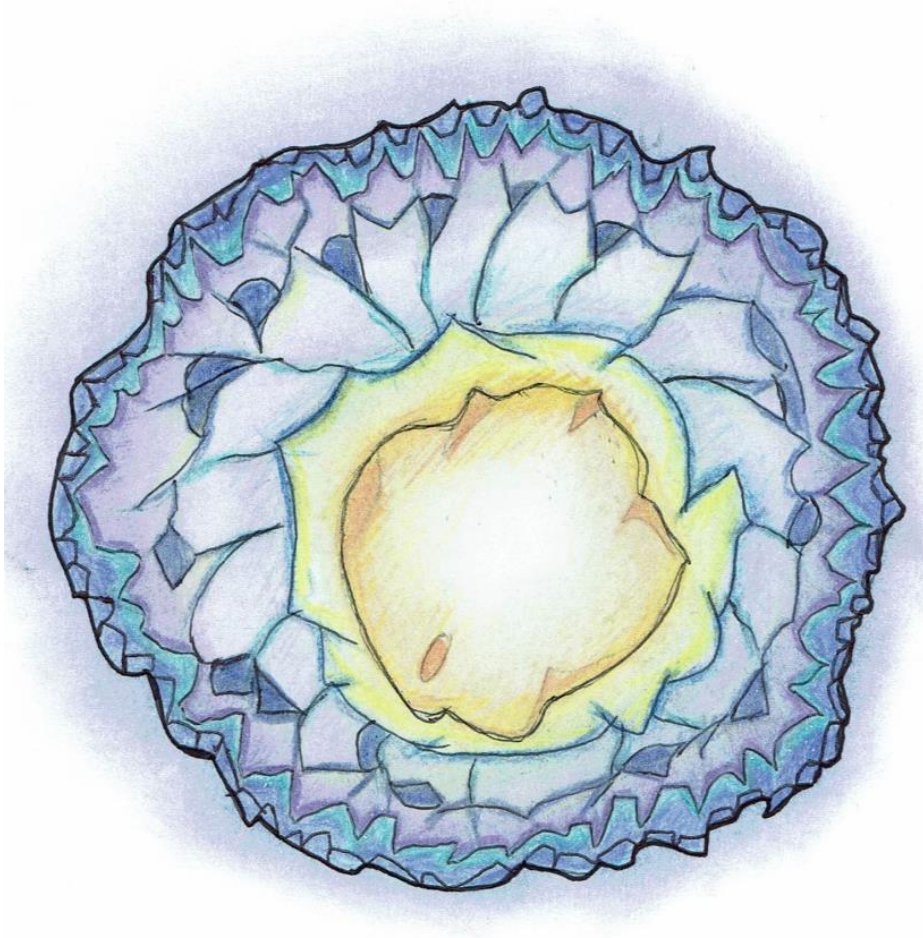


La pluripotència de les cèl·lules mare



Pseudònim: Tramuntana00

Curs: 2n Batxillerat A

Tutora:

Centre:

Promoció: 2016-2018

“Sense les cèl·lules mare ningú seria aquí o allà,
just on és ara mateix.”

Daniel Closa

Índex

1. Introducció	3
1.1. Motivació	4
1.2. Agraïments	4
2. Què són les cèl·lules mare?	6
3. Tipologia	7
3.1. Segons la potència	7
3.2. Segons la seva localització	7
3.3. Localització	8
4. La bioètica i les cèl·lules mare	9
5. El valor de les cèl·lules mare	10
6. Els factors de Yamanaka i les cèl·lules iPS	11
7. Part pràctica experimental	13
7.1. Model experimental <i>in vitro</i>	13
7.2. La importància de l'esterilitat al laboratori	14
7.3. Protocol convencional del CMR[B]	15
7.3.1. Reprogramació	16
7.3.2. La diferenciació	19
8. Conclusions	24
9. Bibliografia i webgrafia	26

1. Introducció

El tema de les cèl·lules mare és un món immensament gran i encara ple d'incògnites. Es troba actualment en investigació i és una de les línies més potents de recerca del nostre país ja que es creu que en un futur, cada vegada més proper, les cèl·lules mare tindran el potencial d'enfrontar-se a multitud de malalties humanes, reparant teixits específics o substituint òrgans sencers. D'això se'n diu regeneració, *un procés biològic complex pel qual es restitueixen les parts del pla corporal després d'una lesió o amputació*.

En aquest treball de recerca analitzarem els mètodes experimentals dels quals disposem per estudiar les cèl·lules mare, i més concretament, el procés de diferenciació. Per fer-ho, hem realitzat unes pràctiques als laboratoris de biologia molecular del Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMR[B]), situat dins l'hospital Duran i Reynals. Aquí, hem pogut veure quins són els protocols que s'utilitzen, quins experiments s'hi duen a terme i quines finalitats tenen aquests processos a la clínica.

De forma resumida ja que més endavant aprofundirem en el tema, les cèl·lules mare, més comunament anomenades Stem Cells, són cèl·lules indiferenciades, és a dir, que encara no s'han especialitzat, sense identitat pròpia, i aquest tret tant característic permet utilitzar-les per curar tot un seguit de malalties. Aquest treball se centra en les conseqüències que provoquen els infarts aguts de miocardi o més comunament anomenats atacs de cor, que són la principal causa de morbiditat i mortalitat del món occidental.

Una isquèmia cardíaca és l'oclusió d'una artèria coronària del cor i això provoca que el rec sanguini no arribi a una part del miocardi, el múscul cardíac, i és quan es dona un infart de miocardi. Les seves conseqüències són tan severes que moltes vegades són lesions permanents i irreversibles. La principal conseqüència és la mort cel·lular. Però hi ha una possible solució per poder duu a terme la regeneració d'aquest òrgan: les cèl·lules mare.

Cada cèl·lula del cos humà té una funció determinada i serveix només per a aquesta funció. Se'n diu determinació cel·lular. Una cèl·lula de la pell sempre serà de la pell, com la de la sang o la de la medul·la espinal sempre seran de la sang o de la medul·la espinal, i cadascuna d'elles farà les funcions que els pertoquen. Però en els embrions i en els cordons umbilicals dels nounats hi ha unes cèl·lules úniques que poden evolucionar adaptant-se a tots els òrgans del cos humà; més ben dit, es poden especialitzar o bé convertir-se en més cèl·lules mare. I aquestes cèl·lules, les cèl·lules mare, són les que els científics creuen que poden revolucionar la medicina regenerativa del futur. Si un cor rebés cèl·lules mare veuríem com aquestes cèl·lules s'adaptarien a l'òrgan afectat i en podrien facilitar la curació. Sabent això m'he plantejat una pregunta relacionada amb aquest tema: és possible obtenir cardiomiòcits *in vitro* al laboratori a partir de cèl·lules que pertanyen a un altre teixit de l'organisme? La meva hipòtesi és que potser sí que és possible gràcies a les cèl·lules mare.

En investigació, múltiples línies han tractat de desenvolupar teràpies alternatives per al transplantament del cor. La idea és reemplaçar les cèl·lules del miocardi malmeses per teixit funcional sa. Per això s'ha adreçat una gran atenció a identificar fonts de cèl·lules adequades per ser implantades en el cor del malalt.

En aquest treball de recerca parlarem del concepte de les cèl·lules mare, la seva importància, les seves característiques, quins tipus de cèl·lules mare hi ha i, també, del protocol experimental que s'utilitza al laboratori del Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMR[B]), centrant-nos en el procés de diferenciació que utilitza cèl·lules humanes. A més, desenvoluparem una part pràctica relacionada amb això, que consistirà en l'observació i descripció d'un protocol experimental de diferenciació a partir de cèl·lules mare pluripotents, dut a terme per la Dra. Olalla Iglesias García als laboratoris de biologia molecular del CMR[B].

Les dificultats més significatives que hem tingut han estat principalment, els aspectes de la documentació i la incertesa deguda a que l'àmbit de les cèl·lules mare encara s'està investigant, per tant, no existeix encara una base de coneixement suficient, cosa que conté moltes incògnites sense resoldre. A més, és un tema bastant complex i és per aquest motiu que la majoria de fonts d'informació són en anglès, encara que alguna l'hem trobat en castellà. Això ha requerit la traducció de tota la informació al català, per poder-la utilitzar per al treball. I una altra qüestió és la dels desplaçaments per fer la part pràctica. En total, hem anat nou vegades a l'hospital Duran i Reynals de Barcelona.

1.1. Motivació

El treball de recerca és un dels darrers passos que cal realitzar abans d'anar a la universitat, deixant a part la selectivitat. El gran dilema és escollir quina carrera universitària vull fer i, quan ho sàpiga, veure si tinc suficient nota per entrar-hi. Vull triar la carrera que més m'escaigui i m'agradi, ja que segurament serà al que em dedicaré la resta de la meva vida. Com sabem tots, és una decisió molt important en la vida d'un estudiant de 2n de Batxillerat i a vegades, fins i tot, difícil. És per això que vull escollir-la de la millor manera possible i aquest és el motiu del tema del meu treball de recerca. A mi m'agraden molt els temes de la biomedicina i de la bioquímica. Des de ja fa uns anys que tinc un cert interès, en general, en la biologia i la química i, d'alguns temes, també en la medicina. Però no sé ben bé encara quin és el grau universitari que vull fer i, per tant, he enfocat aquest treball cap a aquests àmbits formatius, per així endinsar-m'hi una mica més.

1.2. Agraïments

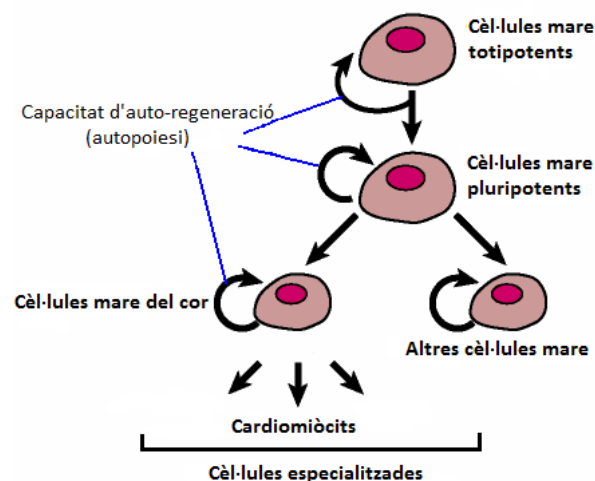
Hem de donar els principals agraïments a totes les persones que han fet possible l'elaboració de la part pràctica del meu treball. En primer lloc, agrair al Dr. Ángel Raya Chamorro, director del

CMR[B], que em va derivar al seu centre. En segon lloc, cal reconèixer la Dra. Olalla Iglesias Garcia, que és la investigadora que em va dirigir dins del centre i em va ensenyar i proporcionar totes les seves dades i el model experimental per fer aquest treball de recerca. A més, també voldria agrair a la investigadora armènia, Karine Tadevosyan, la companyia dia rere dia al laboratori i l'ajut per resoldre qüestions complexes. Gràcies a l'observació d'algunes parts d'aquest projecte d'investigació, hem pogut aprendre tota la informació necessària per poder fer aquest treball, i també construir la part pràctica. També m'agradaria molt donar-li les gràcies a la meva tutora del treball de recerca, (...), per la seva atenció i pel seu suport durant el desenvolupament del meu treball. Per últim, vull agrair de tot cor a la meva mare per la seva dedicació i, al meu pare, el director de la institució CERCA, el conjunt de centres de recerca de Catalunya.

2. Què són les cèl·lules mare?

El cos humà conté molts tipus diferents de cèl·lules que són importants per la nostra salut diària. Aquestes cèl·lules són les responsables de mantenir el nostre cos en funcionament cada dia, fan que el nostre cervell pensi; que el nostre cor bategui; que la sang es filtri als ronyons; renoven les cèl·lules de la pell quan és necessari; etc. Totes aquestes cèl·lules es diferencien entre elles per la seva funció i estructura. Totes elles tenen els mateixos gens, però cadascuna n'expressa uns de concrets. Però a part d'aquestes cèl·lules especialitzades, existeixen altres cèl·lules que no són específiques, que no tenen una funció definida. El que fan és dividir-se, i donar lloc a diferents tipus cel·lulars; les cèl·lules mare. Doncs bé, les cèl·lules mare són cèl·lules indiferenciades i aquelles que tenen el notable potencial de desenvolupar-se en totes aquestes altres cèl·lules més específiques, i per tant de derivar-ne totes les cèl·lules diferents que tenim dins l'organisme.

Aquestes cèl·lules tenen unes característiques que les diferencien de les cèl·lules somàtiques¹. Presenten molt potencial, que es defineix com la capacitat de poder esdevenir diferents tipus cel·lulars. Així doncs, com més especialitzada sigui una cèl·lula, menys potència tindrà. També tenen la capacitat d'autopoiesi que significa tenir capacitat d'auto-regeneració, és a dir, que fan com a mínim una còpia d'elles mateixes per divisió cel·lular. Així doncs, hi ha dos tipus de divisió cel·lular, que és determinada per factors externs a la cèl·lula, que no són genètics: divisió simètrica i divisió asimètrica. En la primera divisió les dues cèl·lules filles són clons de la cèl·lula mare, i en la segona, una de les cèl·lules filles és un clon de la mare i l'altra és una cèl·lula especialitzada. D'aquesta manera de les cèl·lules mare en deriven més cèl·lules mare (divisió simètrica) o bé, en deriven cèl·lules mare i cèl·lules més especialitzades (divisió asimètrica). I encara més, les cèl·lules embrionàries tenen una capacitat d'auto-renovació, de divisió infinita, mentre que les cèl·lules somàtiques són limitades.



Font pròpia

¹ Qualsevol cèl·lula que forma el cos d'un organisme pluricel·lular que no és gàmeta o cèl·lula sexual.

3. Tipologia

3.1. Segons la potència

Podem classificar les cèl·lules mare en diferents grups segons la potència. En primer lloc tenim les *cèl·lules totipotents*, que poden esdevenir tots els tipus cel·lulars del cos, incloent la placenta. Quan es crea la unió de l'espermatozoide amb l'òvul, aquests es fertilitzen i llavors creen el zigot, que es considera la cèl·lula mare per excel·lència, ja que és una cèl·lula totipotent de la qual esdevindrà tot un organisme. Doncs bé, les primeres cèl·lules que constitueixen el zigot i que per tant només les podem trobar durant les primeres hores de vida, són totipotents. A mesura que aquestes cèl·lules que formen el zigot es divideixen, també s'especialitzen i, progressivament, van perdent la capacitat d'esdevenir qualsevol tipus de cèl·lula. Per això, en segon lloc tenim les *cèl·lules pluripotents*, que es creen al blastòcit, i que ja no presenten tanta potencialitat. Poden esdevenir tots els tipus cel·lulars d'un organisme, en excepció de la placenta. El blastòcit és l'embrió de cinc dies constituït per trenta-dos cèl·lules, que està format per cèl·lules mare pluripotents. Així doncs només podem trobar cèl·lules mare pluripotents en l'embrió i únicament durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari. Són les cèl·lules amb les quals es treballa al laboratori, ja que és molt difícil aconseguir cèl·lules totipotents. A continuació, seguint l'ordre de més potencialitat a menys, trobem les *cèl·lules multipotents*, que només poden donar lloc a cèl·lules d'una determinada família. Per exemple, les cèl·lules hematopoètiques que trobem a la medul·la espinal poden esdevenir qualsevol cèl·lula sanguínia, però no poden donar lloc a altres cèl·lules d'altres famílies. Per últim, hi ha les *cèl·lules unipotents* que es troben en teixits adults i només poden donar cèl·lules iguals a elles mateixes.

3.2. Segons la localització

A més, també podem classificar totes aquestes cèl·lules mare que hem anomenat anteriorment segons la seva localització. Les *cèl·lules mare embrionàries* són les cèl·lules totipotents i pluripotents, que es divideixen infinitament. Es troben en les primeres fases de formació de l'embrió. També es poden aconseguir *in vitro* al laboratori.

D'altra banda, trobem les *cèl·lules mare adultes* que són les cèl·lules multipotents i unipotents. Es troben a partir de les dues setmanes de desenvolupament embrionari i en els teixits de l'individu adult, encara que en poca quantitat i cal recalcar que no són tant potents com les embrionàries.

3.3. Localització

Les cèl·lules mare adultes són el tipus de cèl·lula mare existents al nostre cos, les trobem pràcticament a tots els òrgans però en una proporció petita. Les cèl·lules que es van perdent dia rere dia per l'ús són reposades normalment per aquestes cèl·lules mare adultes.

Les cèl·lules mare embrionàries són diferents. Les trobem durant els primers dies de vida d'un zigot fertilitzat, concretament quan es forma l'anomenat blastocist, és a dir, el zigot que es troba en el cinquè dia del desenvolupament embrionari. El blastocist està format per cèl·lules mare pluripotents que conjuntament formen una esfera, i que provenen d'una única cèl·lula primera considerada cèl·lula mare per excel·lència: el zigot, la cèl·lula resultant de la unió de l'òvul i l'espermatozoide. En realitat, les cèl·lules mare pluripotents no existeixen al nostre cos. Com hem dit, només les podem trobar just després de la fertilització, però com que ens són molt útils, sí que les generem nosaltres al laboratori.

4. La bioètica i les cèl·lules mare

Referent a la bioètica, treballar amb cèl·lules mare embrionàries pot portar controvèrsies degut a problemes ètics, no científics.

El tema de la recerca, especialment de cèl·lules mare embrionàries, ha esdevingut un tema extremadament sensible. Això és degut a que quan es volen fer estudis en què les cèl·lules mare en són un element necessari, o bé les obtenim per destrucció d'embrions o bé les obtenim gràcies a la clonació terapèutica, és a dir, que a partir d'altres tipus específics de cèl·lules n'obtenim cèl·lules mare. Les opinions contràries als científics creuen que és èticament incorrecte i els proinvestigació diuen que poden revolucionar la medicina del futur optant per obtenir nous tractaments de malalties o fins i tot, la seva cura. Bàsicament perquè un embrió de pocs dies de vida del qual s'obtenen cèl·lules mare, per algunes persones és una bola de cèl·lules i per altres és tan humà com un nadó o un adult.

Una altra disposició de cèl·lules mare es pot donar quan una dona, després d'una fertilització *in vitro*, congela els embrions que no s'utilitzen per fecundar la dona, per a futurs procediments semblants, en el cas que els sol·licités. Al cap de 50 anys, en comptes de destruir-los, són utilitzats pels científics per experimentar. Aquest fet també s'ha dut a molts debats i fins i tot, a alguns països com els Estats Units va estar prohibit durant molt de temps.

Investigar amb cèl·lules mare adultes és útil, ja que generen menys controvèrsies. El problema és no són tan potents com les embrionàries i no poden dividir-se infinitament. Per això, no ens resulten ser gaire efectives.

Segons la bioètica s'han de respectar tres principis. En primer lloc, el principi d'autonomia o de respecte per les persones. En segon lloc, l'obligació de beneficiar o fer el bé, és a dir, el principi de la beneficència. I per últim, el principi de la justícia en què el tracte ha de ser igualitari en la distribució de cures i recursos, de beneficis i de riscos.

5. El valor de les cèl·lules mare

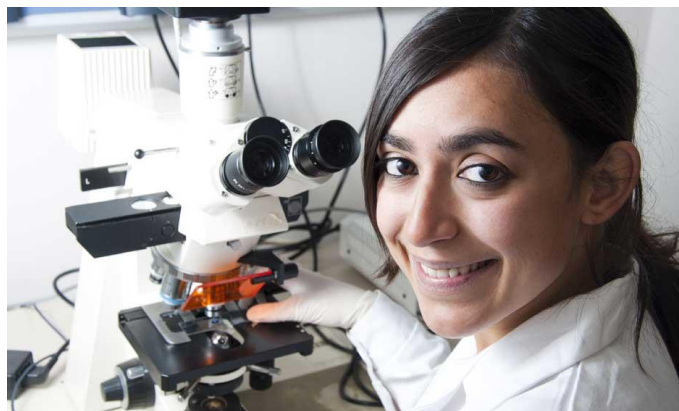
Cada any, molts científics d'arreu del món fan investigacions amb cèl·lules mare que ens informen del coneixement del cos humà relacionat amb la medicina.

Una de les vies, en què utilitzen les cèl·lules mare al laboratori, és per estudiar el desenvolupament humà. Els científics investiguen com les cèl·lules mare formen teixits i òrgans, com l'envelliment afecta la seva funció i el seu paper en diverses malalties i condicions. Una millor comprensió del funcionament intern dels organismes vius condueix a una detecció més primerenca, un millor diagnòstic i tractaments més eficaços per a malalties i lesions.

Un altre estudi és el que està relacionat amb el descobriment de fàrmacs; quin és el procés pel qual s'identifiquen nous medicaments per a una malaltia en concret. Els científics poden utilitzar cèl·lules mare o teixits creats per buscar nous fàrmacs que milloren la seva funció o alteren l'evolució de la malaltia i, també, provar com les drogues poden afectar diferents òrgans com el fetge o els ronyons.

Altres investigadors exploren com utilitzar cèl·lules mare per generar teixits que, quan es trasplantin, ocuparan el lloc dels teixits danyats per malalties, envelliment o lesió. Per exemple, s'està provant en assaigs clínics, de substituir les cèl·lules danyades o perdudes durant la degeneració per cèl·lules epitelials retinals sanes de l'ull, per mitjà d'un trasplantament. A més, també existeixen altres estudis per la autoestètica. Alguns investigadors estan explorant maneres d'estimular l'autoreparació, incrustant les cèl·lules sanes per curar el teixit malmès o evitar-ne un major dany.

La investigació amb cèl·lules mare té un gran compromís pels tractaments mèdics, però els científics encara tenen molt a veure sobre com les cèl·lules mare i les cèl·lules especialitzades que generen treballen dins del cos humà i quina és la seva capacitat de cura.



Font: "A closer look at stem cells"

6. Els factors de Yamanaka i les cèl·lules iPS

Durant molt de temps els científics s'han preguntat quins són els elements que fan que les cèl·lules mare tinguin aquesta capacitat de generar qualsevol tipus cel·lular i es puguin mantenir en estat "immadur".

Al 2006, l'investigador japonès, Shinya Yamanaka, va fer un descobriment sorprenent que el va portar a guanyar el premi Nobel en medicina tan sols sis anys després. Va trobar una nova manera de "reprogramar" cèl·lules especialitzades adultes per convertir-les en cèl·lules mare. Aquestes cèl·lules mare de laboratori són pluripotents, és a dir, que poden donar lloc a qualsevol altre tipus de cèl·lula del cos i no serien rebutjades pel sistema immunitari que les reconeixeria com a pròpies. Així doncs, aquestes cèl·lules adultes que siguin reprogramades al laboratori per un seguit de factors i que gràcies a aquests factors tinguin un potencial pluripotent, s'anomenen cèl·lules mare pluripotents induïdes o cèl·lules iPS. El descobriment de Yamanaka significa que qualsevol cèl·lula del cos en divisió pot ara convertir-se en una cèl·lula mare pluripotent.

Llavors, com s'obtenen aquestes cèl·lules iPS? Yamanaka va afegir quatre factors de transcripció a cèl·lules de la pell provinents de ratolins. Aquest fet va iniciar un procés a l'interior de les cèl·lules anomenat reprogramació i, en un període prou curt, les cèl·lules de la pell es van transformar en cèl·lules mare pluripotents. Actualment també podem fer-ho en cèl·lules humanes, afegint aquests famosos factors de transcripció coneguts com els factors de Yamanaka.

Les cèl·lules iPS i les cèl·lules embrionàries(ES) són bastant similars. Són capaces de renovar-se en elles mateixes, poden dividir-se i produir còpies de si mateixes indefinidament, és a dir, tenen la capacitat d'auto-renovació. Ambdós tipus de cèl·lules mare poden ser utilitzades per obtenir qualsevol tipus de cèl·lula especialitzada sota unes condicions controlades al laboratori. Tanmateix, obtenir cèl·lules IPS no depèn de l'ús de cèl·lules d'un embrió, tret que si que requereixen les cèl·lules ES. A més, alguns dels gens de les cèl·lules IPS es comporten de manera diferent dels altres gens que trobem en les cèl·lules mare embrionàries. Això és degut a la reprogramació incompleta de les cèl·lules o als canvis genètics adquirits per les cèl·lules IPS quan creixen i es multipliquen. Aquest és un desavantatge, que pot afectar l'ús de cèl·lules IPS en investigacions i aplicacions clíniques. És necessària una investigació més exhaustiva per entendre com es produeix la reprogramació dins de la cèl·lula.

Els factors de Yamanaka són exactament els següents factors: Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc. Són factors o proteïnes que regulen l'expressió d'una sèrie de gens, que són molt actius en les cèl·lules mare embrionàries.

El c-Myc és un factor de transcripció que regula una sèrie de gens implicats principalment en la proliferació i la replicació de l'ADN. A més, aquest factor és el responsable de la transformació cancerígena i també actua en la generació de cèl·lules iPS. Sox2 és un factor que es converteix en un

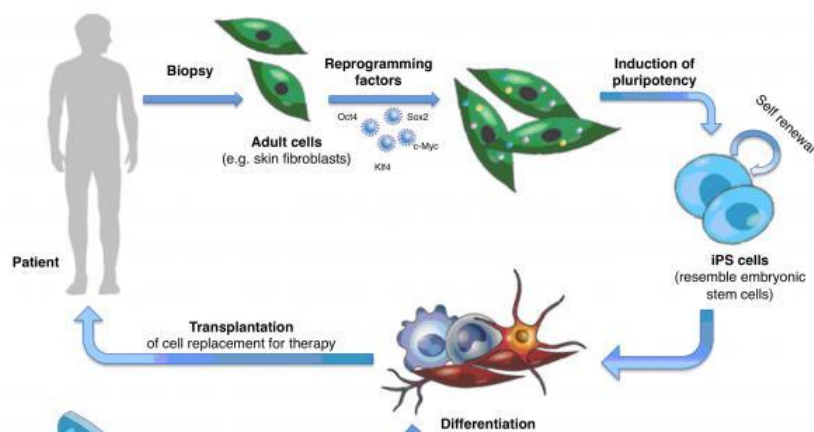
altre factor Oct4 i, junts, són importants per a l'activació de gens necessaris per al manteniment de cèl·lules mare. L'expressió Sox2 s'activa a les cèl·lules que han aconseguit reprogramar-se amb èxit, tot i que alts nivells de Sox2 tenen efectes perjudicials durant la reprogramació. Els nivells fluctuants de Klf4 poden reflectir l'estat de diferenciació de cèl·lules malignes i, per tant, són molt necessaris per veure si el procés està sota control. El paper de Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc en el procés de reprogramació és activar la xarxa reguladora de gens de la pluripotència. Quan analitzem els estudis globals de cèl·lules sotmeses a reprogramació, es veu una situació similar a la observada en les cèl·lules ES.

7. Part pràctica experimental

Aquesta pràctica experimental la vaig dur a terme el mes de juliol de 2017 al Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona. El CMR[B] és un centre que pertany a la institució CERCA, d'investigació científica en medicina regenerativa i cèl·lules mare, creat l'any 2004, que treballa a nivell europeu i té com a missió bàsica investigar amb cèl·lules mare pluripotents humanes, així com en diferents models animals per a investigar la regeneració de teixits i òrgans i treballar perquè aquests avenços puguin traslladar-se aviat a l'aplicació clínica.

En el meu cas concret, en la part pràctica experimental, hem observat com es duu a terme el procés de diferenciació de cardiomiòcits a partir de cèl·lules mare pluripotents induïdes *in vitro* en un laboratori, que forma part d'un estudi que investiga la regeneració d'un cor humà després d'haver patit un infart agut de miocardi. Breument, podem dir que aquestes cèl·lules mare pluripotents induïdes les obtenim per mitjà d'una biòpsia de pell humana o també per extraccions de prepuci humà, que en aquestes cèl·lules de la pell hi trobem unes cèl·lules del teixit conjuntiu, els fibroblasts, que són les cèl·lules que escollim per convertir-les en iPS. Les extraccions de prepuci són bastant usuals en homes que pateixen fimosi i és per això que, d'aquest teixit, en tenim més disposició i per tant, s'utilitza més als laboratoris.

Després de reprogramar els fibroblasts i d'obtenir-ne cèl·lules iPS, les cultivem i comencem a diferenciar-les fins a arribar a tenir els cardiomiòcits, que en un futur podran ser trasplantats a la clínica com a tractament terapèutic.



Font: "The Fountain of Youth: Induced Pluripotent Stem Cells"

7.1. Model experimental *in vitro*

El model experimental *in vitro* és el model que s'utilitza en els cultius de cèl·lules a un laboratori, com és el cas del cultiu de cèl·lules iPS i posteriorment el del procés de diferenciació a cardiomiòcits.

Aquest model consisteix, principalment, en mostres biològiques de cèl·lules, teixits o molècules que són estudiades fora del seu organisme biològic normal, és a dir, que han estat extretes d'un organisme major per ser estudiades en un laboratori artificialment.

És necessari utilitzar models *in vitro* a l'inici d'un estudi preclínic, ja que permeten als investigadors treballar amb mostres que no presenten cap problema ètic per a la societat, com a vegades ho fan els experiments realitzats amb animals. A més a més, són molt econòmics. També tenen l'avantatge que es pot controlar la diferenciació cap a un tipus cel·lular concret segons l'estudi. També es pot observar l'afectació d'allò que s'està estudiant directament sobre les cèl·lules, sense la necessitat d'haver de controlar altres factors que podrien interferir en un organisme viu, que és una tasca molt més complexa. Tot i així, l'inconvenient que tenen aquest tipus de models és que no presenten les mateixes característiques que els futurs pacients que rebran el tractament que s'està estudiant, així que no es pot comparar totalment una mostra d'un model *in vitro* amb un organisme viu.

En una mostra tan petita com la dels models *in vitro* no és possible produir-hi el procés de regeneració d'un cor humà, així doncs només es poden observar processos de diferenciació i estudiar les seves característiques, tan del procés de diferenciació com dels cardiomiòcits afectats a causa d'un atac de cor. Evidentment tampoc podrem comprovar si finalment aquests cardiomiòcits obtinguts al laboratori seran o no rebutjats pel cor que els rebrà, ja que als laboratoris es treballa a nivell molecular i cel·lular i no pas a nivell de tot un òrgan.

Tot i així, aquests models no són capaços d'englobar la complexitat d'una regeneració d'un cor humà, i per això suposen un primer pas en la recerca a l'hora d'experimentar per a nous tractaments en aquest àmbit.

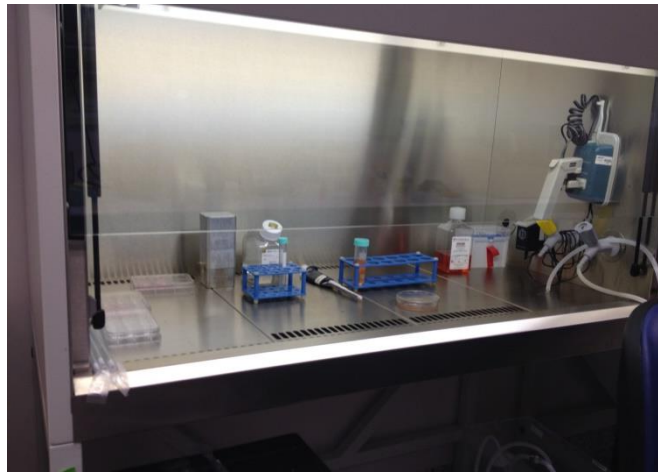
7.2. La importància de l'esterilitat al laboratori

En el laboratori hem de mantenir-nos estèrils per assegurar que els experiments es duen a terme en condicions de contaminació mínima i que, per tant, els processos experimentals siguin de seguretat màxima i creïbles. En el CMR[B] es duen a terme un seguit de normes per mantenir una bona esterilitat als laboratoris biomoleculars. És per aquest motiu que quan entrem al laboratori ens hem de lligar els cabells, ens hem de posar una bata neta i uns guants nets cada dia. En ocasions de màxim risc de contaminació hauríem de portar una mascareta, un gorro de cel·lulosa i uns peucs. Tots els experiments els farem dins d'unes cambres de flux laminar que permeten treballar en condicions d'esterilitat correcta i asèpsia, la qual cosa és necessària per evitar contaminacions.

Tot el material que utilitzem està precintat en paquets estèrils i tots els residus resultants els dipositarem en papereres de reciclatge sanitari que són renovades, normalment, tres cops per setmana. El material precintat l'obrirem sempre dins la cambra de flux laminar per no arrossegar

contaminació de l'exterior. Tots els cultius cel·lulars es guarden dins d'unes incubadores que es troben en unes condicions de 37°C i amb un subministrament del 5% de CO₂ perquè les cèl·lules es trobin en les mateixes condicions que el cos humà. No es poden obrir gaire sovint aquestes cambres, simplement, perquè no hi hagi moviments continus de molècules de l'aire. A més, el laboratori conté altres aparells com, per exemple, una cambra frigorífica que es troba a 4°C i un congelador a -20°C que s'utilitzen per preservar totes les substàncies i dissolucions necessàries pels processos experimentals. I un congelador que es troba a -80°C amb nitrogen líquid per guardar les soques de cèl·lules.

Un cop acabats els experiments, netegem amb etanol concentrat al 70% la cambra de flux laminar que s'ha fet servir i tot seguit, tanquem la cambra i engeguem durant uns cinc minuts els rajos UVA perquè acabin d'eliminar els microorganismes que puguin haver-hi a dins.



Font pròpia

7.3. Protocol convencional del CMR[B]

Com hem dit anteriorment, és difícil disposar de cèl·lules ES per a tants experiments en malalties i pacients diferents, cosa que també crea certs problemes ètics. Una forma d'evitar aquestes dificultats, és induir l'estat pluripotent en cèl·lules somàtiques mitjançant la reprogramació directa i obtenint cèl·lules iPS. Aquest tipus cel·lular és molt semblant a les cèl·lules ES en morfologia, proliferació i expressió genètica. A més, són comparables a les cèl·lules ES humanes en el seu potencial de diferenciació *in vitro*. És per tots aquests motius que utilitzarem aquestes cèl·lules per fer aquest procés experimental al laboratori.

La part pràctica d'aquest treball es basa en l'observació d'un procés de diferenciació cel·lular al laboratori, és a dir, com una cèl·lula mare induïda pluripotent acaba esdevenint un cardiomiòcit.

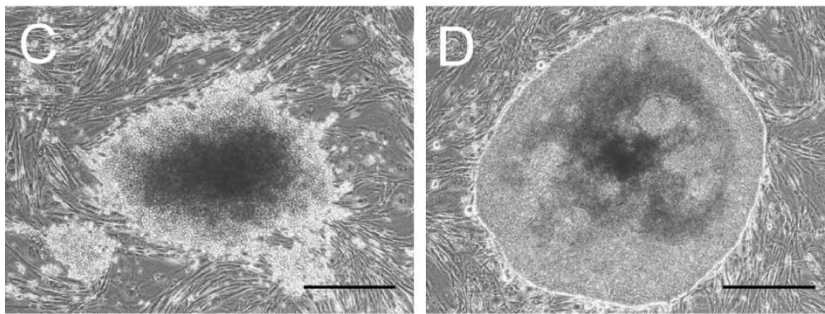
Aquest procés tracta, primer, de l'obtenció de cèl·lules d'una biòpsia de pell d'un pacient, que s'han de cultivar per obtenir-ne la quantitat adequada i la mida òptima i afegint-hi uns factors concrets de gran importància, els factors de Yamanaka, esdevindran cèl·lules amb un potencial pluripotent. És per això que gràcies a aquests factors podem anomenar cèl·lules mare a aquestes cèl·lules resultants ja que són potencialment pluripotents, i també són induïdes ja que les hem obtingut a partir de fibroblasts, cèl·lules pròpies del teixit conjuntiu.

7.3.1. La reprogramació

La primera part del procés experimental és la reprogramació, no és cap procés de diferenciació, sinó de desdiferenciació i que ens permet convertir qualsevol cèl·lula del cos en una cèl·lula mare pluripotent.

En primer lloc, agafem una biòpsia de prepuci humà d'un pacient i en separem i extraïem els fibroblasts. En aquestes cèl·lules del teixit conjuntiu s'hi afegeixen els quatre factors de transcripció de Yamanaka, que són els següents: Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc. El paper de Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc en el procés de reprogramació és activar la xarxa reguladora de gens de la pluripotència.

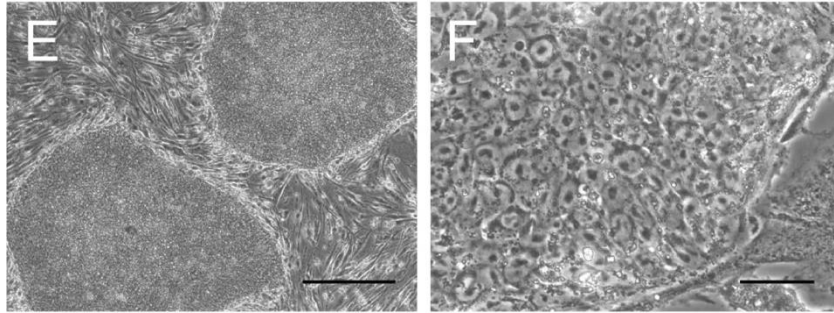
En aquests cultius hi anem afegint enzims variats i medis nutritius perquè les cèl·lules puguin anar creixent i desenvolupant-se correctament. Aproximadament dues setmanes després, es presenten algunes colònies granulades que no són semblants a les colònies que fan les cèl·lules ES (imatge lletra C). Però al voltant del vint-i-cinquè dia ja podem observar colònies planes i que algunes s'assemblen a les colònies que fan les cèl·lules ES (imatge lletra D).



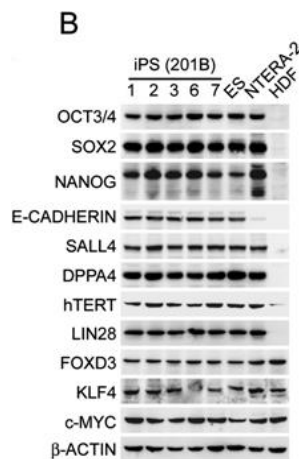
Font: *"Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors"*.

El trentè dia, podem escollir aquestes colònies de morfologia semblant a les ES i les desglossem i aboquem en diferents plaques de petri per a cultivar-les. Podem observar com els cultius es van expandint i, cada vegada més, es van formant colònies ben plenes (imatge E). Cada cèl·lula exhibeix

un gran nucli, un citoplasma escàs (imatge F), presència d'antígens específics², nivells d'expressió de certes proteïnes (imatge B) i d'altres trets morfològics, que també s'observen en cèl·lules mare embrionàries.



Font: "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors".

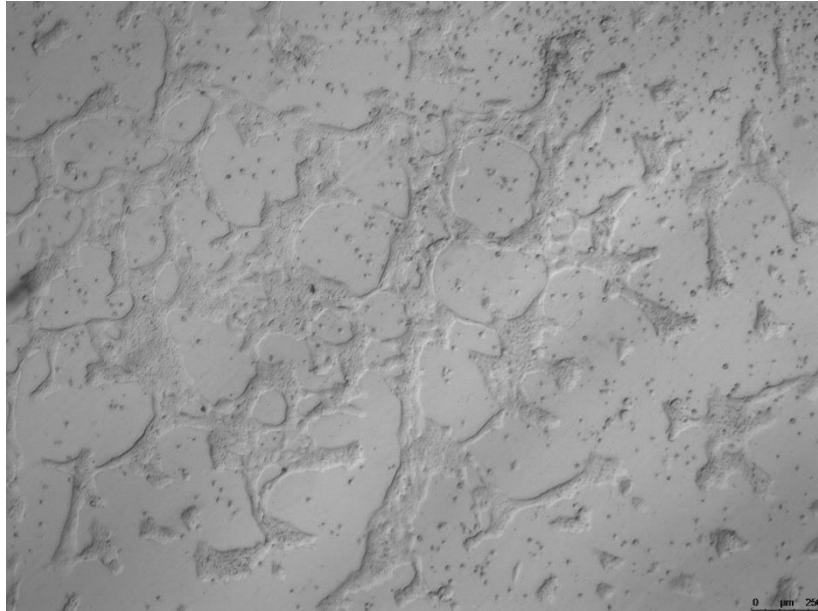


Font: "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors".

A més, aquestes cèl·lules mantenen un estat indiferenciat i amb grau elevat de potencialitat, i estan submergides dins les plaques de petri recobertes de Matrigel. Aquesta substància proteica s'utilitza com a matriu extracel·lular universal. La majoria de cèl·lules del nostre cos estan envoltades per una matriu extracel·lular, és a dir, una capa que es troba entre cèl·lula i cèl·lula dels teixits del cos i les manté unides donant-t'hi consistència, elasticitat i resistència. Al laboratori, perquè les cèl·lules es trobin en les mateixes condicions que dins de l'organisme, usem el Matrigel com a matriu

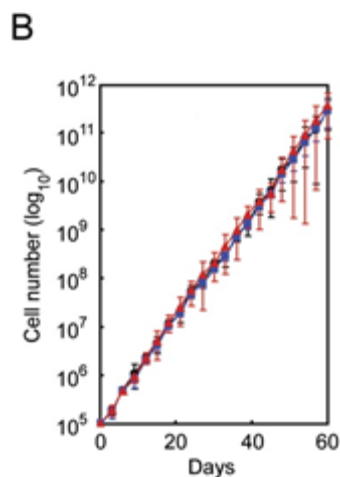
² molècules que hi ha a la superfície de la cèl·lula que amb microscòpia de fluorescència i amb determinats anticossos es poden reconèixer

extracel·lular. Atès que aquestes cèl·lules resultants presenten les característiques de les cèl·lules mare embrionàries, podem considerar que hem obtingut cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPS).



Font pròpia

Aquestes cèl·lules iPS proliferen i s'auto-regeneren exponencialment com a mínim durant quatre mesos (gràfic lletra B).



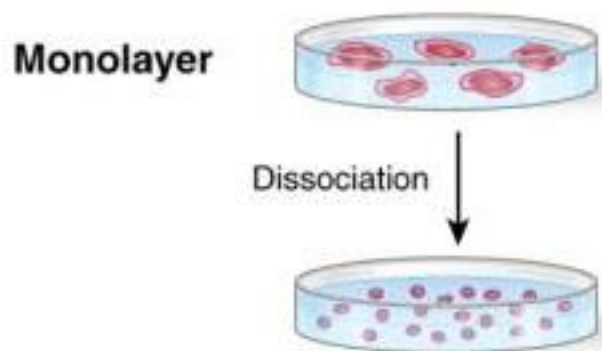
Font: "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors".

El procés de generació de iPS és un procés llarg perquè des de l'obtenció de la biòpsia fins la generació i caracterització de les cèl·lules transcorren sis mesos. Tot seguit, es dur a terme el procés

de diferenciació a un tipus cel·lular específic de l'organisme, que és exactament el que vaig observar i contribuir a fer durant l'estada al CMR[B]. La durada de la diferenciació és aproximadament de tres setmanes, més una setmana prèvia de preparació de les cèl·lules iPS, és a dir, d'un mes en total.

7.3.2. La diferenciació

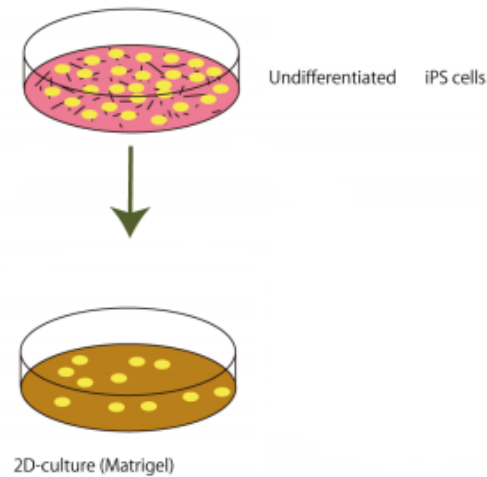
Primer de tot, agafem les cèl·lules iPS humanes amb pluripotència. Les haurem d'incubar 1 hora amb la disposició de 10 μ M d'una substància inhibidora anomenada ROCKinhibidor. També haurem de dissociar les cèl·lules en cèl·lules individuals. Ho farem amb l'ajuda d'una solució anomenada Accutase, a 37°C durant vuit minuts, la funció de la qual és facilitar la separació d'uns enzims concrets i que, per tant, separa les cèl·lules de les plaques de petri. El que fa el ROCKinhibidor és incrementar la supervivència de les cèl·lules quan es dissocien en cèl·lules individuals evitant l'apoptosi induïda per dissociació (anoikis), és a dir, la mort cel·lular programada, augmentant així la seva eficiència de clonació. Quan hem acabat de dissociar-les, les observem pel microscopi òptic a diferents augments per veure si ho hem fet correctament.



Font: *"Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview"*.

A continuació, les dipositem en 12 pouets a una densitat de 1.5 milions de cèl·lules per pouet, amb Matrigel. Com hem dit, està format per una barreja de proteïnes d'aspecte gelatinós i s'utilitza com a matriu extracel·lular.

Figure 2



Font: *"iPS cells: A source of cardiac regeneration"*

En aquests plats de cultiu hi afegim un nutrient anomenat mTeSR1 amb un suplement de 10 μ M de ROCKinhibidor perquè les cèl·lules puguin estar ben nodrides i d'aquesta manera aconseguir que creixin fins a la mida desitjada. Tornem a mirar pel microscopi tots els cultius, bàsicament, per veure l'evolució de les cèl·lules. Aquest dia el considerarem el -4/-3, abans de la diferenciació cap a cardiomiòcits.



Font pròpia

Seguidament, del dia -3 al -1, és a dir, els dos dies següents, el que haurem de fer és canviar el medi mTeSR1 una vegada al dia, ja que les cèl·lules necessiten alimentar-se cada dia per poder créixer correctament. Doncs bé, aquest medi és un dels aliments específics que s'utilitza per alimentar les cèl·lules iPS. Primer de tot, retirem el medi vell o medi del dia anterior amb un tub de làtex que està

connectat a una aspiradora i que, per tant, si li afegim una pipeta de Pasteur a l'extrem lliure del tub i l'acostem a una vora de la placa de cultiu, sense tocar directament les cèl·lules, podrem aspirar el medi i llavors, amb una altra pipeta hi afegim el nou medi. Si apropéssim l'aspiradora directament a les cèl·lules es desenganxarien i, en conseqüència, les perdríem. Quan hàgim acabat aquest pas, les tornem a mirar a través del microscopi.



Font pròpia

El dia 0 és un dels dies més importants. En primer lloc, perquè cada pas del procés s'ha de fer exactament en el moment que s'indica ja que sinó pot haver-hi perill de que l'experiment no sigui exitós. I en segon lloc perquè és el moment que comencem a diferenciar les cèl·lules iPS en cardiomiòcits. Això significa que al mateix temps que les cèl·lules es van diferenciant, també van perdent potencialitat. Les substàncies inhibidores que hi afegim, com és el cas del ROCKinhibidor, el que fan és inhibir les funcions dels enzims que necessiten les iPS i que els cardiomiòcits ja no requeriran posteriorment. Per tant, alguns gens canvien el seu patró d'expressió.

Primer de tot, les cèl·lules iPS han d'estar en confluència del 90-95%. S'ha d'apreciar una monocapa compacta de cèl·lules abans de tractar-les amb CHIR99021, una altra substància inhibidora que proporciona una forta diferenciació cardíaca. Tot seguit, canviem el medi del dia anterior per medi específic de diferenciació cardíaca anomenat RPMI. Aquest medi conté un suplement de B27, una substància que inicia la inducció de precursors cardíacs. També conté un 1% de glutamax i un 1% d'aminoàcids no essencials, dos suplementes que augmenten l'estabilitat, viabilitat i creixement de les cèl·lules. Un altre complement que porta és 0,1mM de 2-mercaptoethanol que conté 10 μ M de CHIR99021. El 2-mercaptoethanol és un agent reductor i molt potent utilitzat en els mitjans de cultiu cel·lular per evitar nivells tòxics. Aquestes cèl·lules han d'estar 24 hores en incubació. El temps comença a comptar just en el moment que acabem de inserir totes aquestes substàncies en les plaques de cultiu.



Tramuntana00
Les cèl·lules mare

Font pròpia

A partir d'aquí les cèl·lules iPS es començaran a especialitzar fins a arribar a esdevenir cardiomiòcits.

Durant el dia 1 de diferenciació cardíaca, agafem les cèl·lules i les cultivem en plaques de petri que contenen Matrigel. Com hem dit anteriorment, el Matrigel és una matriu extracel·lular universal que dóna consistència, elasticitat i resistència a les cèl·lules. D'aquesta manera les cèl·lules es troben en les mateixes condicions que dins del cos humà. També hi afegim medi mTeSR1 per alimentar les cèl·lules. Les cèl·lules han d'estar en una confluència del 80-90% durant els dos primers dies de diferenciació.

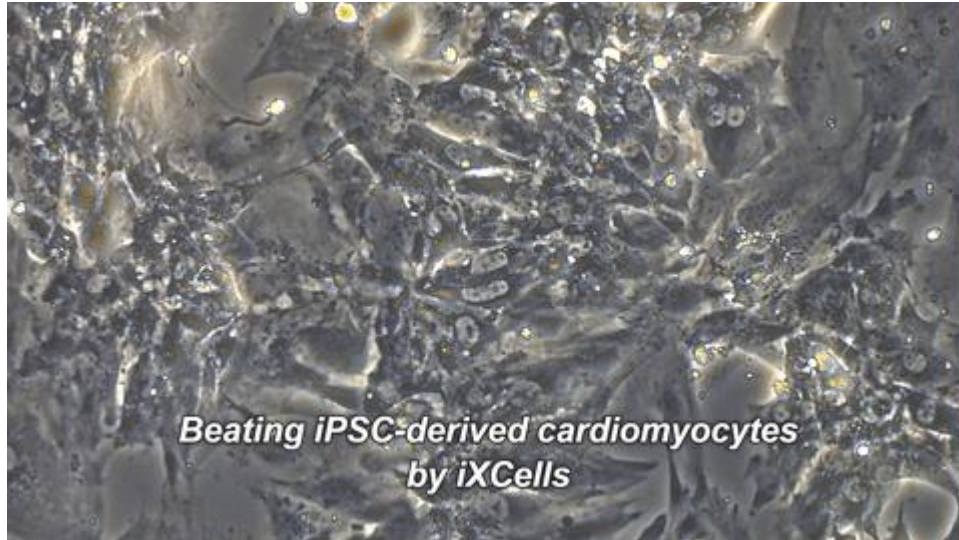
Traiem les cèl·lules de la incubadora passades les 24 hores d'incubació i els hi canviem el medi nutritiu. Per fer-ho, inclinem les plaques de petri i amb una pipeta connectada al tub de làtex i connectada també a l'aspiradora, xuclarem el medi del dia anterior. Tot seguit, netejarem el cultiu amb PBS perquè quedin només les cèl·lules vives que estan adherides a la matriu i a la placa i gràcies a aquest líquid transparent aconseguirem treure les cèl·lules mortes i els residus que es troben en suspensió. Així doncs, a les plaques de cultiu hi quedaran únicament les cèl·lules en diferenciació amb el medi nutritiu.

En el tercer dia de diferenciació cardíaca, setanta-dues hores després d'haver fet el tractament del CHIR99021, hem de tractar les cèl·lules amb 5 mM de Wnt inhibidor IWP4 juntament amb 1ml de RPMI/B27-insulin. Hem de mantenir el medi sense canviar-lo durant dos dies.

En el cinquè dia de diferenciació, hem de canviar el medi RPMI/B27-insulin vell per més de nou. Concretament, afegim 2ml de medi per pouet. Entre medi i medi, netejarem les plaques de petri amb PBS. Llavors, posem els cultius a la incubadora a 37°C i 5% CO₂.

Durant el setè dia hem de canviar el medi vell i afegir-hi 2ml de nou medi RPMI per pouet, que contingui un suplement de B27. Aquest medi d'alimentació cel·lular s'ha de canviar cada dos dies a partir d'aquest moment.

El dotzè dia obtenim contraccions espontànies fortes i rítmiques que es veuen a través del microscopi òptic a 100 augments i també presenten trets morfològics característics del miocardi, la qual cosa significa que les cèl·lules que observem són cardiomiòcits. L'eficàcia del batec es comprova amb anàlisis elèctrics als cardiomiòcits obtinguts. Aquestes cèl·lules ja es consideren a punt per a una possible aplicació clínica.



Font: *Beating iPSC-derived cardiomyocytes by iXCells*, accessible a:
<http://www.ixcellsbiotech.com/Human-iPSC-derived-Cardiomyocytes>

8. Conclusió

Després de tota la informació sintetitzada a la part teòrica del treball i l'experimentació de la part pràctica, podem constatar que la nostra hipòtesi prèvia era correcta però força incompleta.

Inicialment, creïem que l'obtenció de cardiomiòcits des d'un altre teixit del cos humà era possible, però ara sabem que hi ha molts altres factors que hi influeixen i que la seva participació n'és imprescindible, com és el cas dels factors de Yamanaka. Sense aquests quatre factors de transcripció no seria possible obtenir les cèl·lules iPS i, per tant, no hi hauria diferenciació. A més a més, ara sabem que tots els inhibidors que afegim durant la diferenciació inhibeixen les funcions dels enzims necessaris de les cèl·lules iPS i, en conseqüència, inicien una forta diferenciació cardíaca.

També ens hem adonat de la importància que té la realització d'estudis preclínics amb models experimentals per tal de crear noves teràpies per afavorir la recuperació posterior a un episodi d'isquèmia cardíaca, perquè és una de les cardiopaties més freqüents en la societat actual. Els cardiomiòcits generats per cèl·lules iPS poden constituir la base d'una teràpia contra la isquèmia cardíaca. I amb més investigació i estudis complementaris podrien, en un futur, ser una teràpia efectiva per valorar el possible rebuig per histocompatibilitat de les cèl·lules que s'introdueixen a l'organisme afectat per la patologia.

D'altra banda, hem vist que els cardiomiòcits són a punt per una aplicació clínica quan ja poden bategar tal com fan les cèl·lules humanes del teixit cardíac. També hem observat que es comproven els trets morfològics característics del miocardi i l'eficàcia del batec per assegurar-nos que el que hem obtingut són realment cardiomiòcits.

A més a més, voldria afegir un comentari respecte els donants de teixits i cèl·lules per a experiments científics. Crec que són absolutament necessaris per dur a terme teràpies basades en medicina regenerativa i que sense les donacions, moltes investigacions no podrien avançar en el camp de la recerca i s'alentiria molt la descoberta de noves teràpies. Sincerament, els estudis de medicina regenerativa aporten solucions a malalties fins ara de difícil solució reconstituïnt els òrgans o teixits patològics. La seva optimització serà una solució neta i efectiva per a una gran quantitat de patologies i malalties rares o minoritàries.

Des del meu punt de vista, els laboratoris de biologia molecular del CMR[B] són espais dotats de maquinària d'alta tecnologia i d'un equip de professionals amb un nivell de coneixements científics elevadíssim. Va ser un plaer poder-hi anar i contribuir-hi.

La meua perspectiva de futur és bàsicament continuar formant-me a nivell universitari en temes de recerca científica en l'àmbit de la salut. Em fascina veure com, per exemple, les cèl·lules mare poden revolucionar la medicina aportant un possible tractament o, fins i tot, la cura d'una malaltia.

Finalment, puc dir que mai havia fet una recerca tan àmplia en tota la meua vida, he vist com és realment la biomedicina clínica i, a poc a poc, aquest treball m'ha fet veure amb uns altres ulls el món de la investigació científica.

9. Bibliografia i webgrafia

- CENTRE DE MEDICINA REGENERATIVA DE BARCELONA (CMR[B]). *Diferenciació de cardiomiòcits de cèl·lules ES humanes* [en línia]. Accessible a: https://www.cmrb.eu/centre-investigacio/ca_projectes3.html Consulta: 27-06-2017
- INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESEARCH (ISSCR). *A closer look at Stem Cells* [en línia]. Accessible a: <http://www.isscr.org/about-stem-cells#acloserlookatstemcells> Consulta: 5-11-2017
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *Medline plus. Stem cell information* [en línia]. Accessible a: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/1.htm> Consulta: 14-07-2017
- TAKAHASHI, Kazutoshi et al. "Induction of pluripotent stem cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors", dins *Molecular cell*, núm, 131, 2007, pg. 861-872.
- THE NICHE. *Què són les cèl·lules mare?* [en línia] Accessible a: <https://ipscell.com/que-son-les-cel%C2%B7lules-mare/> Consulta: 3-08-2017.
- U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. *Medline plus. Stem cells* [en línia]. Accessible a: <https://medlineplus.gov/stemcells.html> Consulta: 22-11-2017
- MUMMERY, Christine L. et al. "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview", dins *Circulation research*, núm 111, 2012, p. 344-358.
- YOSHIDA, Yoshinori et al. "iPS cells: A source of cardíac regeneration", dins *Journal of molecular and cellular cardiology*, núm. 50, 2011, p. 327-332.
- SHIBA, Yuji et al. "Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts", dins *Springer Nature*, núm. 538, 2016, p. 388-391.

- ROBINTON, Daisy et al. "The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy", dins *Springer Nature*, núm. 481, 2012, pg. 295-305.
- RAYA, Ángel et al. *Células madre mesenquimatosas: biología y potenciales usos clínicos. Informes, estudios y documentos*. Madrid: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, 2003.
- Real Televisión Española (RTVE). *Lab24. Entrevista: Ángel Raya i Anna Veiga*. 24h. 1-12-2015.