser un perill aquesta (Fig. 32). Aleshores per

passar les substàncies amb les quals treballen d'una sala a una altra utilitzen una mena d'armariet que té dues portes, una per cada sala, de manera que s'obre una porta es posa el que s'ha de passar, es tanca la porta i des de l'altre cantó s'agafa (Fig. 33). Òbviament tot es treballa sota una campana, és a dir amb medi estèril. Normalment no s'hi pot entrar, però en aquest cas s'havia acabat de construir i per això encara no estava en funcionament, per això vaig tenir la possibilitat d'entrar-hi, ja que un cop posada en funcionament ningú hi pot entrar.



Fig. 31: encercla't hi veiem el mirall



Fig: 32: pantalla enganxada de control junt amb els marcadors de factors de la sala que s'han de mantenir estables.



Fig. 33: els armariets estan encerclats, i a la dreta una campana on es treballa.

6.4. Entrevista amb Àngel Raya

L'Àngel Raya és el Director del Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona CMR [B], investigador principal a l'IBEC en el grup "control de potència de cèl·lules mare" i professor d'Investigació ICREA. Tot això després d'haver fet una carrera de medicina amb un doctorat de Fisiologia, formació postdoctoral a l'institut d'Investigacions Citològiques i haver estat durant molts anys investigant als Estats Units al "Gene Expression Laboratory" del "Salk Institute for Biological Studies" a la Jolla, California.

- Quins creus que són els avantatges de les cèl·lules mare sobre cèl·lules normals?

Una cosa que només pots fer trasplantant cèl·lules mare, no hi ha cap altra estratègia que t'ho pugui fer, és aconseguir que el trasplant et duri tota la teva vida. Tenen la capacitat de dividir-se de forma indefinida, per tant poden durar tota la vida de la persona, fins i tot més, són les úniques que tenen la capacitat d'excedir en el temps. Si tu trasplantes altres cèl·lules que no són mare duren un temps però com que no tenen la capacitat de proliferar indefinida, s'esgoten.

- Quines són les diferències més significatives entre cèl·lules mare adultes i embrionàries?

Les cèl·lules mare adultes i les embrionàries no tenen res a veure les unes amb les altres. Primer, les cèl·lules mare embrionàries o pluripotents, en general no existeixen, és una cosa que nosaltres creem al laboratori, però en la naturalesa no existeixen. En canvi les cèl·lules mare adultes sí que existeixen, moltes no sabem exactament com existeixen ni on estan, entre altres misteris. Sabem que estan allà perquè la funció la fan, ja que observem que els teixits contínuament es renoven. Tot i que tampoc sabem aïllar-les, ni créixer-les fora del cos, a diferència de les embrionàries que en crear-les al laboratori les sabem cultivar, créixer, les tenim 100% homogènies. Fins i tot les cèl·lules de la sang, que són les que fa més temps que es coneixen, encara es poden expandir fora del cos, han d'estar allà on estan, en el seu "niche", que es veu que és una arquitectura tan complicada que encara no hem sigut capaços de reproduir això fora del cos. Amb la qual cosa, nosaltres podem transplantar, per exemple, la medul·la, però no pot expandir-la, no en podem generar per moltes persones. Això és una gran diferència tenint en compte la manera de manejar-les. Però la diferència més gran és la potència que tenen: és la

funció, la potència, és a dir el tipus de cèl·lules que podem generar. Les embrionàries o ips es poden diferenciar cap a qualssevol tipus de cèl·lula, qualssevol de les tres fulles embrionàries, en canvi les adultes només es poden diferenciar en les del teixit que formen.

- Hi ha alguna diferència amb les ips i les embrionàries?

Home, són diferents tenint en compte que una el que fas és que una cèl·lula que és pluripotent en un embrió, la fas ser cèl·lula mare en el laboratori. En tant al tipus de cèl·lula que produeixen, com creixen, etc., resulten idèntiques. Ja et dic, una ja era pluripotent i l'altra la crees tu, aleshores si vas a mirar molt al detall segur que alguna diferència trobes.

- Amb ips es poden fer cèl·lules mare totipotents?

En principi no amb tecnologia ips, ja que està feta per fer cèl·lules mare pluripotents, però utilitzant aquesta mateixa tecnologia de reprogramació en pots fer.

- Però fer cèl·lules mare totipotents tindria alguna utilitat?

No, ja que continuament es generarien tumors.

- Si injectem cèl·lules mare embrionàries directament a una persona, es generarà un tumor?

Exacte, si no fessis res i les posessis indiferenciades li generaries un tumor a la persona. Però mai s'han aplicat directament a una persona sense haver-les diferenciat abans, ja que deixen de ser cèl·lules mare i ja no tenen capacitat de proliferació indefinida.

- Com es podria ralentitzar el creixement de les cèl·lules mare perquè no es generin tumors es pot fer?

Això es fa de manera natural quan les diferències, perquè perd la capacitat de proliferar, i quan acaba la diferenciació deixa totalment de proliferar. Per això al laboratori per evitar tumors ens assegurem que totes les cèl·lules que tenim s'hagin diferenciat.

- Quan apliques les cèl·lules però hi ha un problema genètic, ja s'ha fet teràpia gènica amb cèl·lules i després aplicar-les?

Com a estratègia de laboratori, sí. S'ha fet en dos tipus d'aplicació. Una altra que ara s'està tornant a fer en assajos clínics, és fer teràpia gènica de cèl·lules mare de la sang. Això ja s'ha fet amb nens, agafant les cèl·lules de la medul·la òssia, es posa un virus de teràpia gènica, es transducen fora del cos, i després ja s'apliquen al nen, i això funciona en fase experimental. Fent seguiment a llarg plaç funciona seguint aquesta estratègia.

- Si el problema de cor, per exemple, és un problema genètic, es podrien aplicar les cèl·lules mare periòdicament?

Sí, es podria fer però al cor no seria el lloc més indicat per fer aquesta pràctica, ja que la majoria de problemes del cor no són un problema genètic. En malalties com diabetis tipus 1, en la que necessites punxar-te insulina. En aquestes el que et passa és que un tipus de cèl·lules del pàncrees es moren perquè el teu propi sistema immunitari les elimina, no sabem per què, però sí que sabem que aquestes tenen alguna cosa que les fa més susceptibles a què les ataquí el teu sistema, però el sistema immunitari d'aquesta persona tampoc està del tot bé, és una combinació de les dues coses. Sí que sabem que si a aquesta persona li poses les seves pròpies cèl·lules, generades al laboratori, etc., el seu propi sistema immunitari les matarà. Aleshores penses: bé, igual val la pena injectar-les

cada 5 anys, en contres de punxar-se insulina cada dia. Això s'hauria de valorar. Aquest tipus d'aplicacions sí que es podrien plantejar, una altra cosa és que les cèl·lules que apliques s'hagin d'incorporar a l'òrgan i formar part d'aquest, aleshores no et pots estar plantejant cada 1 any posar-li cèl·lules que s'hauran d'enganxar perquè aquest procés costa un esforç, especialment al sistema nerviós, ja que haurà de tornar a formar totes les connexions. Depenent de l'aplicació, en el cas que sigui un problema genètic i el que vols és que duri és millor treure el problema genètic, generar una cèl·lula sana i posar-li. Però si no saps on està el problema genètic, òbviament no el pots curar. Actualment totes aquestes coses s'estan explorant per tot.

- No acabo d'entendre una cosa, les ips perquè funcionin realment la cèl·lula que convertiràs, l'has d'agafar d'una persona jove o d'un embrió, no?

De qualsevol.

- Però aleshores no passaria com la dolly?

Això no està tan clar, aquesta hipòtesi que l'edat se sumés no està gens clara. A més després s'ha realitzat més endavant amb més detall en ratolins i ha funcionat, realment es van allargar els telòmers.

Nosaltres al laboratori agafem la cèl·lula somàtica de l'adult i quan la reprogramem es torna jove, els telòmers s'allarguen moltíssim, més inclús que un telòmer natural.

- Això perquè passa?

Passa perquè a cèl·lula se sent en el mateix niche que quan era cèl·lula embrionària, en el qual hi ha més expressió de telomerasses, per això s'allarguen tant. Però la diferencia de generar ips d'un nen amb les d'un

adult, no està en l'eficàcia, però clar el nen ha viscut molt menys, per tant la probabilitat que hagi fet mutacions és menor. Però no per la reprogramació en si, sinó perquè la cèl·lula de què parteixes està una mica més tocada.

El que sí que passa és que els clons que naixen són una mica diferents, són més grans, les placentes també tenen alguns problemes.

- És legal clonar?

Animals? Sí. Persones està clar que no.

- Vosaltres obteniu mai les cèl·lules d'un embrió?

Sí, de preembrions, és a dir que és d'abans que les obtinguin.

- Aquest embrió es fa malbé?

Sí, però és que aquests embrions s'haguessin hagut de llençar. Normalment a Espanya el que es fa és congelar els embrions que sobren d'un procés de fertilització in vitro, un cop la parella no vol tenir més fills aquells embrions o es destrueixen o es donen a la investigació, que serien els que nosaltres utilitzem.

- En l'àmbit científic hi ha algun moment que estigui determinat quan un embrió es considera persona?

Aquesta és una pregunta que no té resposta, jo et puc explicar quan un embrió comença a integrar informació perquè el sistema nerviós comença a funcionar. Però també et puc dir que és qual li comença a batre el cor, quan comença a sentir dolor. Jo diria que la legislació espanyola diu que la línia està quan apareix el cervell, això almenys quan estava el PSOE al govern. Ara tampoc sé cap a on anirà això.

- Moralment, tu consideres que està bé manipular un embrió?

Bé, quan agafes cèl·lules tu el que estàs fent és destrossar-lo. Clar els embrions que nosaltres utilitzem s'haguessin tirat, per tant és una cosa que no me la plantejo.

- El tema de congelar el cordó umbilical, realment es fa i funciona?

Sí, i a més és una gran font de progenitors. Es faria servir com a alternativa al trasplant de medul·la. Tot i que aquest tema ha portat molta polèmica aquí a Espanya perquè el príncep va enviar a congelar el cordó de la seva primera filla a Estats Units, per guardar-se'l per ella. Perquè aquí a quan es congela el cordó es dona per qui el necessiti, és a dir, no te'l pots guardar per tu.

- Clínicament quines aplicacions de cèl·lules mare hi ha, en general?

Actualment podríem dir que són el trasplant de medul·la òssia, pot ser del corrent sanguini normal, sang perifèrica, del cordó umbilical... també hi ha el trasplant de pell ingenieritzada en el cas que pateixis una gran cremada, per exemple, i el teu autotrasplant no és suficient, és a dir que no et pots treure prou pell de tu mateix per a cobrir-te la ferida, et poden agafar pell sana teva, créixer-la al laboratori, fins que es crea prou pell per cobrir-te. Aquesta no serà perfecta, no té pèl, no té glàndules sudorípares, però és pell, i és teva. També trasplant de còrnia, en el cas que aquesta s'opacifiqui pot ser que sigui per una malaltia o simplement que et caigui àcid a la cara per accident hi ha unes cèl·lules mare que es troben al limbo, entre la còrnia i l'esquera, es pot agafar una petita biòpsia d'allà, de l'ull sa, créixer còrnia in vitro i trasplantar-te-la. Quan tens una articulació feta malbé, també es pot fer un trasplantament, en aquest cas no són ven bé cèl·lules mare, sinó que són progenitors. S'agafa un tros del cartílag sa, fer-lo créixer i posar-te'l. Aquestes són les quatre aplicacions reals consolidades

que existeixen de teràpia cel·lular, la resta està tot a assaig clínic, en fase experimental.

- Quina de les investigacions del teu grup creus que es podrà aplicar més aviat?

Jo crec que en cor, o sigui de cèl·lules pluripotents, és a dir embrionàries o iPS's, generar cardiomiòcits per la insuficiència cardíaca.

- Amb quins problemes us trobeu més sovint?

El primer que tenim és el dels tumors, que ja està solucionat. Són molt potents, podem generar el tipus de cèl·lula que vulguem, però el problema és que no sabem exactament com. Aleshores el que es vol és dominar això i que la cèl·lula que tu generis sigui funcional.

- Perquè no sabeu com diferenciar-la cap a on voleu?

Sabem com passa això a l'embrió, però en el moment de reproduir-ho en una placa no resulta tan fàcil. Sí que s'aconsegueixen cèl·lules semblants a les que haurien de ser, però algunes són més semblants que altres. I això s'ha de fer amb una forma compatible amb posar-ho a una persona, perquè de vegades les manipulem tant genèticament que no les podem posar a la persona. O sigui, fer tot això de forma segura i a més poder-la introduir a una persona és complicat. Però en el moment que ho arreglem el potencial que tenen en gegant.

- Sobre les teves investigacions quina creus que ha tingut o tindrà més transcendència?

Buf... en tot cas et puc dir les que han tingut més importància: la tècnica d'agafar cèl·lules mare d'un pacient amb una malaltia genètica, corregir-la per teràpia gènica, d'aquesta cèl·lula mare després diferenciar cèl·lules que ja estan corregides i reinjectar-les, vam ser els primers a fer-ho.

Després més bàsic és que hem trobat animals que són capaços de regenerar el cor, com algun tipus de salamandres, peixos... el que fem és observar com ho fan. Això ens ha fet canviar la forma de veure la regeneració del cor.

- Has sentit a parlar de les STAP? Què en penses?

Sí, és difícil perquè hi havia molt secretisme. Quan va sortir la notícia vaig pensar que si era veritat, era un gran avantatge.

- Però des del principi vas pensar que era possible?

Doncs la veritat és que sí perquè hi ha autors en aquell treball que són científics molt seriosos i reconeguts en el camp. El que vaig pensar és que si allò era veritat, havíem de repensar tot el que pensàvem sobre el control d'expressió de gens, tot i que amb la informació que tenim actualment de la regulació de l'expressió de gens no era capaç d'entendre com ho havien fet, el fet que l'àcid afectés la metilació. Ara mateix segueixo sense tenir clar si és veritat o no, està retractat, però encara no ho han dit.

- Tu ho haguessis provat?

Sí, perquè sembla tan senzill... el que passa és que aquests experiments tan senzills a l'hora de la veritat molts resulten que han estat per casualitat, a causa d'altres factors que han influït a l'experiment i que no s'han tingut en compte, de manera que hi ha un clima amb unes condicions molt peculiars que només estan allà, després quan altres científics ho proven, no els hi surt. Per això mateix el primer treball de les ips no se'l van creure perquè era molt senzill, durant un any no ho van provar, fins que ho van anar provant i va sortir a molts laboratoris. El que no sé, jo és a on arribaran les STAP, si són possibles resulten ser una tècnica que portarà molts avantatges.

- Com a investigador quin és el teu màxim objectiu?

Arribar a una conclusió amb les investigacions que estem fent ara, arribar a curar a la gent.

- Per algun motiu en concret treballes amb el cor?

M'agrada, perquè és un òrgan molt xulo, la majoria de gent es mor per això. També des del punt de vista de desenvolupament és molt bonic, molt xulo. Tampoc és tan complex com, per exemple un cervell. Té un grau de complexitat per una part, però penso que el podem assolir.

- Què és el que més t'agrada d'investigar?

Bona pregunta. Penso que laboralment et dona les teves satisfaccions de tant en tant. També té, per suposat, una rutina en què molts cops les coses no surten. Però quan les coses surten compensa i enganxa. Perquè bàsicament et paguen per satisfer la teva curiositat. Si ets una persona curiosa és una feina molt xula, en la qual pots satisfer-la. Si ets una persona que es planteja molts dubtes i busques respostes, aleshores és una professió molt agraïda. Si ets una persona que prefereix una vida ordenada, uns horaris, aleshores no és el seu tipus de professió.

- Sempre has sabut que volies investigar?

No, jo vaig començar fent medicina i durant la carrera em va començar a enganxar això de la investigació. El despertar de la vocació en mi va arribar molt tard.

- Què és el que menys t'agrada de la professió?

En la situació local, és a dir, a Espanya hi ha moltes coses a millorar. En la ciència en general, també en el sistema de donar crèdit, és un sistema en el qual contínuament ets avaluat per altres científics, hi ha molt tràfic

d'influències, moltes modes, això es podria millorar. A nivell nacional, és molt millorable començant per quant es finança per la investigació, com es reparteix i com es gestiona.

- A on vas començar a investigar?

A la facultat de medicina, a València, en el departament de fisiologia. És curiós, en la meua promoció de la carrera 4 persones es van dedicar a la investigació, cosa que no és normal a la carrera de medicina. A més els 4 vam començar al mateix departament amb la mateixa persona. Aleshores allà ens vam enganxar i cadascú va seguir per la seva línia.

7. Conclusions

Aquest treball m'ha permès conèixer més a fons el món de les cèl·lules mare, no tan sols des d'un punt de vista teòric, sinó que he pogut tractar amb aquestes de primera mà. Crec que he assolit tots els objectius que em vaig plantejar a l'hora de fer aquest treball, els quals eren aprendre molt sobre les cèl·lules mare, sobre la regeneració muscular i descobrir el món de la investigació en primera persona. M'ha servit per acabar de determinar que en un futur el que vull és seguir per la línia de la biologia, per desembocar al món de la recerca.

Gràcies a la gentilesa del laboratori de l'Hospital de Sant Pau vaig poder definir de seguida en quin camp em volia moure, tot i això em va costar molt concretar el tema, ja que tant les cèl·lules mare com les distròfies musculars són temes amb un gran ventall d'opcions, d'entre les quals vaig haver de triar, aquesta part va ser molt complicada.

El primer cop que em vaig asseure a fer el meu treball, vaig trobar-me que no sabia per on començar, com ordenar el treball, classificar-lo, a quina informació donar més pes que a altra perquè el tema en concret no estava definit. Així que em vaig assentar i vaig començar per la base: la teoria de les cèl·lules mare. Però clar, tu t'asseus, poses al Google cèl·lules mare i et surten un munt de pàgines web, amb diferents idiomes, classificacions, explicacions, etc. Et quedes com una mica col·lapsada perquè veus que no només has de llegir tota la informació, sinó que l'has de comprendre i classificar d'una manera que tu ho entenguis... clar això els primers dies que et poses a fer el treball de recerca no saps per on agafar-ho, et sembla que totes aquelles paraules estranyes mai les entendràs. Però de mica en mica vas fent, vas entenent, contrastant, classificant, definint i les coses van sortint.

Però aleshores em vaig trobar que no sabia ni com seguir, ni com estructurar el treball, si donar més pes a les distròfies musculars o a l'aplicació de cèl·lules

mare, d'entre milions d'altres opcions que em passaven pel cap en aquell moment. En estar al laboratori entre experts que em podien aconsellar, vaig poder definir l'estructura un cop vaig saber què faria de part pràctica allà: créixer, diferenciar i fer una immunocitoquímica a mioblasts, a part d'observar el seu dia a dia, podent veure altres coses com el diagnòstic de distròfies, la sala blanca... Això em va fer pensar que volia donar pes a la regeneració muscular, ja que les cèl·lules que vaig fer servir són les principals que regeneren el múscul. Aquí ja vaig tenir el tema estructurat i ordenat després d'haver-m'hi trencat el cap.

Al laboratori em va fer molta gràcia perquè allà parlen de coses que nosaltres hem treballat a classe, però ho tenen a mà, o sigui tenien per exemple, ADN dins d'un eppendorf. Clar a mi em va sorprendre perquè jo l'ADN el veia com una cosa teòrica, però ells ho tenen amb un líquid i tu t'has de "creure" que allà hi ha ADN o anticossos. També em va impactar la facilitat amb què ells treballen, tenen en compte tots factors que podrien fer variar els resultats de manera quasi incoscient. Clar quan jo vaig tocar per primer cop objectes de laboratori havia de pensar mil coses a la vegada, que quan veus ells fer-ho dius: ah no és tan difícil! Fins que t'ho donen i et diuen vigila amb això, això altre i allò de més enllà. Per exemple em vaig trobar que quan jo tenia les meves cèl·lules un dia estava agafant la placa vigilant que el líquid no toqués a les parets perquè la tapa no es mullés, però també que no s'obrís perquè sinó entraria brutícia, ja que les estava anant a deixar a la incubadora i no era un medi estèril. Bé doncs em van caure a terra, no sé com, però de cop jo tenia la tapa als dits i les cèl·lules a terra. Per sort van caure planes i l'únic que vam haver de fer va ser canviar el medi. Algunes es van morir, tal com s'explica a la part pràctica, però moltes altres van sobreviure.

En relació a la teoria, he assolit tots els objectius plantejats, ja que he après un munt sobre el tema de les cèl·lules mare, especialment de les musculars i també he après bastant sobre com funciona la regeneració muscular, que és un procés fascinant i estrany a la vegada. Quan vaig fer la pràctica vaig anar veient més de primera mà com realment els mioblasts poden regenerar el múscul, és a dir com

de múltiples cèl·lules se'n forma una de sola, és increïble com els mioblasts es “busquen” els uns als altres per unir-se. Vaig poder contrastar molta de la teoria en el moment de fer la pràctica, cosa que em va fer pensar en com es podrien solucionar realment les distròfies, unes malalties que també he descobert fent aquest treball i que són molt poc conegudes però molt interessants. Gràcies a la part pràctica he anat lligant els conceptes teòrics, amb com són a la realitat. Per exemple, jo havia vist les propietats de les cèl·lules mare i en els mioblasts les he pogut observar i comprovar. Igual que el procés de la regeneració muscular o el citoesquelet del mioblast, del qual no he fet a la teoria en aquest treball, però que durant el primer de batxillerat l'he estudiat i em va impactar molt veure que el citoesquelet quedava marcadíssim per anticossos que nosaltres no podem ni tan sols veure a ull nuu. Aquest treball m'ha ajudat a entendre millor com funcionen les cèl·lules i poder-me imaginar processos que duen a terme aquestes.

En resum, he pogut aprendre un món de coses noves que no sabia, i com més he anat aprenent més m'he adonat del complex que arriben a ser les cèl·lules, i tots els mecanismes d'aquestes. He gaudit una barbaritat fent-lo, ha sigut una experiència molt enriquidora, útil i plena de motivació.

8. Bibliografia i webgrafia

Aquí hi ha la majoria de pàgines web en les que m'he documentat.

- http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell
- http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lula_madre
- <http://www.slideshare.net/vpavon/cel·lules-mare-8116224>
- http://www.medicalnewstoday.com/info/stem_cell/
- <http://www.news-medical.net/health/What-are-Stem-Cells.aspx>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Embryonic_stem_cell#Propagation
- http://en.wikipedia.org/wiki/Adult_stem_cell
- <http://www.news-medical.net/health/What-are-Embryonic-Stem-Cells.aspx>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Amniotic_stem_cells
- <http://www.closerlookatstemcells.org/espanol/tipos.html>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Induced_pluripotent_stem_cell
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Reprogramming>
- http://www.tendencias21.net/Reprogramacion-expres-de-celulas-adultas-en-celulas-pluripotentes-inducidas_a28569.html
- <http://www.juntadeandalucia.es/csalud/larcel/content/reprogramacion-celular>
- <http://www.explorestemcells.co.uk/propertiesstemcell.html>
- <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>
- <http://www.ama-assn.org//ama/pub/physician-resources/medical-science/genetics-molecular-medicine/related-policy-topics/stem-cell-research/basics-stem-cell-research.page>
- <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/stem-cell2.htm>
- http://www.newscientist.com/article/dn24970-stem-cell-timeline-the-history-of-a-medical-sensation.html#.U6Fc1I1_tfN
- <http://www.achievement.org/autodoc/page/gea0bio-1>

- <http://stemcell.childrenshospital.org/about-stem-cells/adult-somatic-stem-cells-101/where-do-we-get-adult-stem-cells/>
- http://www.stemcellfoundation.net.au/docs/teachers'-kit/chp3_stem-cell-teachers-kit.pdf?sfvrsn=2
- <http://stemcells.nih.gov/policy/statements/pages/20050712battey.aspx>
- http://www.geth.es/index.php?option=com_content&task=view&id=276&Itemid=200
- <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/stem-cell2.htm>
- <http://madrecelulas.blogspot.co.uk/2010/12/metodos-obtencion-celulas-madre.html>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell_therapy
- <http://www.stemcellsinc.com/science/stem-cell-applications.htm>
- http://ca.wikipedia.org/wiki/Ter%C3%A0pia_amb_c%C3%A8l%C2%B7lules_mare
- <http://www.uic.es/ca/cel-lules-mare-seva-aplicacio-medicina-regenerativa>
- http://www.biocat.cat/docs/fitxes/Tecnic_en_cellules_mare.pdf
- http://www.clubplaneta.com.mx/aplicacion_de_las_celulas_madre.htm
- <http://www.enfermedadesytratamientos.com/celulas-madre-aplicaciones-actuales/>
- <http://secuvita.es/celulas-madre-aplicaciones/>
- <http://www.slideshare.net/iescastulocnnn/clulas-madre-y-sus-aplicaciones-en-medicina>
- <http://www.aplicacionescelulasmadre.com/>
- <http://www.iflscience.com/health-and-medicine/stem-cell-breakthrough-could-be-game-changer-personalized-medicine>
- <http://sangredecordon.com/celulas-madre/aplicaciones-actuales-enfermedades-hematologicas.htm>

- <http://www.eurostemcell.org/factsheet/alzheimers-disease-how-could-stem-cells-help>
- <http://www.diabetesresearch.org/stem-cells>
- <http://faros.hsjdbcn.org/ca/kidshealth/trasplantament-cellules-mare>
- <http://www.nature.com/news/stem-cells-take-root-in-drug-development-1.10713>
- <http://www.cirm.ca.gov/our-progress/stem-cells-accelerating-basic-research>
- http://secundaria.uvic.cat/_treballs/843e190ce1c3bb0973a92ac9abdb6876011c1d88_TREBALL%20DE%20RECERCA_ALBA%20PREMI.pdf
- http://www.fcarreras.org/ca/el-trasplantament-de-medul-la-ossia-sang-periferica-o-sang-de-cordo-umbilical_11988
- <http://www.eurostemcell.org/factsheet/leukaemia-how-can-stem-cells-help>
- <http://www.leukaemia.org.au/treatments/stem-cell-transplants/stem-cell-transplants>
- <http://www.cancercenter.com/leukemia/stem-cell-transplantation/>
- <http://www.mccancer.org/research/stem-cells/leukemia>
- http://www.fcarreras.org/ca/que-es-la-leucemia_1585
- http://www.geosalud.com/celulas_madre/leucemia.html
- <http://adn-dna.blogspot.com.es/2011/07/152-quines-aplicacions-tenen-les.html>
- <http://lascelulasmadre.es/leucemia>
- <http://www.asemcatalunya.com/index.php/distrofies-musculars/>
- http://es.wikipedia.org/wiki/Distrofia_muscular
- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001190.htm>
- http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/distrofia_muscular.htm
- <http://www.webmd.com/children/understanding-muscular-dystrophy-basics>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Muscular_dystrophyhttps://www.duchenne-spain.org/que-es-duchenne/sintomas-de-duchenne/

- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000705.htm>
- http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/distrofia_muscular.htm#4
- http://ca.wikipedia.org/wiki/Distr%C3%B2fia_muscular_de_Duchenne
- http://www.onmeda.es/enfermedades/distrofia_muscular-diagnostico-2799-7.html
- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000706.htm>
- <http://enfermedadbecker.blogspot.com.es/>
- http://es.wikipedia.org/wiki/Distrofia_muscular_de_Becker
- <http://www.med.nyu.edu/content?ChunkIID=103572>
- <http://www.fshsociety.org/assets/html/PatientBrochureSpanish.html>
- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000707.htm>
- http://es.wikipedia.org/wiki/Distrofia_muscular_oculofar%C3%ADngea
- http://en.wikipedia.org/wiki/Myosatellite_cell
- <http://jhc.sagepub.com/content/54/11/1177.full>
- <http://www.eurostemcell.org/commentanalysis/satellite-cells-are-vital-muscle-repair-and-replacement>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757751>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Myocyte>
- <http://ca.wikipedia.org/wiki/Mioblast>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Mesoangioblast>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Pericytes>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015303>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108972>
- <http://www.eurostemcell.org/commentanalysis/mesoangioblasts-can-be-derived-reprogrammed-cells-and-may-be-effective-future-treatm>
- <http://f1000research.com/articles/2-24/v1>
- <http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7119/abs/nature05282.html>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Mesangial_cell

- http://en.wikipedia.org/wiki/Mesenchymal_stem_cell
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Mesenchyme>
- <http://ca.wikipedia.org/wiki/Mes%C3%A8nquima>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Fibroblast>
- <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/histologia/histologiaweb/paginas/mu34728.html>
- <http://www.eurostemcell.org/factsheet/muscular-dystrophy-how-could-stem-cells-help>
- <http://www.cirm.ca.gov/our-progress/awards/stem-cell-therapy-duchenne-muscular-dystrophy>
- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443906001736>
- <http://www.bio.unipd.it/bam/PDF/7-3&4/art9.pdf>
- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443906001736>
- <http://www.jain-foundation.org/what-stem-cell-therapy-and-can-it-be-used-treat-lgmd2b>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108972>
- <http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7119/abs/nature05282.html>
- <http://www.nature.com/cddis/journal/v1/n8/full/cddis201035a.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745439>
- <http://www.eurostemcell.org/commentanalysis/mesoangioblasts-can-be-derived-reprogrammed-cells-and-may-be-effective-future-treatm>
- <http://www.nature.com/ncb/journal/v9/n3/full/ncb1542.html>

Els llibres dels quals he tret l'informació han sigut:

- JULIO PASCUAL GÓMEZ: Tratado de Neurología Clínica, Ars Medica, Barcelona, 2008
- ROBERT BERKOW: Manual Merk de información médica general, Oceano, Barcelona, 2004.

També m'he pogut documentar d'articles que em van passar els investigadors de l'hospital de Sant Pau:

- FRANCESCO SAVERIO TEDESCO, ARIANNA DELLAVALLE, JORDI DIAZ-MANERA, GRAZIELLA MESSINA I GIULIO COSSU: Repairing skeletal muscle: potential of skeletal muscle stem cells, "The Journal of Clinical Investigation", vol. 120, núm. 1, gener 2010.
- HANG YIN, FEODOR PRICE I MICHAEL A. RUDNICKI: Satellite stem cells and the muscle stem cell niche, "American Physiological Society", 2013.
- BÁRBARA FLIX, XAVIER SUÁREZ-CALVET, JORDI DÍAZ MANERA, EVA SANTOS NOGUEIRA, RENZO MANCUSO, JORDI BARQUINERO, MIQUEL NAVAS, XAVIER NAVARRO, ISABEL ILLA, EDUARD GALLARDO: Transplantation in Dysferlin-Deficient Mice Results in a Mild Functional Improvement, vol. 22, núm, 21, 2013.

Finalment, també d'una tesi doctoral:

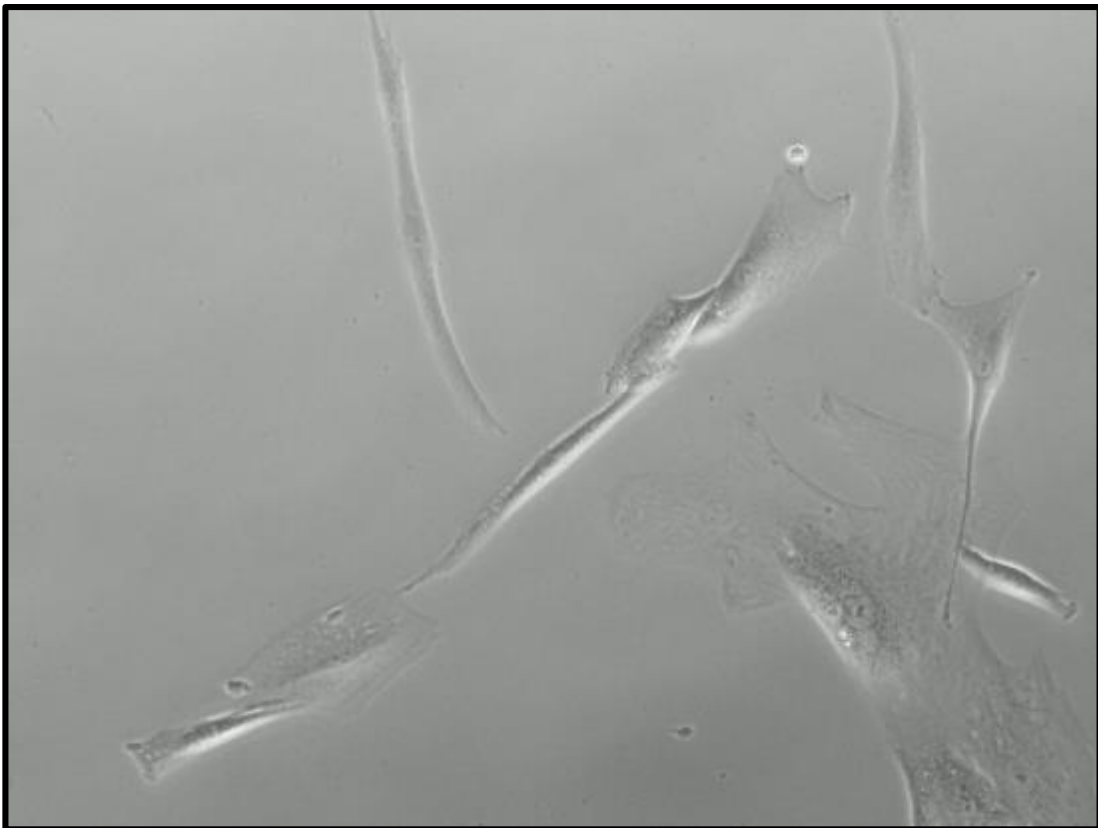
- NOEMÍ DE LUNA SALVÀ: Implicacions diagnòstiques i ontogèniques de l'expressió de disferlina en monòcits i precursors musculars, Barcelona, desembre de 2006.

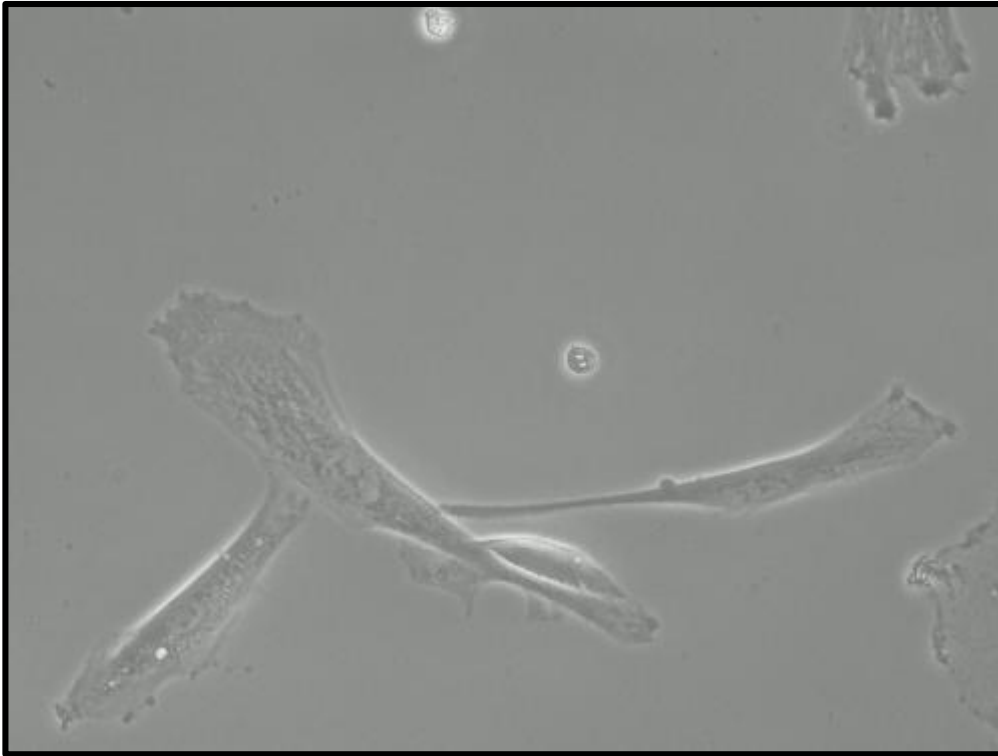
9. Annex

Tal com s'ha explicat a l'apartat 6 adjunto un annex amb les fotografies de les cèl·lules amb gran perquè es puguin observar amb detall.

Diferenciació

- Dia 1:



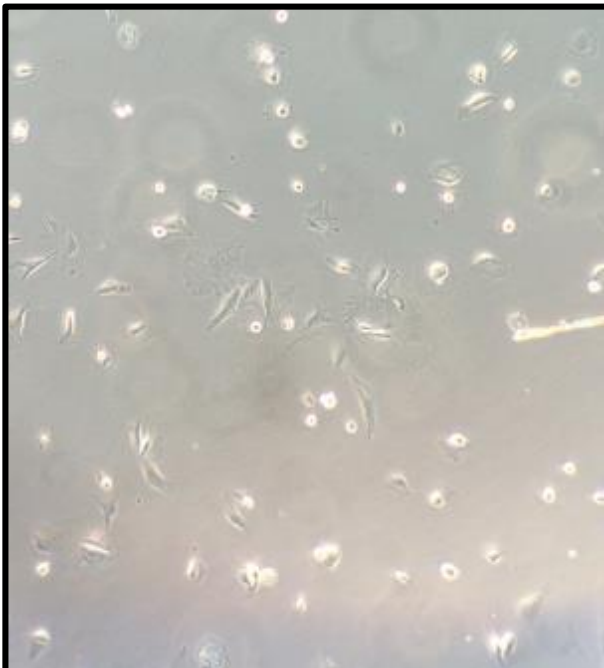


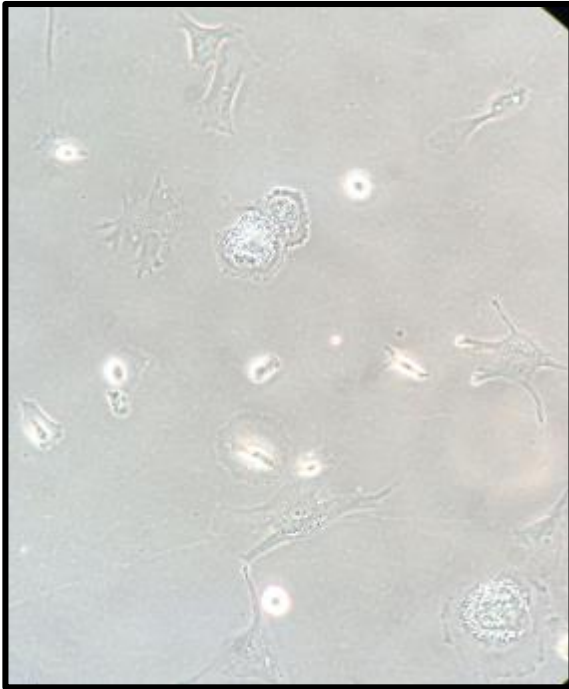
- Dia 12:



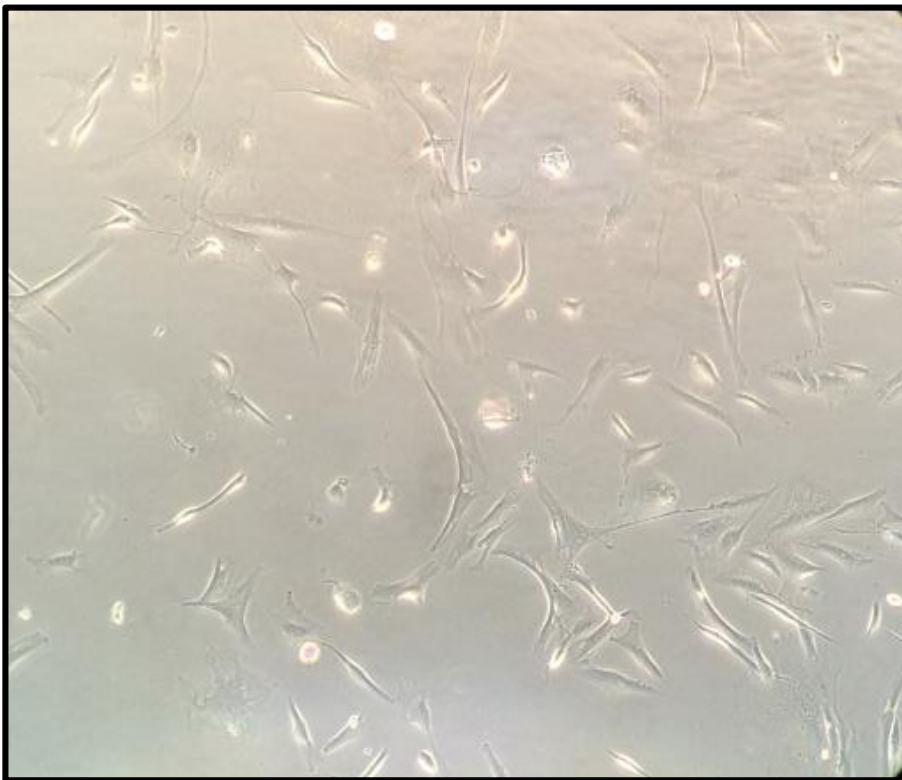


- Dia 13:

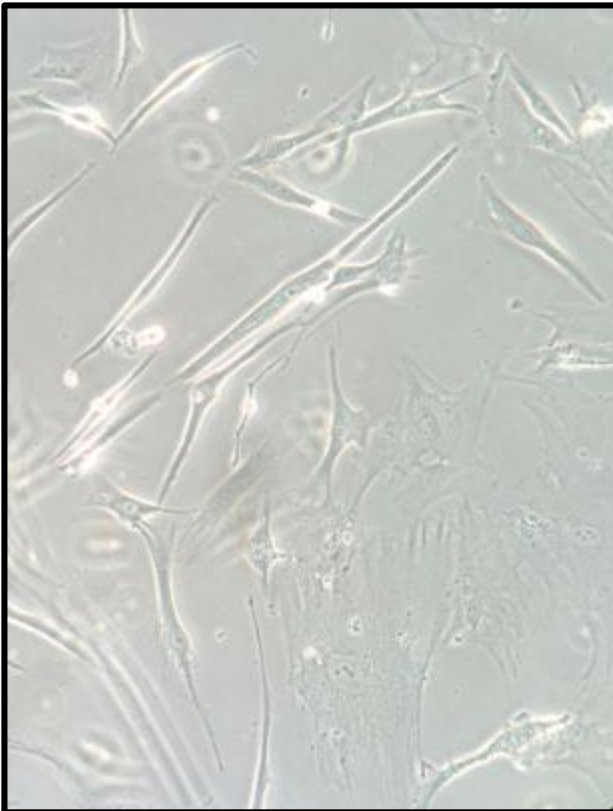


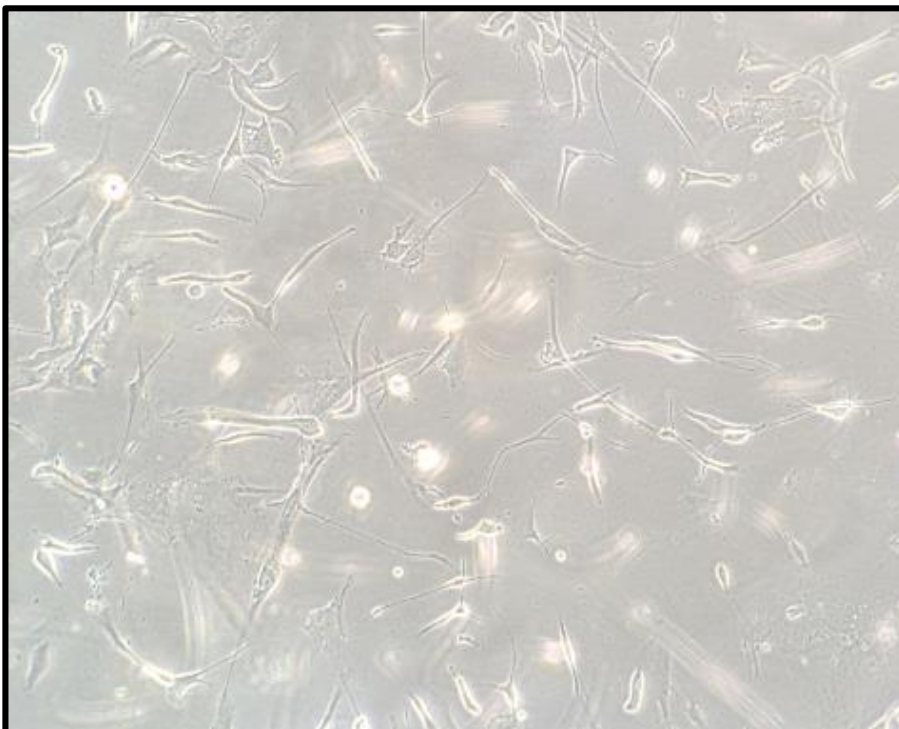
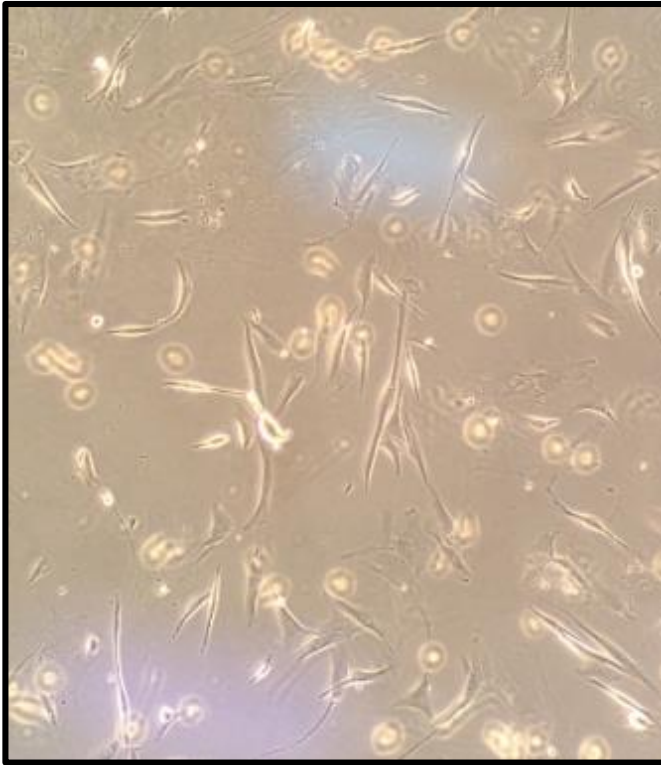


- Dia 19:

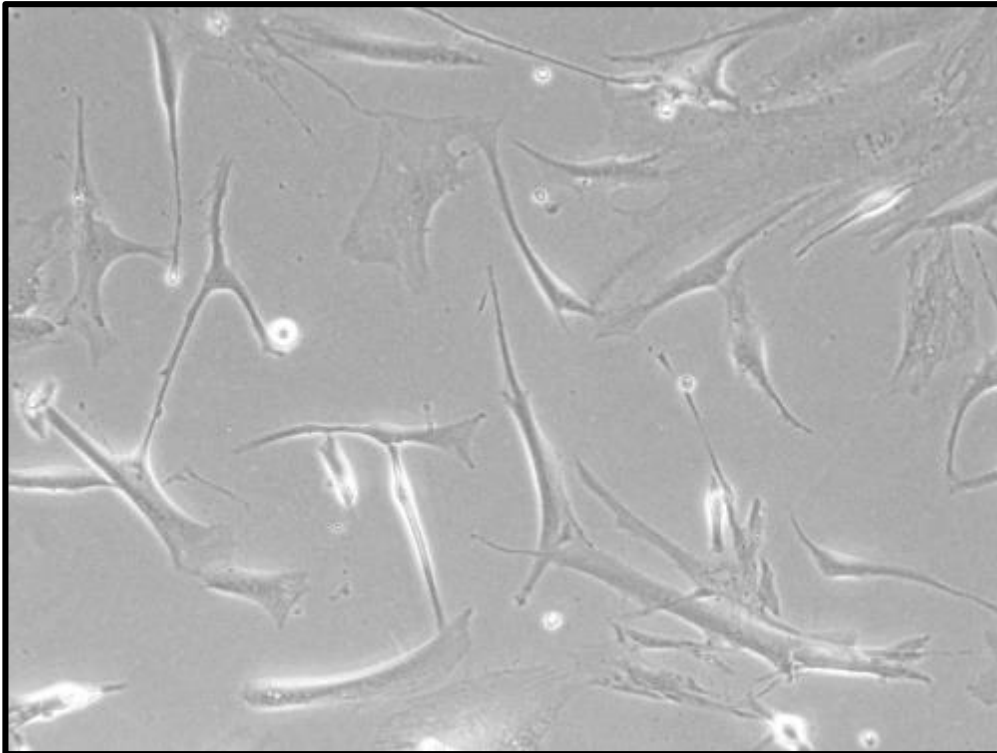
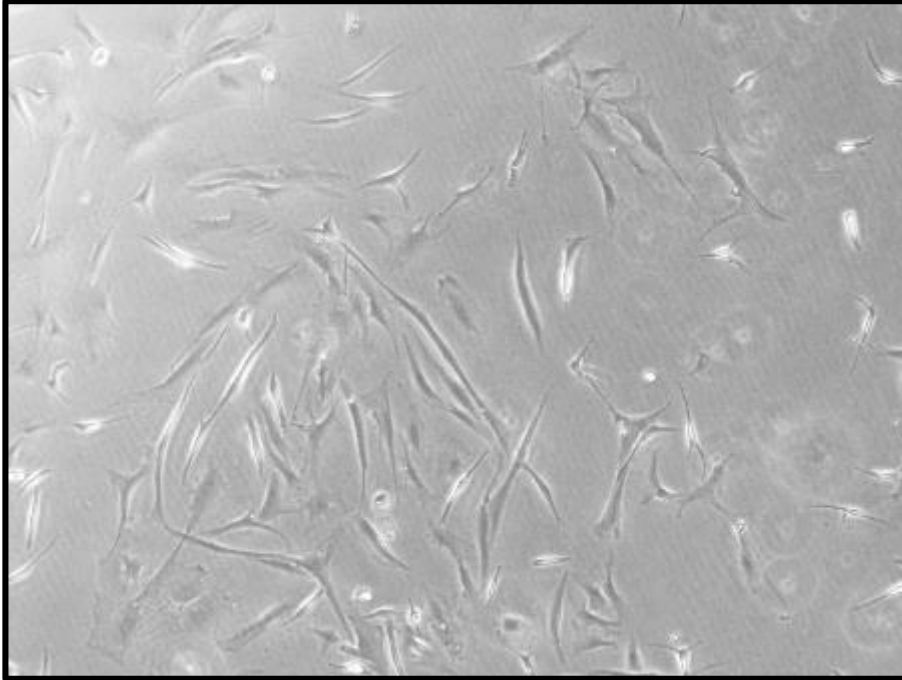


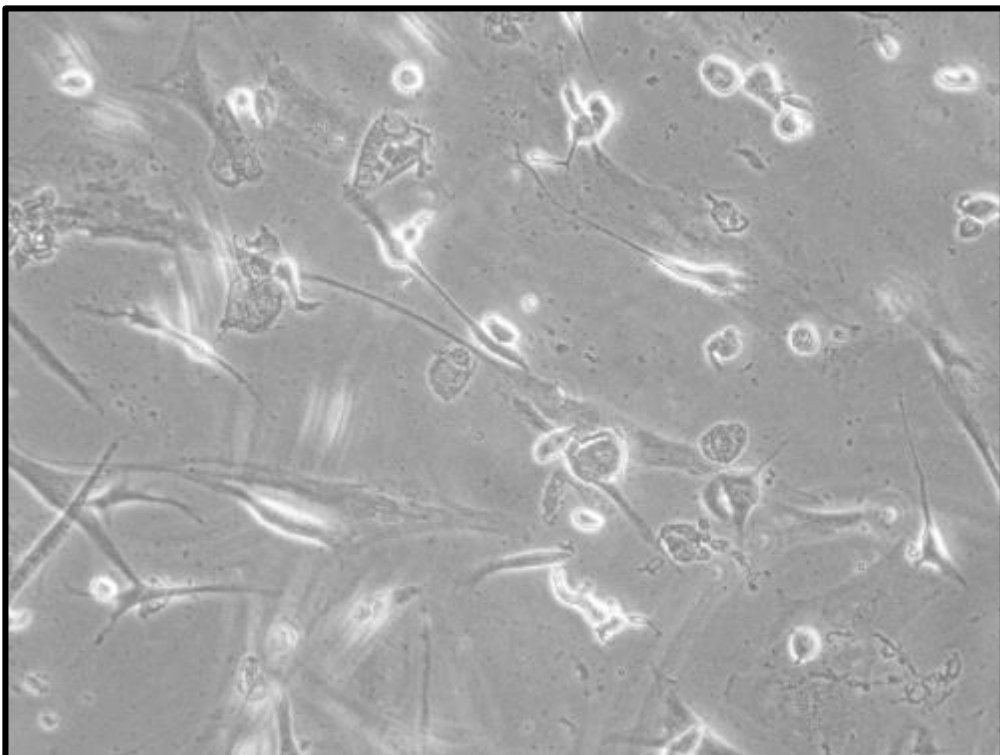
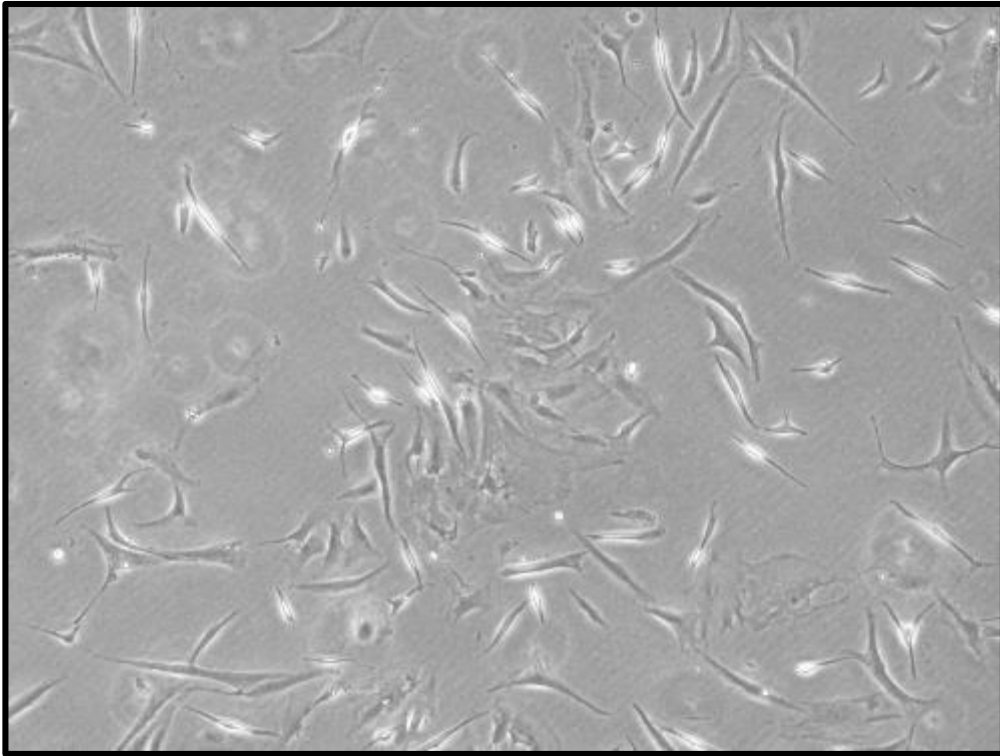
- Dia 20:



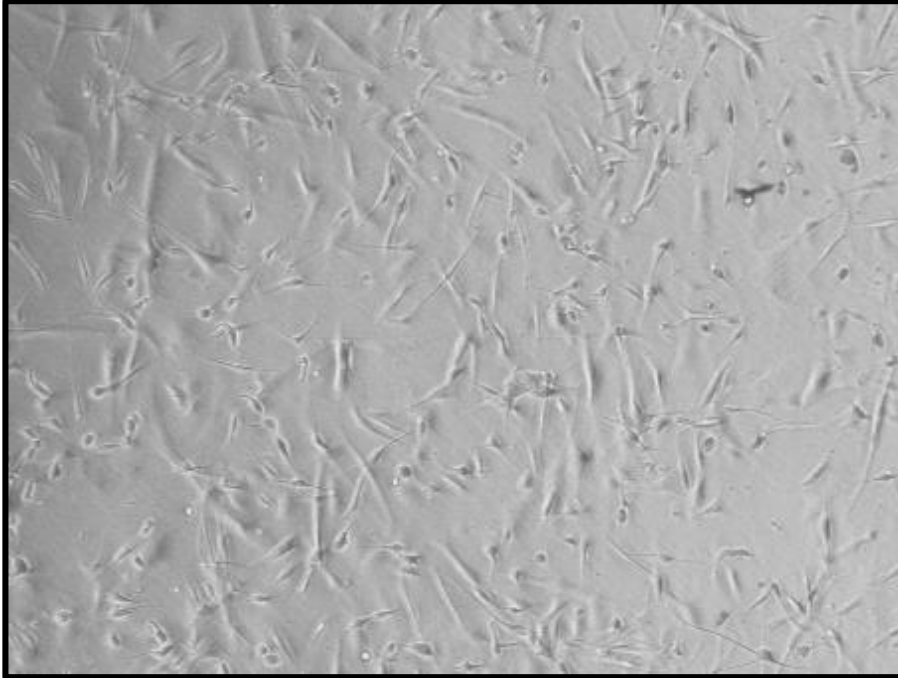


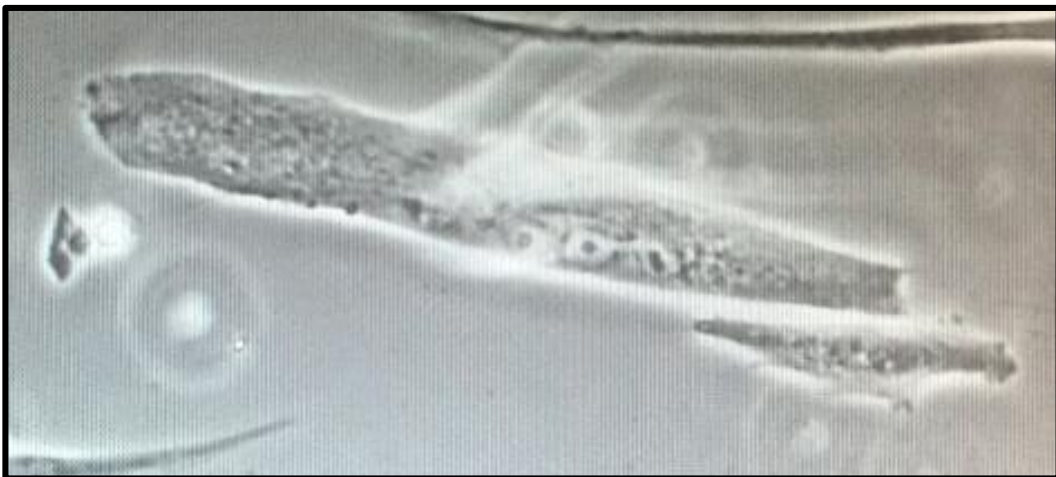
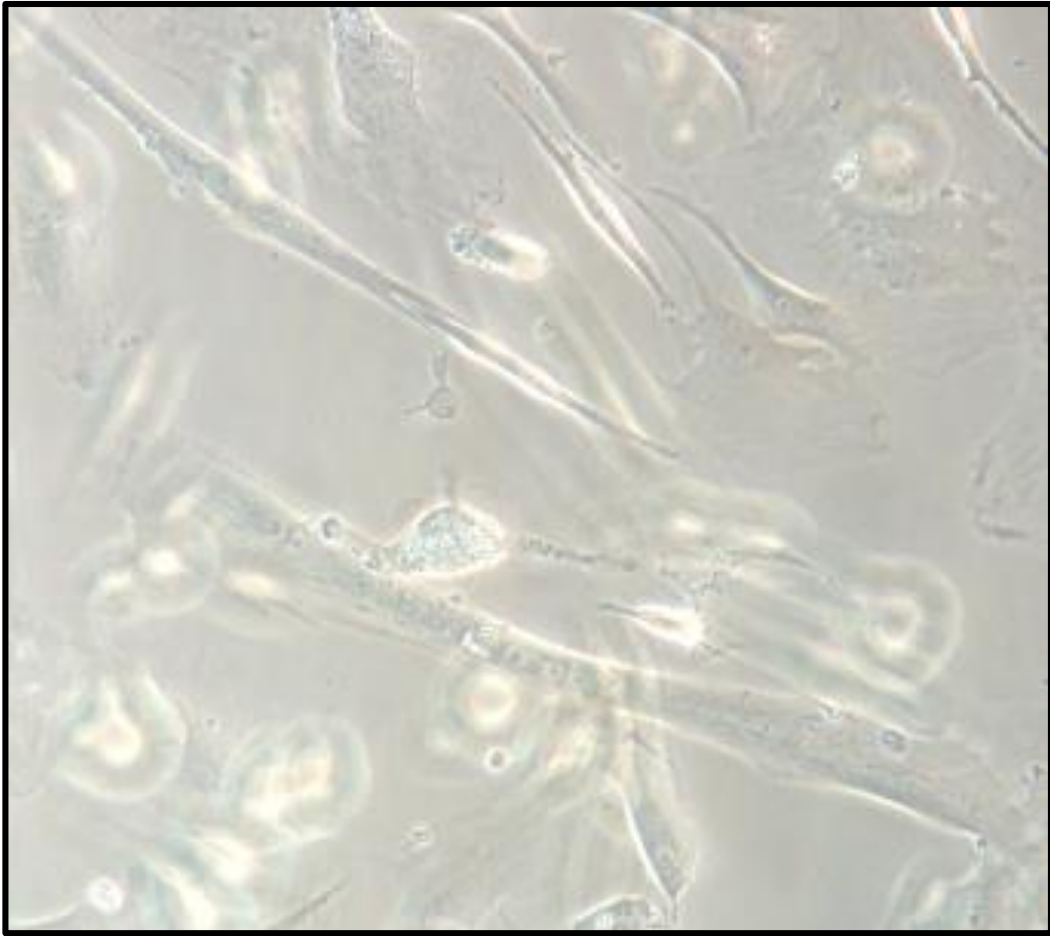
- Dia 21:



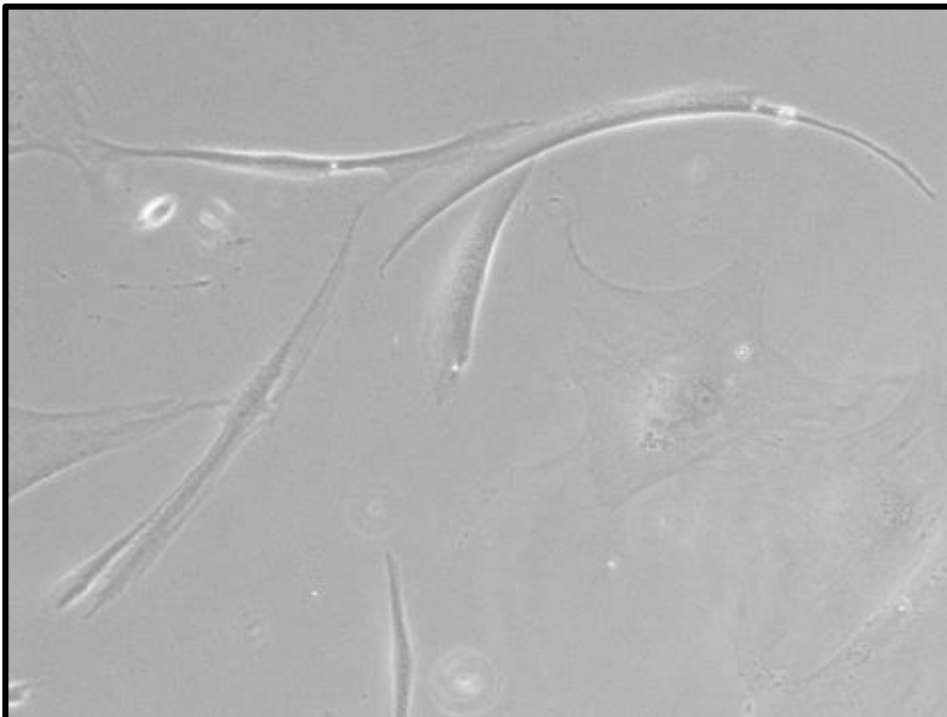


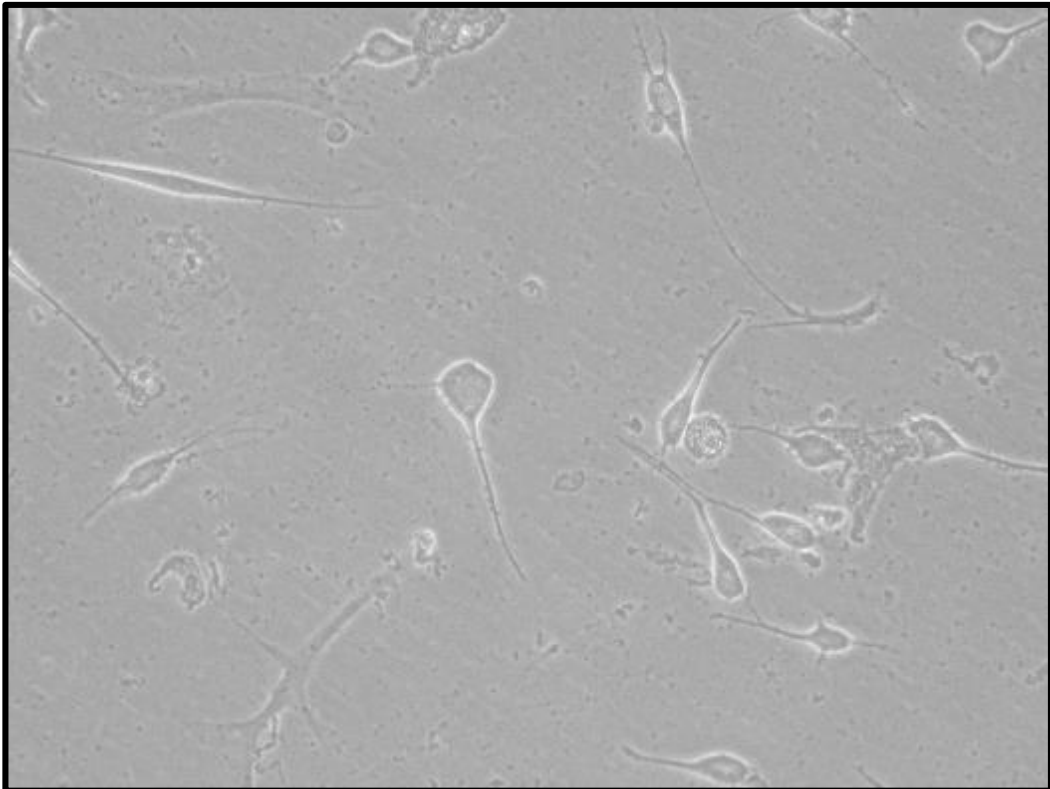
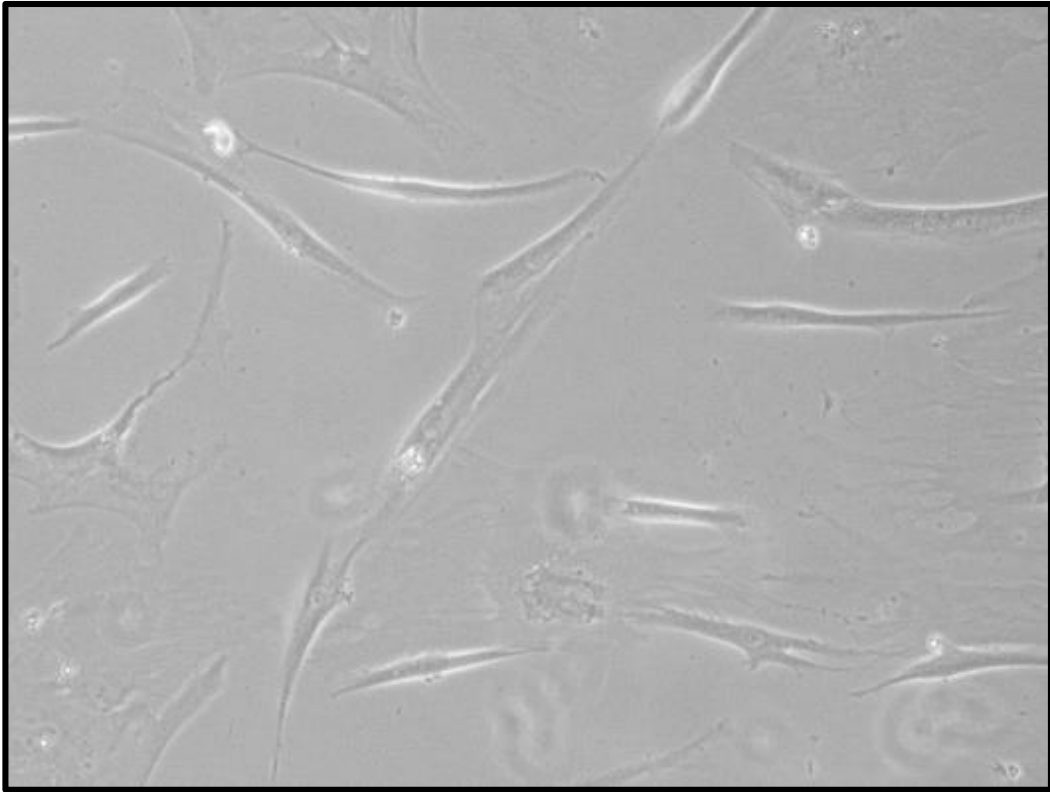
- Dia 22:



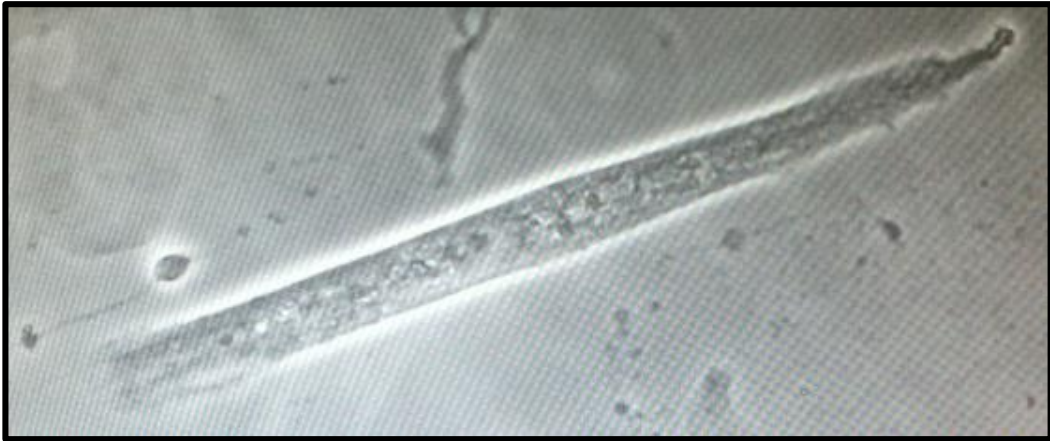


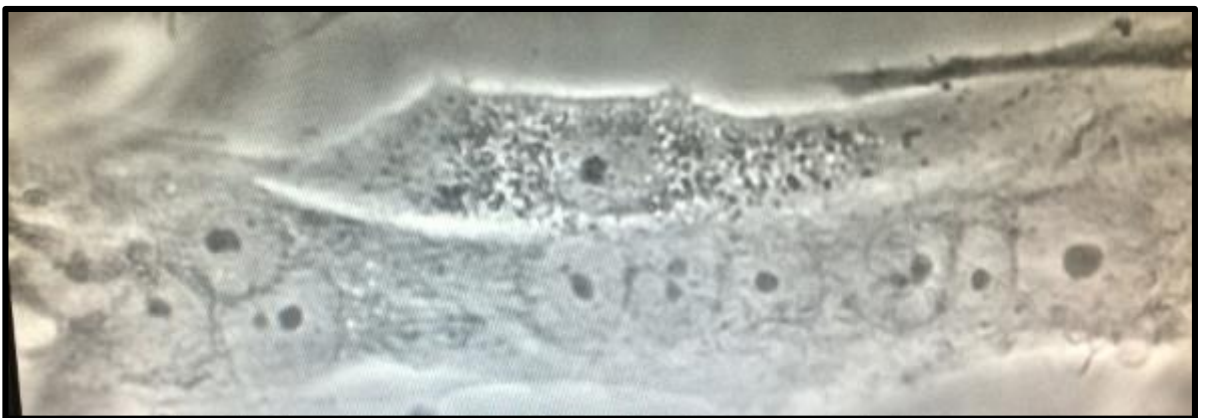
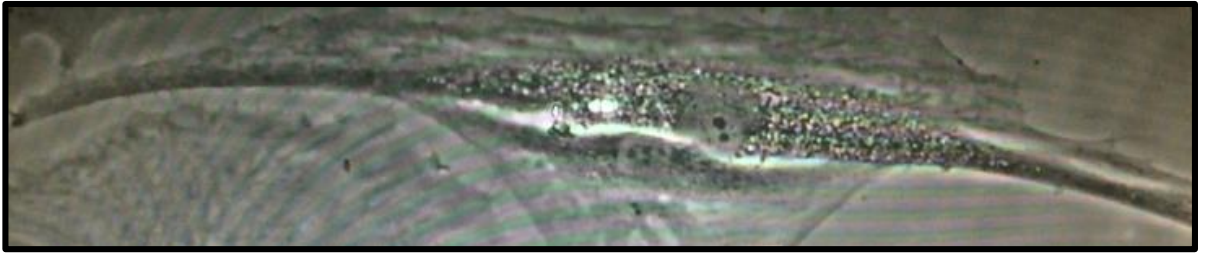
- Dia 25:



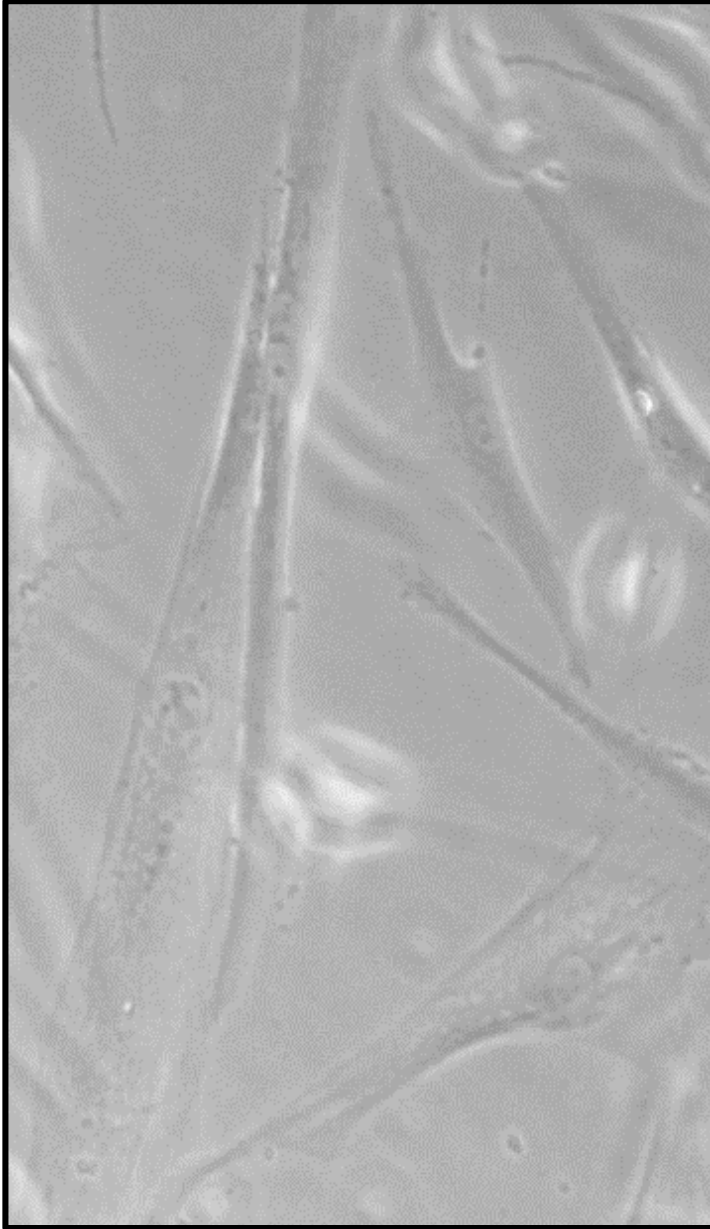


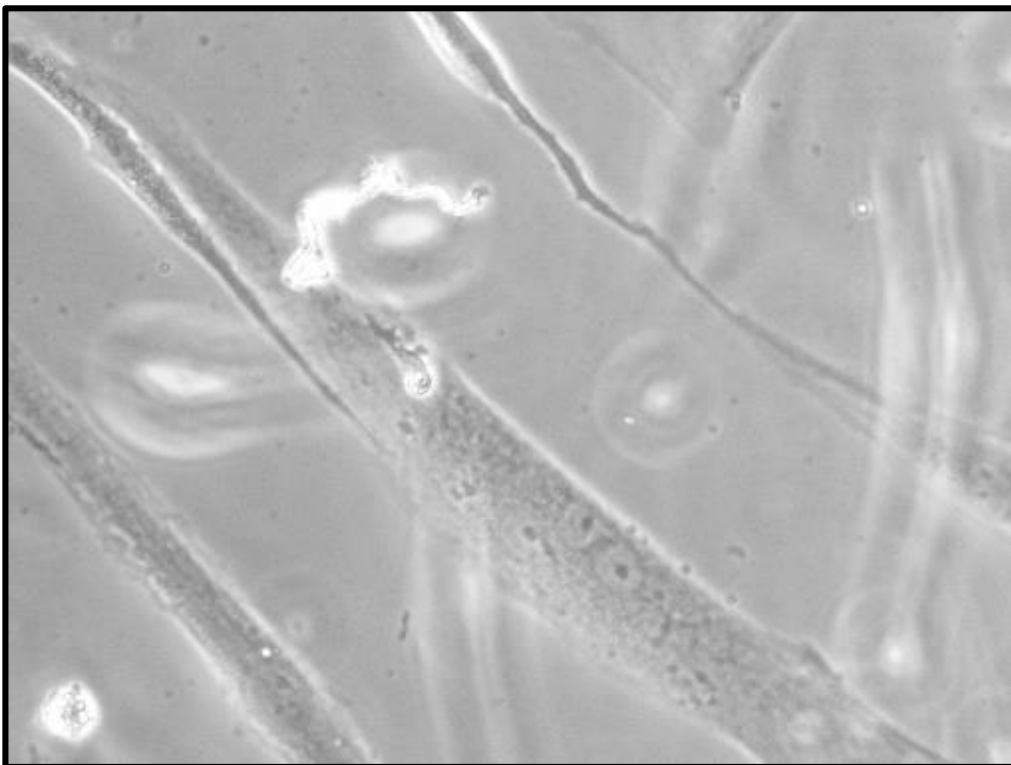
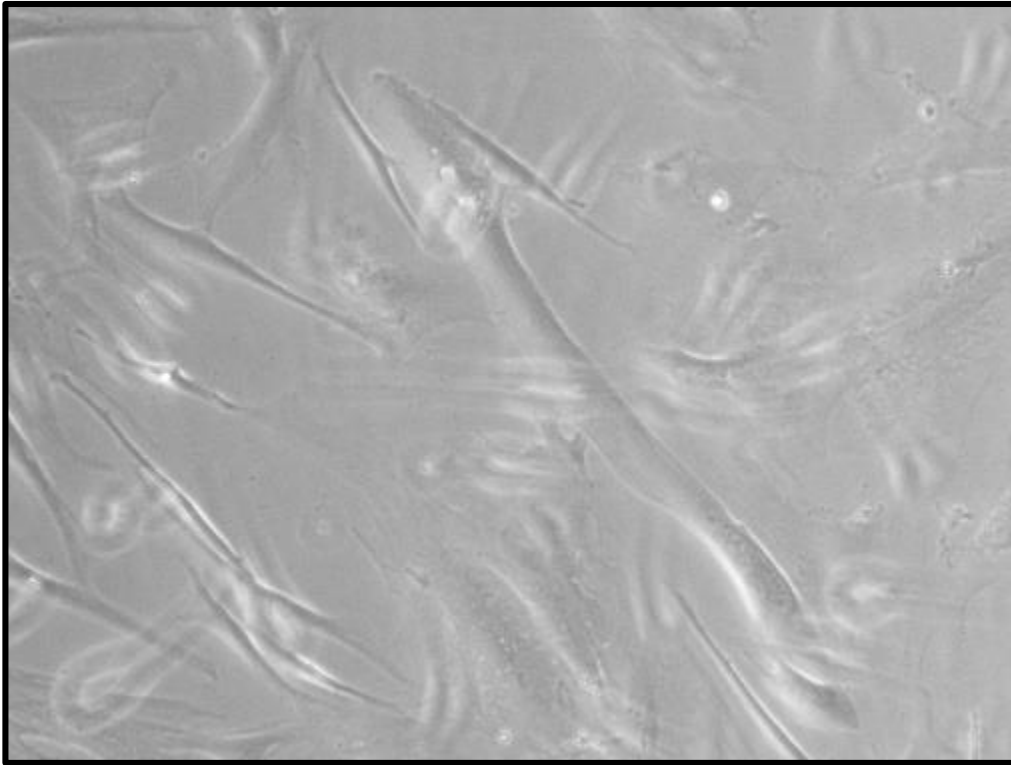
- Dia 26:

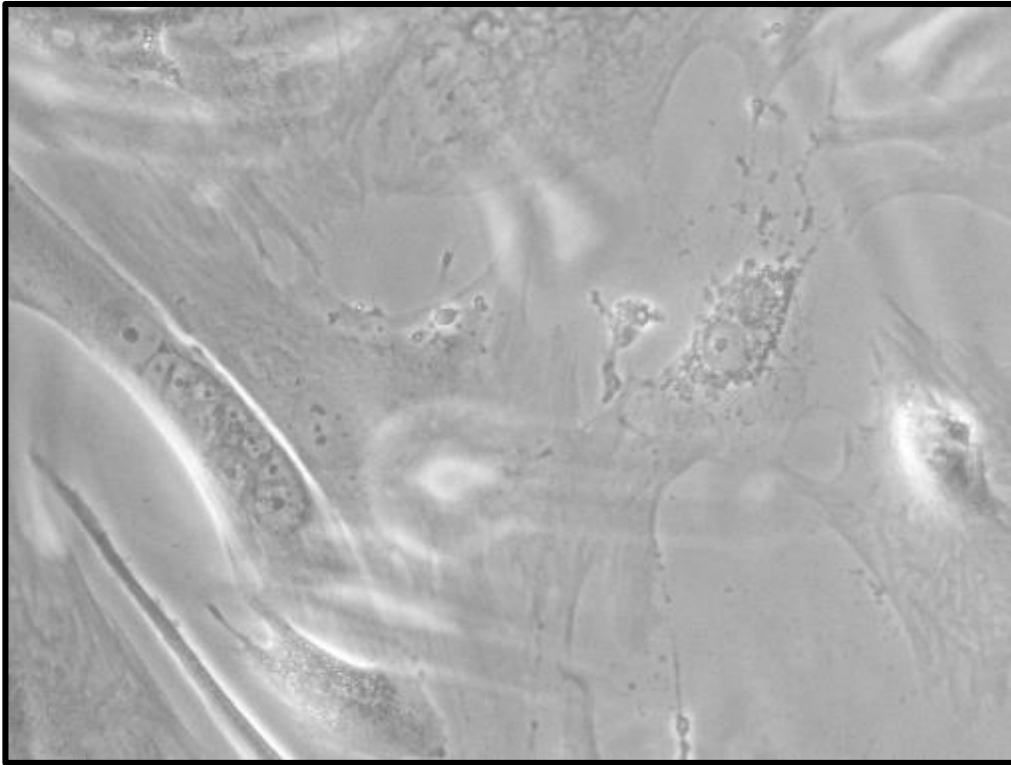




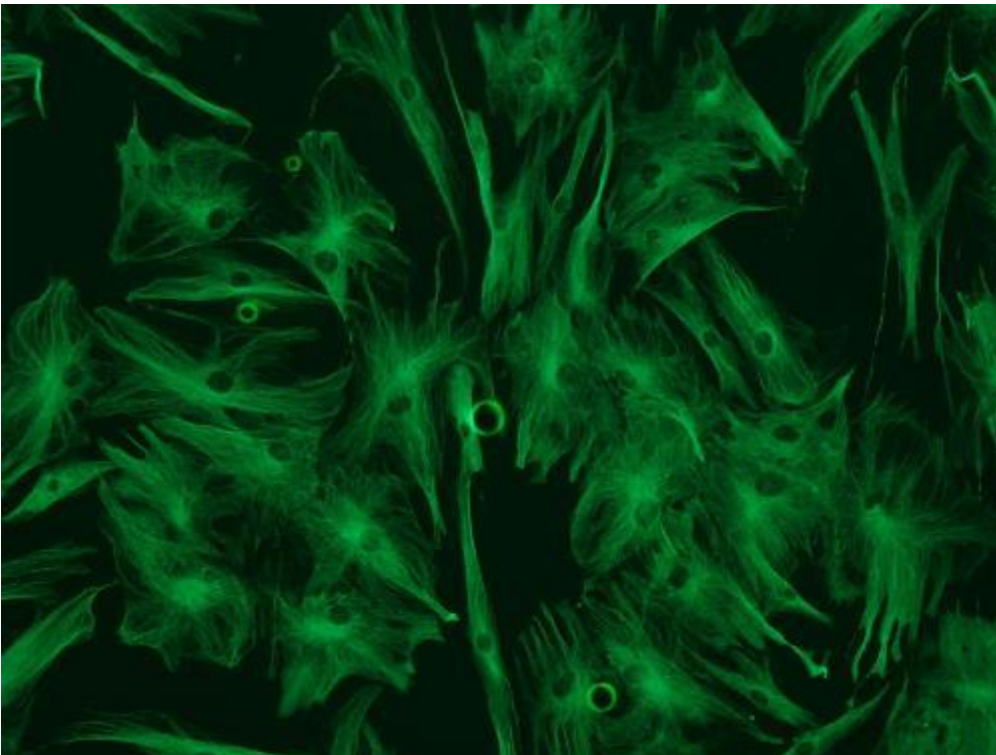
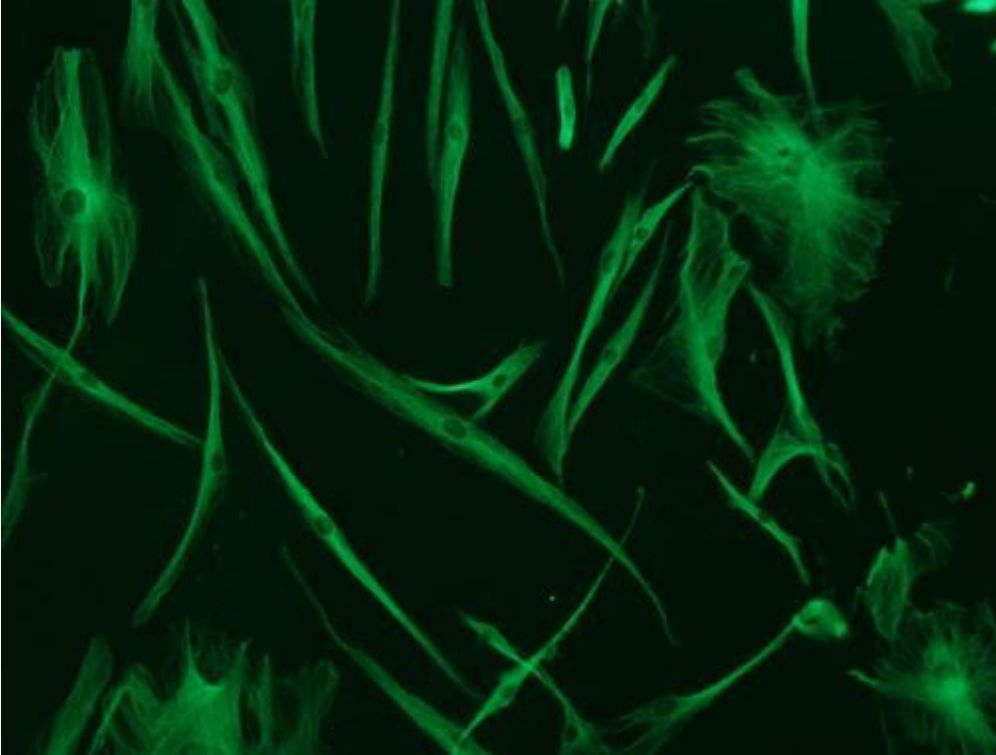
- Dia 27:

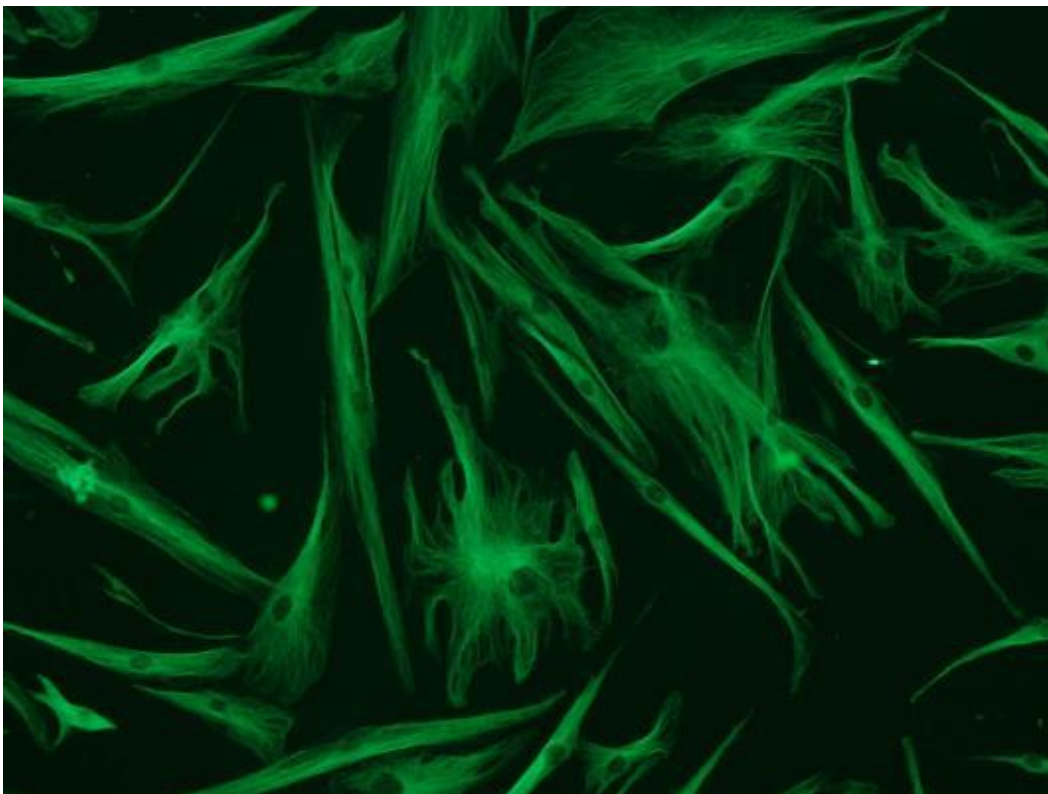
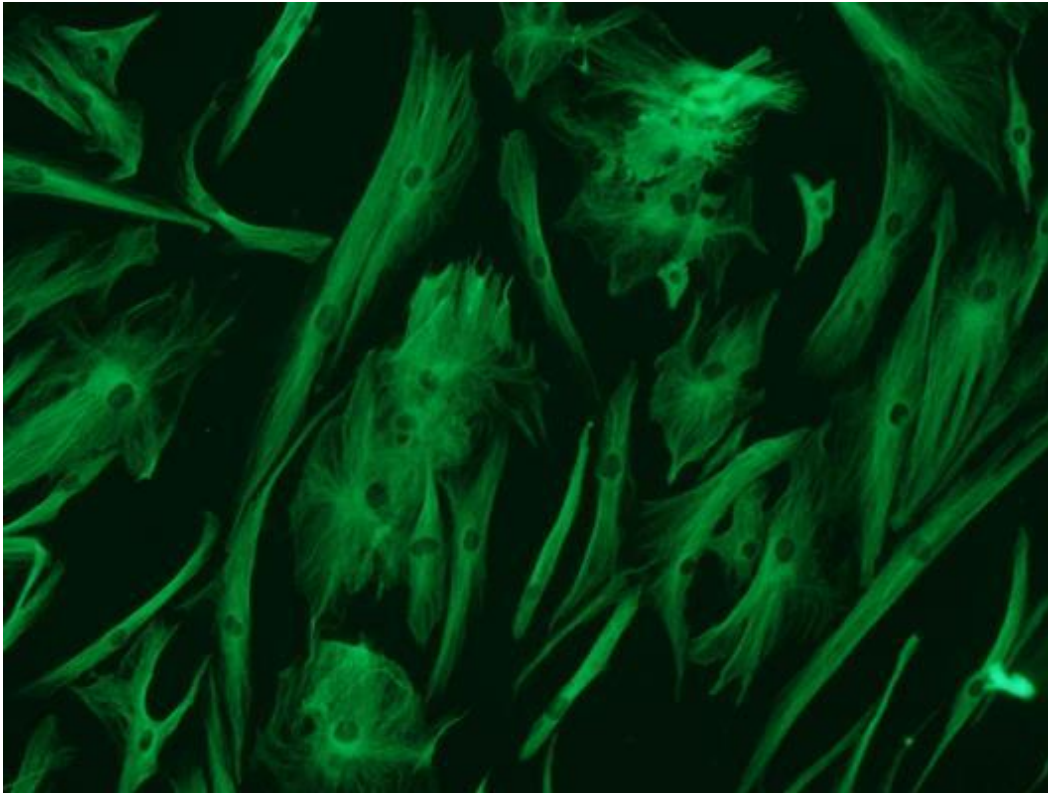


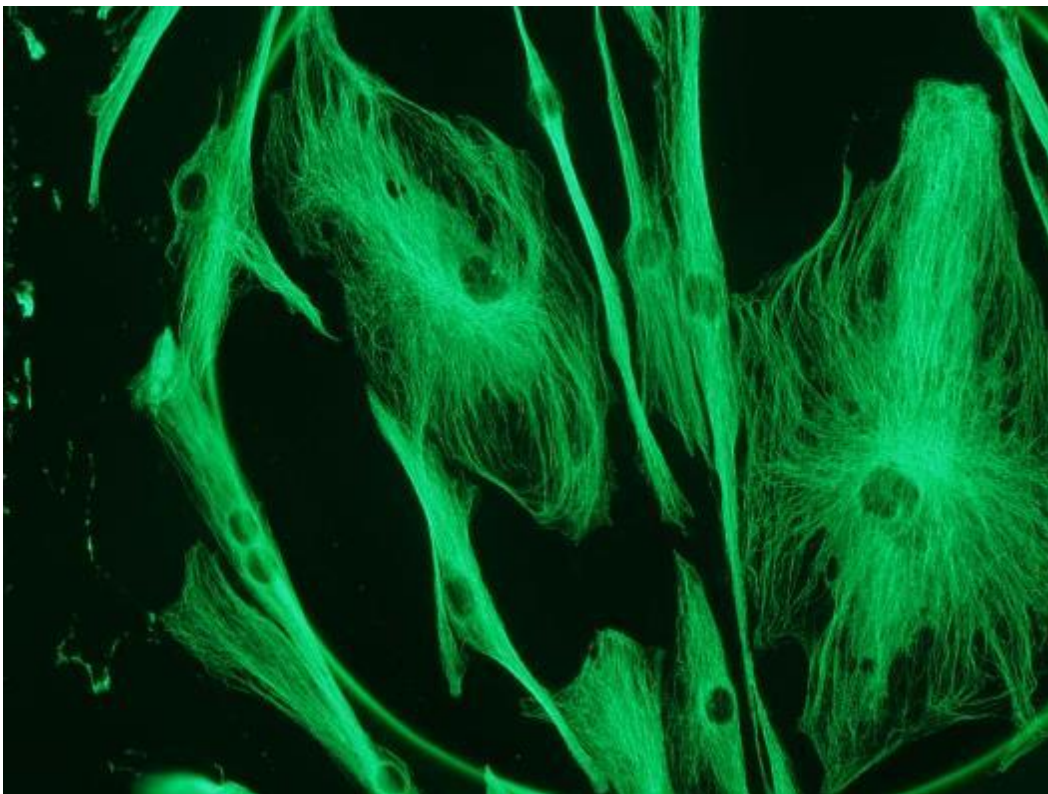
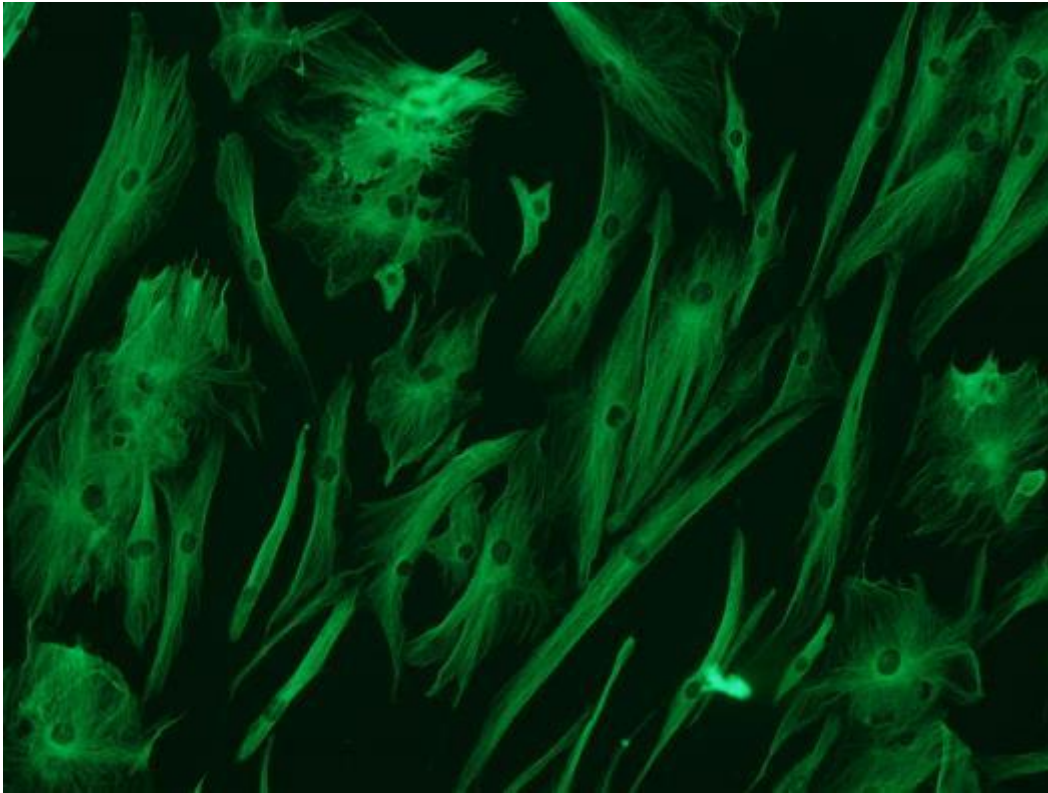


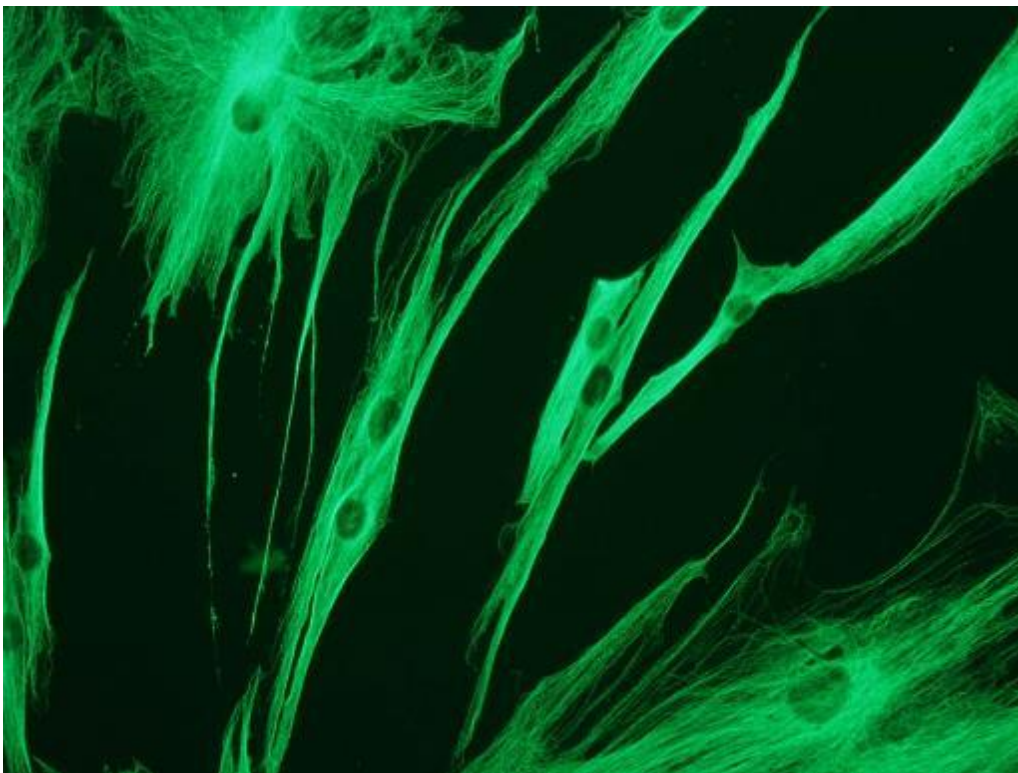
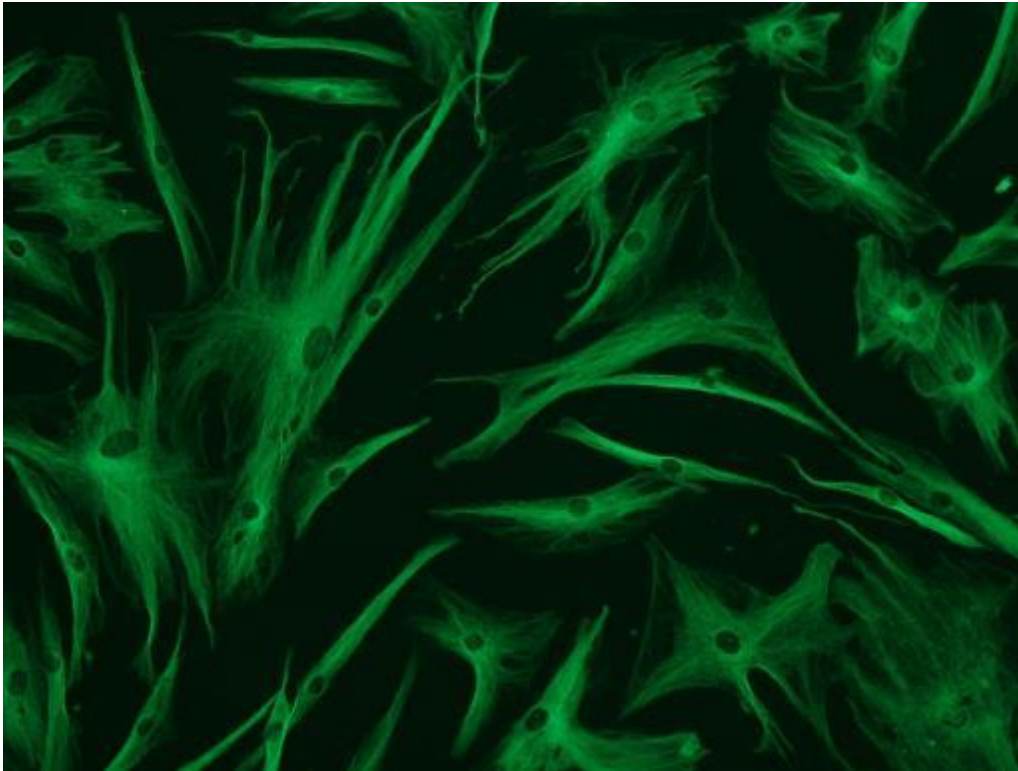


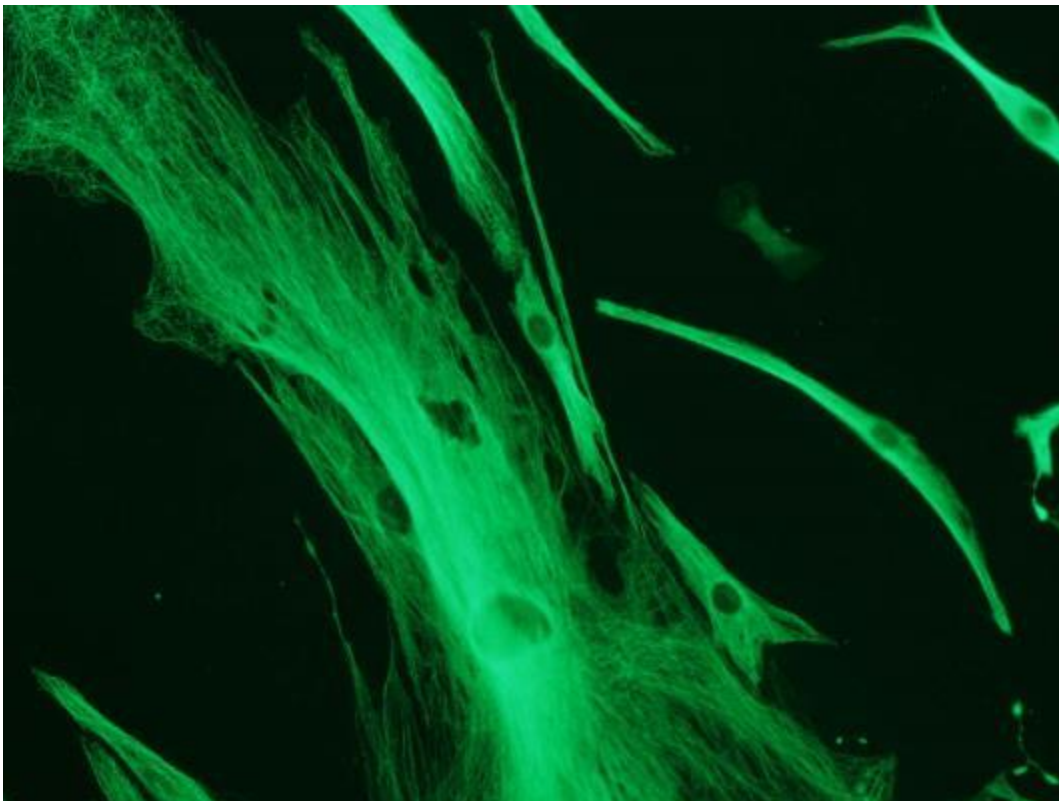
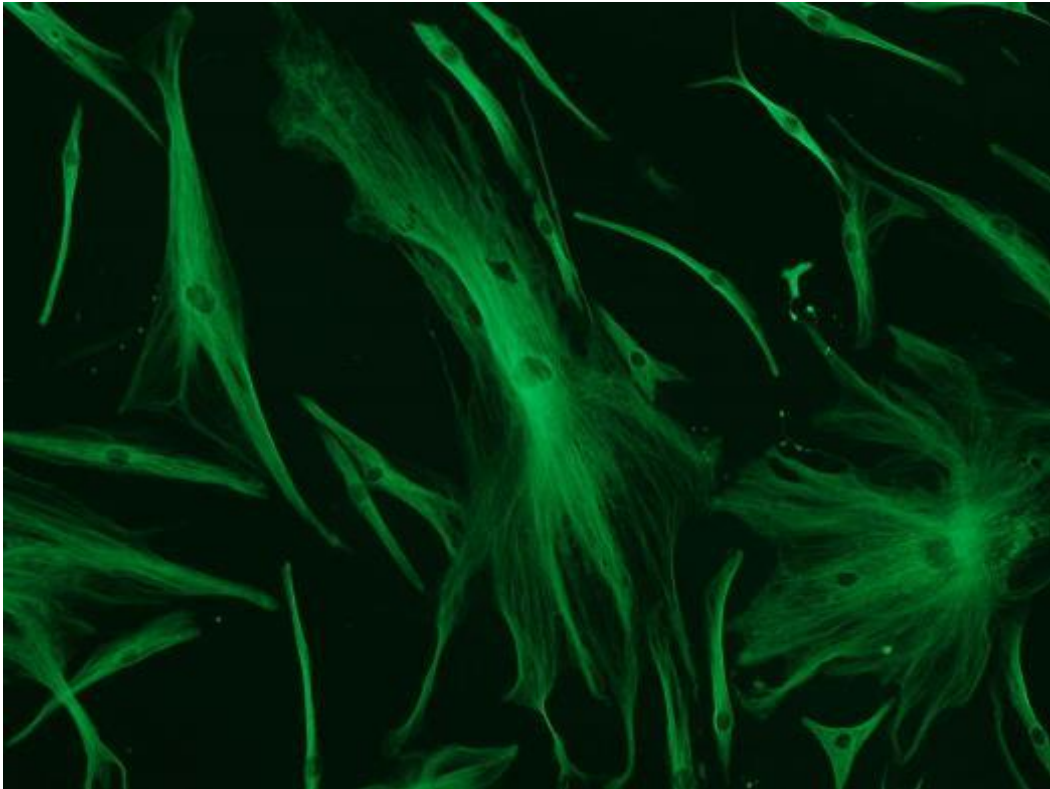
Immunocitoquímica

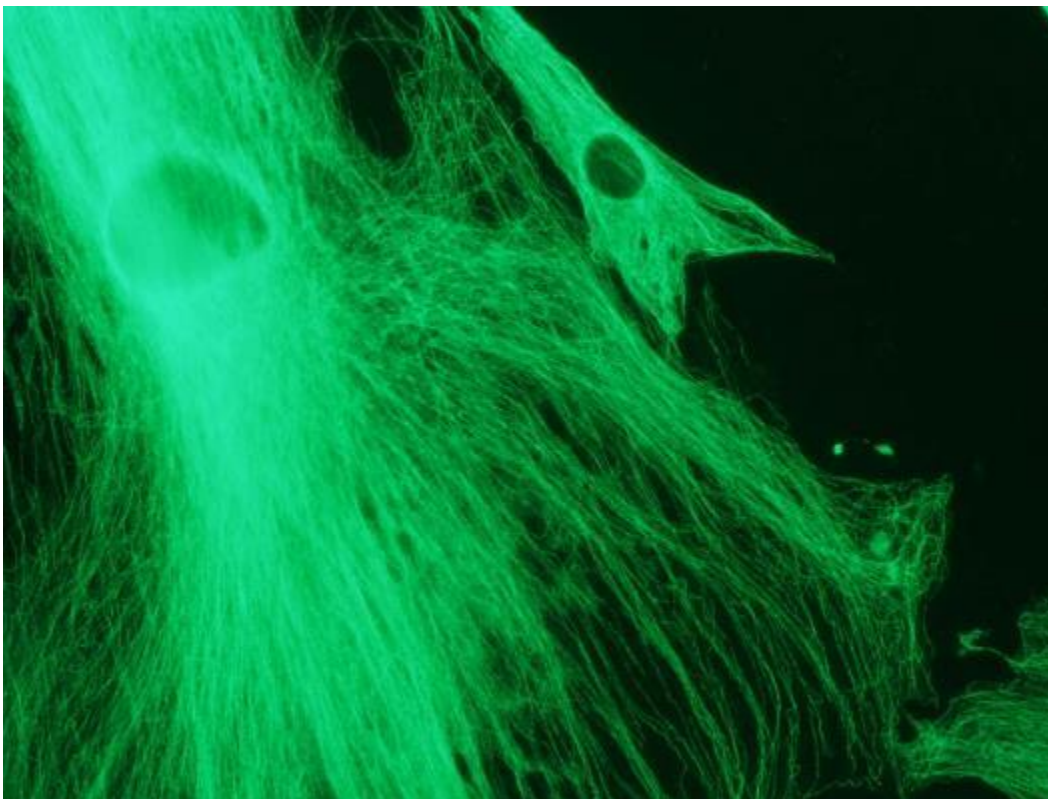
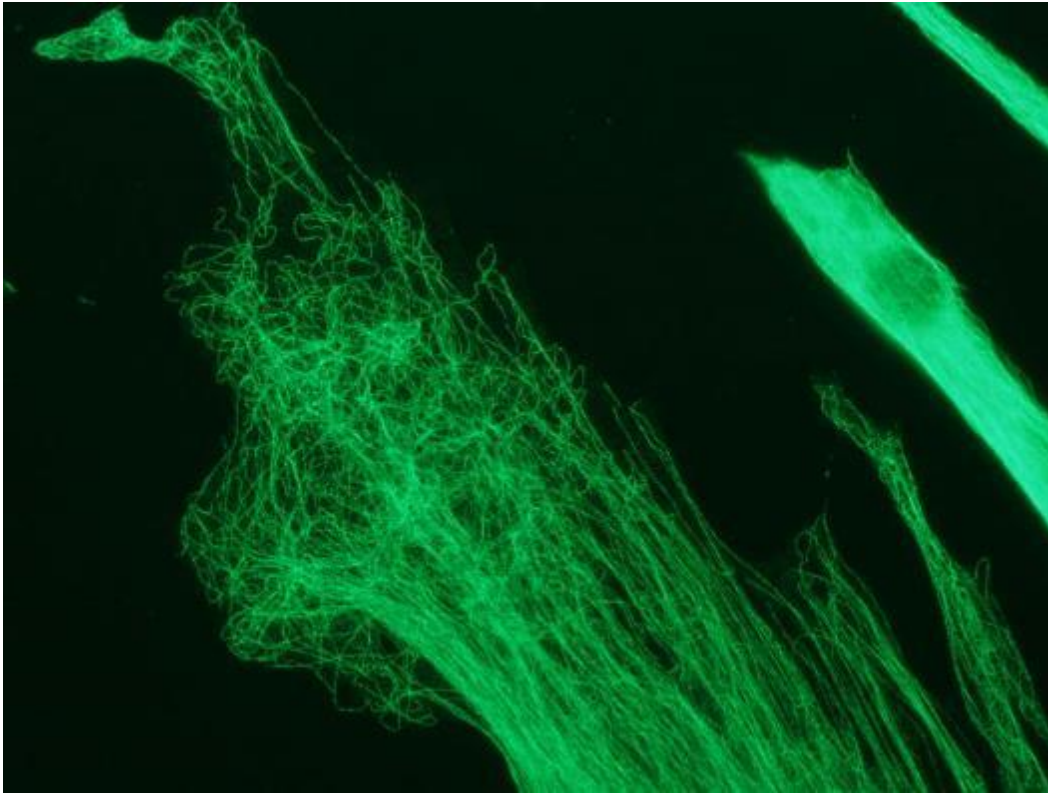


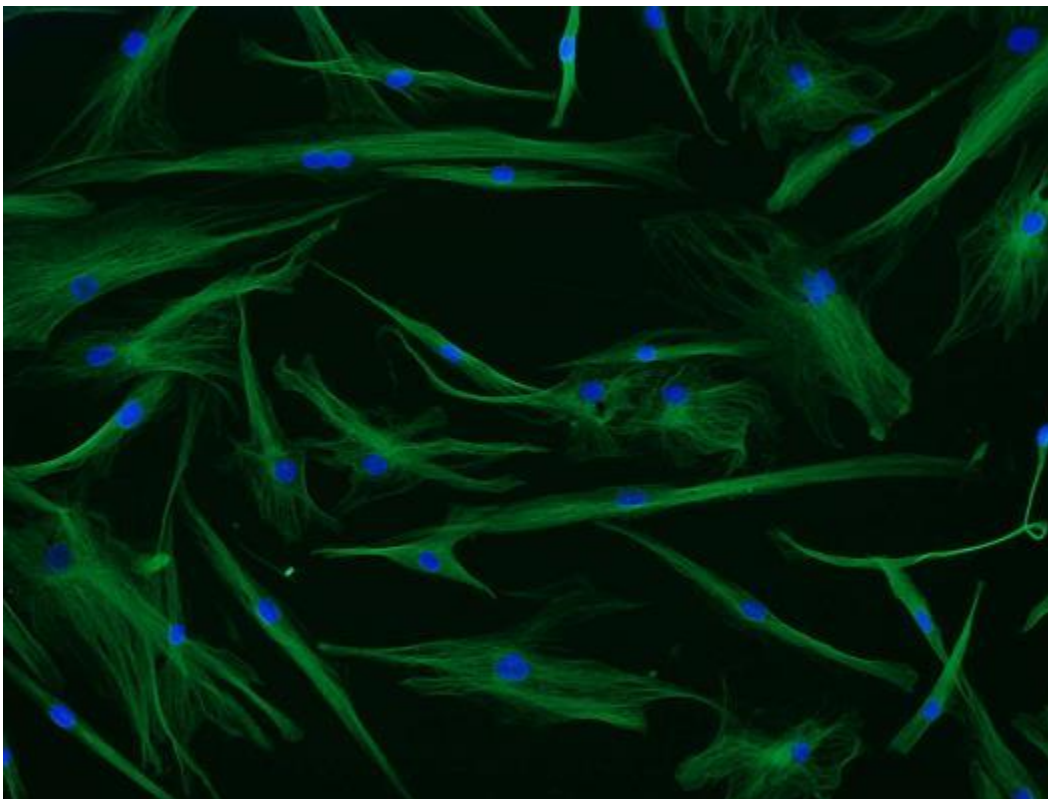
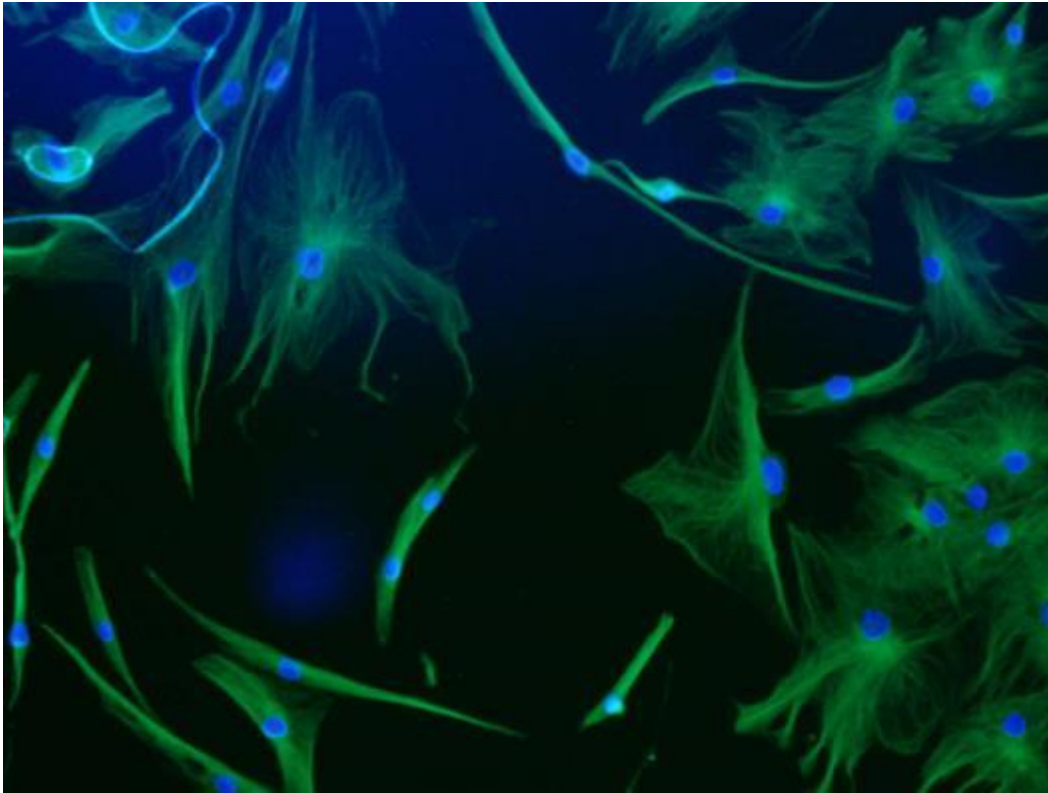


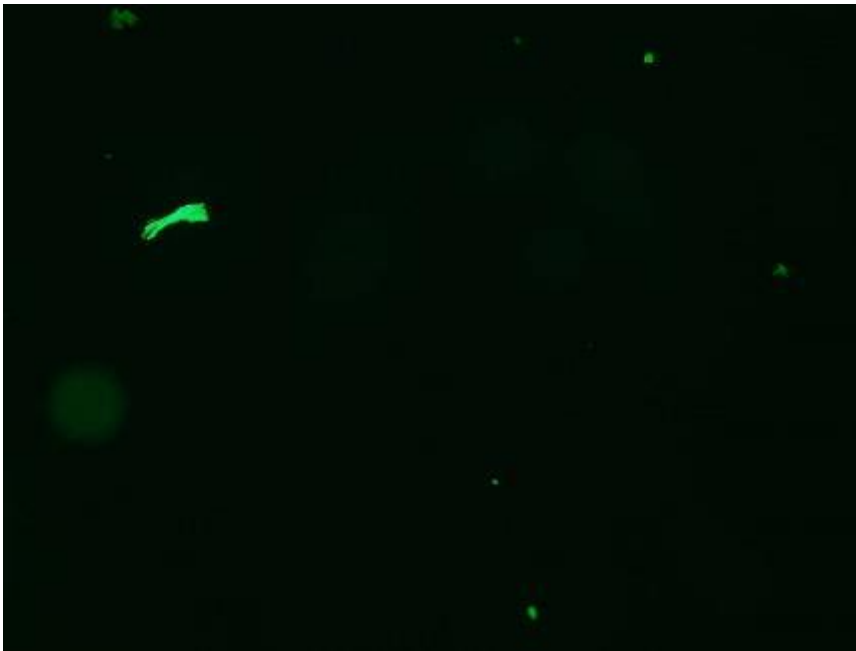
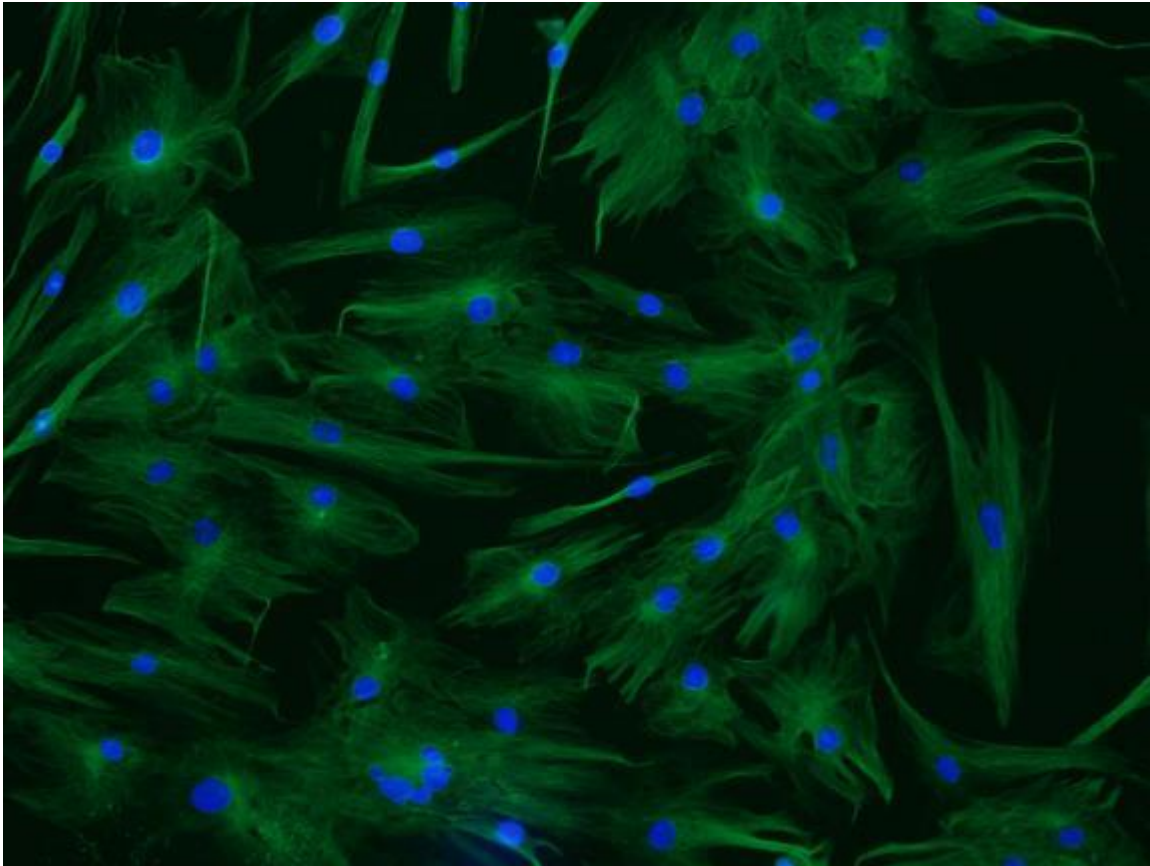












10. Índex

I.Pròleg per Ángel Raya	pàg. 2
II.Pròleg per Eduard Gallardo	pàg. 3
1 Introducció	pàg. 5
2 Cèl·lules mare	pàg. 7
2.1 Història de la investigació de cèl·lules mare	pàg. 7
2.2 Definició	pàg. 12
2.3 Propietats	pàg. 13
2.4 Classificacions	pàg. 15
2.5 Mètodes/llocs d'obtenció	pàg. 17
3 Regeneració del teixit muscular estriat	pàg. 24
3.1 El teixit muscular	pàg. 24
3.2 Cèl·lules que contribueixen en la regeneració muscular	pàg. 25
3.3 Procés de regeneració muscular	pàg. 29
4 Distrofies musculars	pàg. 32
4.1 Definició	pàg. 32
4.2 Tipus i característiques	pàg. 32
5 Aplicació de cèl·lules mare	pàg. 36
5.1 Definició	pàg. 36
5.2 Processos a seguir	pàg. 36
5.3 Aplicació a les dystrofies	pàg. 37
5.4 Tractaments actuals	pàg. 40
5.5 Futurs tractaments	pàg. 41
6 Pràctica	pàg. 42
6.1 Diagnòstic de dystrofies mitjançant biòpsies musculars	pàg. 42
6.2 Tractant amb mioblasts	pàg. 46
6.3 Visita a la sala blanca	pàg. 72

6.4	Entrevista a Ángel Raya	pàg. 73
7	Conclusions	pàg. 84
8	Bibliografia i webgrafia	pàg. 87
9	Annex	pàg. 93
10	Índex	pàg. 118