

ÍNDEX

1. Introducció

Antecedents

2. Malalties Cardiovasculars	.8
2.1. Primera causa de mortalitat	.8
2.2. Factors de risc	
2.2.1. Modificables	.10
2.2.2. No modificables	.13
2.3. Principals malalties cardiovasculars	
2.3.1. Cardiopatia isquèmica	.15
2.3.1.1. Infart de miocardi	.15
2.3.1.2. Angina de pit	.15
2.3.1.2.1. Angina de Prinzmetal	.16
2.3.1.2.2. Angina de Decúbit	.16
2.3.2. Pericarditis	.16
2.3.2.1. Síndrome de Dressler	.17
2.3.3. Accident Vascular Cerebral (AVC)	.17
2.3.3.1. Isquèmic	.17
2.3.3.2. Hemorràgic	.18
2.3.4. Claudicació Intermitent	.19
2.3.5. Aneurisma de l'Aorta	.19
2.3.6. Colitis isquèmica	.20
3. Infart de Miocardi	.20
3.1. Síntomes	.21
4. Tècniques regeneració teixit infartat	.23
4.1. Transplantaments	.23
4.1.1. Transplantament de cor	.25
4.2. Medicina Regenerativa	.28
4.2.1. Regeneració Cardíaca	.29
4.2.1.1. Cèl·lules Mare	.32
4.2.1.1.1. Cèl·lules mare adultes	.35

4.2.1.1.1.1.	Cèl·lules mare de la medul·la.	.37
4.2.1.1.1.2.	Cèl·lules del teixit esquelètic (mioblasts)	.40
4.2.1.1.1.3.	Cèl·lules mare del propi cor	
4.2.1.1.1.3.1.	CMPCs	.41
4.2.1.1.1.3.2.	Cardiac ATDPCs	.44
4.2.1.1.1.3.3.	Sub ATDPCs	.46
4.2.1.1.2.	Cèl·lules mare embrionàries	.47
4.2.1.2.	Tècniques d'implantació cel·lular.	.49

Estudi del creixement de cultius de cèl·lules mare adultes del cor i de la diferenciació cel·lular destinada a la teràpia de regeneració de l'infart cardíac.

5. Material i mètodes

5.1. Protocols aïllament cel·lular

5.1.1.	Protocol aïllament Sub ATDPCs i Cardiac ATDPCs	.52
--------	--	-----

5.1.2.	Protocol aïllament CMPCs	.57
--------	--------------------------	-----

5.2.	Protocol de trisinització de les cèl·lules mare	.58
------	---	-----

5.3.	Protocol congelació de les cèl·lules mare	.62
------	---	-----

5.4.	Protocol de descongelació de les cèl·lules mare	.63
------	---	-----

5.5. Medis

5.5.1.	Medi de cultiu	.67
--------	----------------	-----

5.5.2.	Medi de congelació.	.68
--------	---------------------	-----

6. Corba de creixement cel·lular

6.1.	Objectiu	.69
------	----------	-----

6.2.	Hipòtesi	.69
------	----------	-----

6.3.	Material	.70
------	----------	-----

6.4. Procediment

6.4.1.	Descongelació de cèl·lules	.70
--------	----------------------------	-----

6.4.2.	Sembra de cèl·lules	.71
--------	---------------------	-----

6.4.2.1.	Recompte de cèl·lules	.72
----------	-----------------------	-----

6.4.3.	Recollida de mostra dels pouets	.76
--------	---------------------------------	-----

6.5.	Càlculs	.83
------	---------	-----

6.6. Resultats

6.6.1.	Imatges de la corba de creixement	.84
--------	-----------------------------------	-----

6.6.2.	Corba de creixement	
6.6.2.1.	Introducció	.86
6.6.2.2.	Explicació dades	.87
6.6.2.3.	Corba de creixement SubsATDPCs	.88
6.6.2.4.	Corba de creixement CMPCs P.4	.90
6.6.2.5.	Corba de creixement cardiacATDPCs	.92
6.6.2.6.	Corba de creixement CMPCs P.8	.94
6.7.	Discussió	.96
6.8.	Conclusions	.98
7.	Diferenciació de les cèl·lules mare	
7.1.	Objectiu	.99
7.2.	Hipòtesi	.99
7.3.	Material	.99
7.4.	Procediment	
7.4.1.	Descongelació de les cèl·lules	.100
7.4.2.	Càlculs anteriors a la sembra de les cèl·lules	.101
7.4.3.	Sembra de les cèl·lules	.102
7.4.4.	Canvis de medi	.102
7.4.5.	Fixació i tinció dels cultius cel·lulars	
7.4.5.1.	Fixació	.106
7.4.5.2.	Tinció	.107
7.4.5.2.1.	Adipogènica	.107
7.4.5.2.2.	Condrogènica	.107
7.4.5.2.3.	Osteogènica	.108
7.5.	Resultats	
7.5.1.	Imatges de la diferenciació mitjançant el microscopi	.108
7.5.1.1.	cardiacATDPCs P.8	.110
7.5.1.2.	subATDPCs P.8	.112
7.5.1.3.	CMPCs P.6	.115
7.5.2.	Imatges de la tinció	
7.5.2.1.	Diferenciació Adipogènica	.117
7.5.2.2.	Diferenciació Osteogènica	.119
7.5.2.3.	Diferenciació Condrogènica	.121

7.6. Discussió123
7.7. Conclusions124
8. Conclusions del treball125
9. Bibliografia127

Annexos

10. Annexos	
10.1. Càlculs de la Corba de Creixement cel·lular128
10.2. Entrevistes als membres del grup de recerca ICREC	
10.2.1. Introducció141
10.2.2. Objectius141
10.2.3. Conclusions143
10.2.4. Entrevistes del Grup de Recerca ICREC150
10.3. Glossari173
10.4. Glossari Material Laboratori176

1. INTRODUCCIÓ

El títol del treball és “Teràpia regenerativa de l’infart cardíac: estudi del creixement i la diferenciació de cèl·lules mare adultes del cor”. Hem escollit aquest títol perquè creiem que és el que reflexa millor el tema del treball ja que es tracta de fer una recerca sobre la possible aplicació de les cèl·lules mare per a la cura de la cicatriu originada per l’infart de miocardi.

El tema ha estat escollit perquè realment ens cridava molt l’atenció. A que és degut que aquestes cèl·lules tinguin la capacitat de regenerar determinats teixits del nostre organisme? Què fa que es diferenciïn en un tipus de cèl·lules especialitzades o unes altres? Una gran quantitat de preguntes se’ns van plantejar i vam pensar que realitzant aquest treball de recerca tindríem l’oportunitat d’aprofundir en aquest tema que a l’aula només havíem treballat de manera superficial.

Actualment, les cèl·lules mare encara no s’utilitzen en humans per a guarir les malalties degeneratives però es creu que en un futur proper aquesta tècnica podria ser una solució viable. Així, volíem informar-nos sobre quines propietats caracteritzen a aquestes cèl·lules i fan que siguin més adequades per a aquest tipus de tractaments. Ens centrarem doncs, en l’estat actual en el qual es troba la investigació en aquest camp i també en la futura situació d’aquesta avançada i prometedora tècnica.

Els objectius del treball són els següents:

- Conèixer la fisiologia i el funcionament de les cèl·lules mare.
- Estudiar la diferenciació de les cèl·lules mare cap a diferents grups cel·lulars del nostre cos.
- Descobrir la capacitat d’aquestes cèl·lules per a crear un teixit totalment nou i per tant ser candidates vàlides per a la regeneració de teixits.
- Concretar la hipòtesi de quin tipus de cèl·lula mare del cor és la més adequada per tal de curar un infart cardíac.

- Fer un estudi sobre els diferents tipus de medis de cultiu utilitzats tant per a la proliferació de les cèl·lules mare com per a la seva diferenciació en determinades cèl·lules del nostre organisme.
- Realitzar un corba de creixement cel·lular.
- Aprendre com s'ha de dur a terme el cultiu i el manteniment d'aquestes cèl·lules per tal de mantenir-les indiferenciades.

Amb la finalitat d'aconseguir els objectius esmentats hem estructurat la informació bàsica del treball en dos apartats diferents:

El primer apartat del treball fa referència a les malalties cardiovasculars: Què són? Quins tipus n'existeixen? Quines repercussions tenen sobre les persones?

Dins aquest apartat hem fet una introducció de l'infart de miocardi; explicant què és, quins símptomes presenta i a quines persones afecta majoritàriament.

El segon apartat està dedicat a l'estudi de les teràpies i els tractaments per a les malalties cardiovasculars centrant-nos, sobretot, en les teràpies amb cèl·lules mare i diferenciant els diferents tipus de cèl·lules mare que es poden utilitzar per a dur a terme aquesta tècnica. També explica què són les cèl·lules mare, on es troben i quina funció tenen, així com els diferents tipus que n'hi ha. Comença explicant la seva morfologia i característiques generals, després diferenciant entre les cèl·lules mare embrionàries i les cèl·lules mare adultes. Per últim, ens centrem només en les cèl·lules mare adultes i concretament en les cèl·lules mare que trobem en el propi cor: procedents del teixit auricular (CMPCs), del teixit adipós subcutani (subATDPCs) i del teixit adipós cardíac (cardiacATDPCs), que són les cèl·lules que han estat utilitzades per a dur a terme la part experimental del treball.

La informació teòrica exposada en aquest estudi ha servit de base per al desenvolupament del treball de camp que inclou diferents experiments.

En primer lloc, hem elaborat un estudi comparatiu de les velocitats de creixement de diferents cèl·lules mare localitzades en el cor: cèl·lules del teixit adipós epicàrdic (cardiacATDPCs), del teixit adipós subcutani (subATDPCs) i del teixit cardíac (aurícula) (CMPCs). Per determinar les velocitats de duplicació, hem realitzat una corba de creixement mitjançant la qual hem determinar el període de temps, en dies, que cada tipus cel·lular tarda a dividir-se i a proliferar. D'aquesta manera s'ha pogut

identificar quin és el tipus cel·lular que prolifera més ràpidament i quin ho fa a una velocitat més lenta.

En l'altre experiment, s'ha realitzat un estudi sobre la diferenciació de les cèl·lules mare presents al cor cap a grups cel·lulars concrets, en el nostre cas, adipòcits, condrocits i osteòcits. Hem mantingut les cèl·lules en cultiu afegint-hi els medis de diferenciació específics per tal de que aquestes adoptessin una nova morfologia i per tant, poguéssim observar-ne la diferenciació.

Gràcies a aquests dos experiments s'han pogut extreure conclusions referents al tipus cel·lular més adient per tal de ser utilitzat en la teràpia de regeneració cardíaca. Es tractava d'identificar el tipus cel·lular amb la major velocitat de proliferació i amb la màxima capacitat de diferenciació cap a grups cel·lulars específics.

En el desenvolupament del treball ha estat fonamental el suport del grup d'investigació ICREC de l'Institut de Recerca Germans Trias i Pujol. Per aquest motiu en la part final de l'estudi s'inclou una entrevista a tots els investigadors que formen part d'aquest grup per tal de mostrar la seva línia d'investigació i en quin moment es troba actualment.

2. MALALTIES CARDIOVASCULARS

Les malalties cardiovasculars són totes aquelles malalties que afecten l'aparell cardiovascular, el qual està format pel cor i els vasos sanguinis.

Cal distingir entre malalties cardíques i malalties cardiovasculars ja que moltes vegades es confonen. Les primeres afecten només al cor i als seus vasos sanguinis. I les altres engloben les malalties cardíques i les que afecten al nostre sistema vascular.

La principal causa dels problemes cardiovasculars és l'arteriosclerosi, provocada per l'acumulació de grassa o colesterol a les parets de les artèries, i que dona lloc a una obstrucció de les mateixes. La conseqüència n'és la disminució del flux sanguini que arriba a una determinada part de l'organisme, ocasionant així una manca d'oxigen i de nutrients. Si aquesta manca té lloc de manera prolongada pot acabar tenint efectes molt negatius en el teixit, provocant fins i tot la mort de les seves cèl·lules, tal com passa en el cas de l'infart de miocardi.

2.1. COM A PRIMERA CAUSA DE MORTALITAT

Actualment, la majoria de països es troben afectats per elevades i creixents taxes de malalties cardiovasculars. A l'estat Espanyol, aquestes són la primera causa de mortalitat, la primera causa d'hospitalització i el segon motiu de consulta en l'atenció primària. A Espanya, moren cada any 125.000 persones de malalties cardiovasculars i el 55% d'aquest total són dones (la gran part dels casos es manifesten després de la menopausa).

Molts estudis mostren que els danys vasculars s'acumulen des de l'adolescència tot i que no es manifestin fins a la vellesa. La incidència de malalties cardiovasculars augmenta amb l'edat tant en els homes com en les dones. Aquesta incidència és tan elevada que en les dones més grans de 65 anys la mort provocada per aquest tipus de malalties dobla la quantitat de morts degudes a tots els càncers combinats.

Taxes específiques de mortalitat per malalties cardiovasculars (Espanya any 2002)

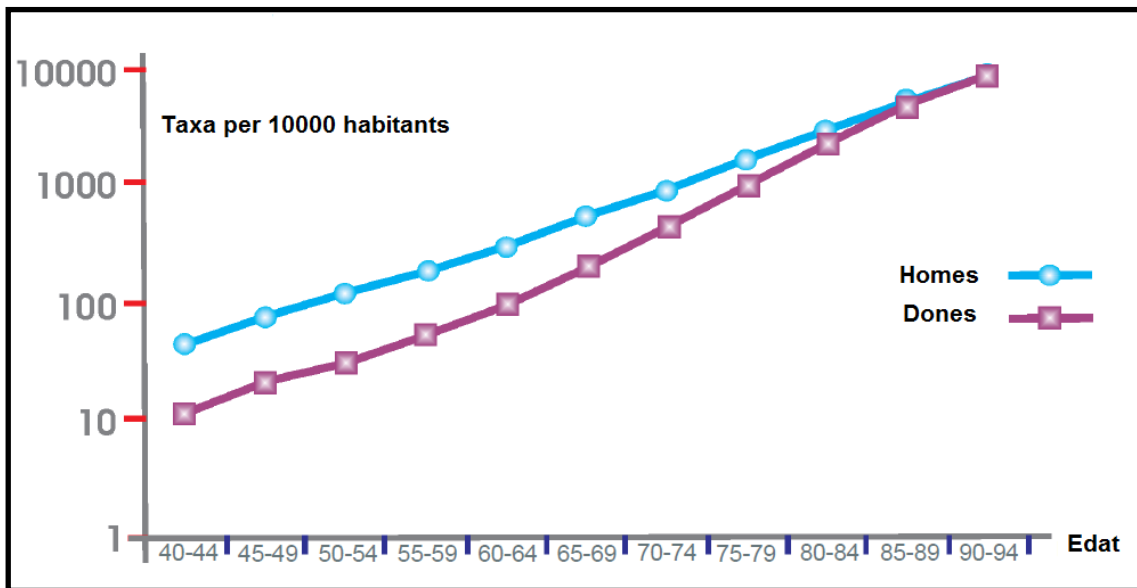


FIGURA 5: En aquest gràfic es pot observar l'augment de la mortalitat deguda a malalties cardiovasculars a Espanya en els dos sexes.
Font: Instituto Nacional de Estadística.

Concretament, la taxa d'infart de miocardi a Espanya és de 315 per cada 100.000 en els homes i de 80 per cada 100.000 en les dones. A més a més, s'ha observat que els infarts que no provoquen la mort estan augmentant de manera considerable, entre els homes. En les dones també va en augment però no és tan significatiu.

Tot i així, entre les diferents regions d'un mateix país existeixen diferències que poden ser molt grans, com per exemple l'alta freqüència de casos al sud d'Espanya (Ceuta i Melilla, Illes Canàries, Andalusia, Extremadura y Múrcia).

La majoria de països també segueixen aquesta tendència, l'única excepció són alguns països del centre i est d'Europa on disminueixen aquest tipus de malalties.

2.2. FACTORS DE RISC

Els factors de risc són totes aquelles característiques biològiques o conductuals (hàbits, patologies, antecedents o situacions), que fan que augmenti la probabilitat de desenvolupar una malaltia.

Quants més factors de risc reuneixi una persona, més probabilitats té de patir una malaltia. I també hi ha una relació directe entre el nivell de cada factor de risc i l'augment de probabilitats de patir una malaltia cardiovascular.

Segons si es poden modificar o no trobem dos grups diferents de factors de risc:

- **MODIFICABLE:** És quan pot ser eliminat o se'n pot disminuir la seva intensitat. Amb aquest tipus de factors podem dur a terme accions preventives i així reduir-ne la intensitat. Aquests factors són responsables d'un 80% de l'aparició d'aquest tipus de malalties.

Exemples: Fumar i no dur a terme una dieta saludable ni exercici físic.

- **NO MODIFICABLES:** Són tots aquells factors que vénen determinats genèticament i biològica, per tant, no podem dur a terme cap acció preventiva contra aquests.

Exemples: El sexe, l'edat i tots els factors hereditaris.

2.2.1. PRINCIPALS FACTORS DE RISC MODIFICABLES:

- **TABAC:** És el principal factor de risc, duplicant la possibilitat de patir infarts de miocardi. Els fumadors tenen quatre vegades més risc que els no fumadors. L'exposició passiva i continuada al tabac també ha esdevingut un factor de risc per a molta població.



FIGURA 6: Deixar de fumar redueix el risc de patir malalties cardiovasculars.
Font: Cartell de la Generalitat de Catalunya.

- **COLESTEROL*:** El nivell de colesterol d'una persona depèn de l'edat, sexe, herència i alimentació i afecta directament sobre la probabilitat de patir malalties cardiovasculars.

Quan naixem el nivell de colesterol és molt baix, entre 70 i 80 mg/dl i va augmentant a mesura que creixem, sobretot a partir de la pubertat, fins que arriba als 210-220 mg/dl als 40 anys.

Cal distingir dos tipus de colesterol, segons a les proteïnes amb les que s'associa ja que només un d'ells pot ser identificat com a factor de risc:

- **COLESTEROL HDL (Unit a proteïnes d'alta densitat):** Actua com a protector, per tant, redueix la probabilitat de patir alguna malaltia cardiovascular.
- **COLESTEROL LDL (Unit a proteïnes de baixa densitat):** Quan s'oxida, inicia un procés bioquímic mitjançant el qual es diposita a la paret de les artèries i així, poc a poc, les va obstruint. Constitueix doncs un factor de risc.



FIGURA 7: Colesterol LDL adherint-se a la paret d'una artèria.
Font: IPA International Pediatric Association.

- **DIETA NO EQUILIBRADA:** És un dels principals factors de risc. Si no portem a terme una dieta equilibrada al llarg del temps pot aparèixer colesterol, obesitat, etc. Tots aquests factors combinats faran augmentar molt el risc de patir malalties cardiovasculars. Cal evitar, sobretot, el consum d'aliments amb un alt contingut de grasses saturades i colesterol.

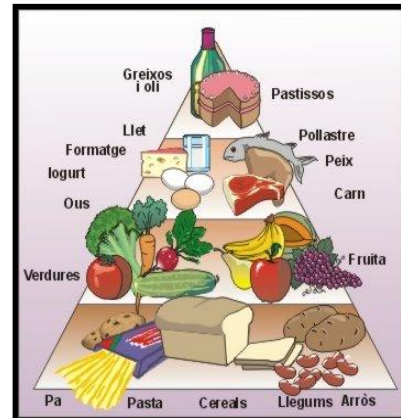


FIGURA 8: Esquema d'una dieta equilibrada.
Font: Sociedad española de dietética y alimentación.

- **DIABETIS*:** Té tant poder que dos terços de les persones diabètiques moren per alguna malaltia cardiovascular. Fins i tot, pot aconseguir anul·lar la protecció cardiovascular que tenen les dones abans de la menopausa.

- **OBESITAT:** És un factor determinant, a més a més de produir risc de patir malalties cardiovasculars pot donar lloc a l'aparició d'altres factors de risc com la diabetis i la hipertensió arterial.

- **HIPERTENSIÓ ARTERIAL*:** La pressió arterial molt elevada fa que el cor hagi de fer més esforç i, per tant, accelera el procés d'enduriment de les artèries, augmentat així el risc de patir malalties cardiovasculars. La pressió arterial va augmentant a mesura que ens fem grans en ambdós sexes i no es pot curar. El que sí que es pot fer és controlar-la mitjançant una dieta saludable, fent exercici físic i, si és necessari, amb l'ús de medicaments.

- **SEDENTARISME:** L'activitat física ajuda a prevenir les malalties cardiovasculars, ja que controla l'aparició de colesterol, diabetis, obesitat i, fins i tot, la pressió arterial en algunes persones.
L'exercici físic hauria de ser diari, i no cal que sigui molt dur, tan sols caminant entre 30 i 40 minuts cada dia seria suficient per reduir aquest risc.

- **ALCOHOL:** Consumir quantitats moderades d'alcohol cada dia augmenta molt el risc de patir malalties cardiovasculars. Té repercussions sobretot en les dones ja que metabolitzen l'alcohol més lentament. El consum d'elevades quantitats d'alcohol pot fer augmentar la pressió arterial i, pot portar cap a la obesitat degut a que aporta una gran quantitat de calories.

- **ESTRÈS:** Entenem per estrès, l'estat en el qual s'arriba quan una persona no és capaç de donar una resposta a les demandes que tant la vida, com la societat li imposen. Les persones que pateixen estrès tendeixen a dur a terme una alimentació desequilibrada i, podrien començar a fumar o augmentar-ne la freqüència. També pot anar associat a altres factors encara no estudiats amb profunditat i, que podrien estar relacionats amb l'àmbit psicològic.

L'aparició de forma combinada de tots aquests factors, fa que augmenti la possibilitat de patir malalties de tipus cardiovasculars.

2.2.2. PRINCIPALS FACTORS DE RISC NO MODIFICABLES:

- **ANTECEDENTS FAMILIARS:** Els nens amb pares que han patit alguna malaltia cardiovascular prematura, en el cas de les dones abans del 55 anys i els homes abans dels 65, tenen més probabilitat de ser afectats per una malaltia d'aquest tipus. La causa, són trastorns hereditaris els quals poden ser tractats amb medicaments, moltes vegades agressius per a l'organisme.
- **EDAT:** A mesura que ens fem vells, augmenten les probabilitats de patir una malaltia cardiovascular ja que els nostres vasos sanguinis i el nostre cor es van deteriorant. Aquestes malalties, comencen a desenvolupar-se en l'adolescència o la infància i van augmentant de grau amb l'edat.
- **SEXE:** Les dones, un cop han arribat a la menopausa*, tenen un risc més elevat que els homes de morir degut a malalties cardiovasculars. La causa n'és, la reducció dels nivells d'estrògens* que tenen lloc després de la menopausa.

Alguns dels factors exclusius del sexe femení són els següents:

- **ANTICONCEPTIUS:** Fan augmentar el risc de patir infarts cardíacs sobretot abans de la menopausa i un cop superats els 35 anys. Si a més a més la dona reuneix algun factor de risc més com ser fumadora, diabètica, obesa, o d'altres, el risc augmenta molt més.



FIGURA 9: Els anticonceptius.
Font: <http://femenina-salud.com/category/anticonceptivos>

- **ESTRÒGENS ENDÒGENS:** Són les hormones femenines responsables del cicle menstrual, per tant, desapareixen després de la menopausa. Aquestes hormones, protegeixen a les dones contra el

risc de patir malalties cardiovasculars ja que actuen com a protectores de l'aparell circulatori. Quan desapareixen, després de la menopausa, les dones tenen més risc de patir malalties cardiovasculars. Si la menopausa s'efectua de forma natural el risc és moderat i augmenta lentament, en canvi, si té lloc de forma quirúrgica el risc augmenta molt ràpidament.

2.3. PRINCIPALS MALALTIES CARDIOVASCULARS:

La principal causa dels problemes cardiovasculars és l'arteriosclerosi, provocada per l'acumulació de substàncies lipídiques a les parets de les artèries, i que dona lloc a una obstrucció de les mateixes.

En el moment en que aquestes malalties són detectades, l'arteriosclerosi ja està molt avançada. Per tant, mitjançant estudis s'ha arribat a la conclusió que, per evitar aquest tipus de malalties cal regular els factors de risc que provoquen l'aparició de l'arteriosclerosi com: no seguir una alimentació sana, no fer exercici físic, ser fumador, entre d'altres. Així, evitem l'aparició de l'arteriosclerosi i, per tant, el desenvolupament de les conseqüents malalties.

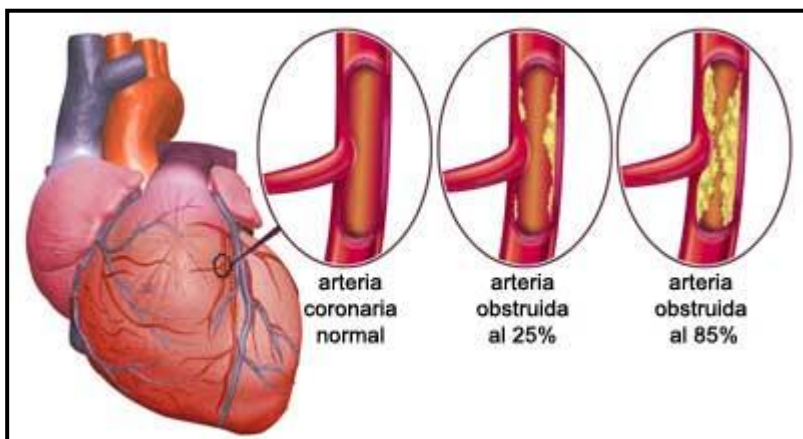


FIGURA 11: Imatge de l'obstrucció d'una artèria deguda a l'arteriosclerosi.

Font:

<http://www.elobservadordellitoral.com/2011/05/08/el-corazon-una-puerta-entre-la-vida-y-la-muerte/>

Principals malalties cardiovasculars i cerebrals derivades de l'arteriosclerosi:

2.3.1. CARDIOPATIA ISQUÈMICA: Té lloc quan hi ha un desequilibri entre l'oxigen que s'aporta a un teixit i la demanda que aquest en fa. Aquest tipus de malalties cada cop afecten a més persones.

2.3.1.1. Infart de miocardi: Conegut també com a atac de cor, té lloc quan la irrigació sanguínia és insuficient degut a una obstrucció de les artèries coronàries per arteriosclerosi o bé per trombosi. Es produeix la necrosi d'una part del miocardi i per tant, una part del teixit cardíac queda greument afectat.

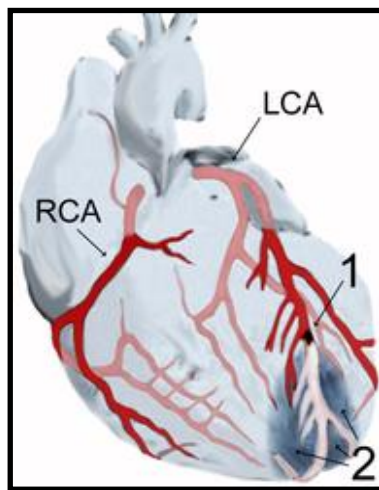


FIGURA 11: La zona més fosca (2) representa l'infart de miocardi després de l'obstrucció de l'artèria corresponent.
Font: J. Heuser.

2.3.1.2. Angina de pit: Causada per la manca momentània de la quantitat necessària de sang en una porció del múscul cardíac. En la majoria de casos, aquesta manca és deguda a la reducció del diàmetre de les artèries coronàries per arteriosclerosi.

Aquest síndrome es caracteritza per dolor en la regió anterior del tòrax, en forma de crisis breus, que a vegades van acompanyades d'angoixa i de sensació de mort immediata. Aquest dolor, si és molt intens, pot estendre's cap a la zona dels braços i la mandíbula i desapareix quan la persona està en repòs.

Els símptomes són més aguts quan la persona està fent exercici físic, aquesta és una manera de distingir l'angina de pit d'altres dolors que poden no ser tan greus. La màxima freqüència és observada entre els cinquanta i els setanta anys, essent més present entre els homes que entre les dones.

2.3.1.2.1. Angina de Prinzmetal: En aquest cas, la causa és un estrenyiment de les artèries coronàries que irriguen el cor degut a l'excessiva contracció del múscul llis de la paret de l'artèria. És un trastorn poc freqüent, però que si no es controla, pot arribar a desencadenar malalties més greus ja que redueix el flux de sang que arriba al cor en un determinat moment.

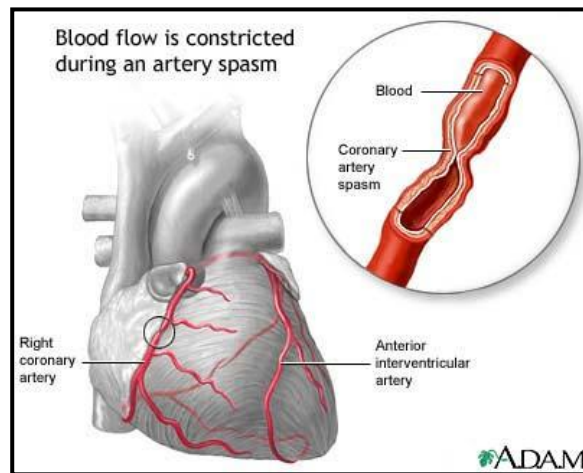


FIGURA 12: Imatge de com es produeix l'angina de Prinzmetal.
Font: Heart Care Centre.

2.3.1.2.2. Angina de Decúbit: Té lloc quan una persona es troba estirada en repòs. Els líquids del cos es redistribueixen en aquesta posició degut a la gravetat i el cor ha de treballar més.

2.3.2. Pericarditis: Malaltia produïda per a la inflamació del pericardi*, capa que recobreix el cor. És deguda a infeccions virals o bé bacterianes tot i que també pot ser conseqüència d'un infart de miocardi. Els principals símptomes són dolor toràcic, dificultat per a respirar, tos seca, cansament, ansietat, febre i vòmits.

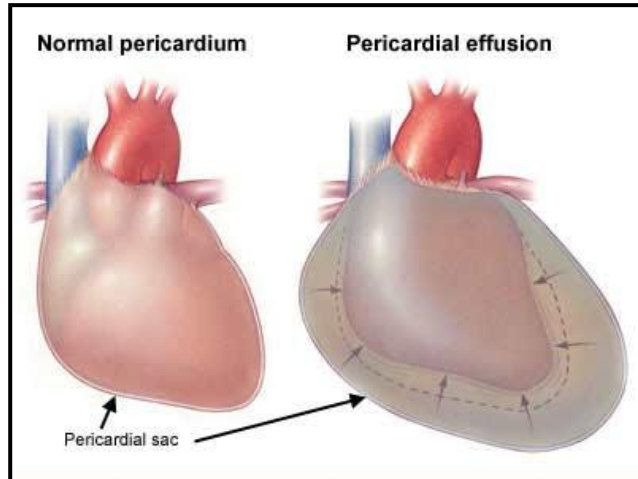


FIGURA 12: Imatge que mostra la diferència entre el pericardi en el seu estat normal, i quan aquest està inflammat degut a una infecció.

Font:

<http://www.conestetoscopio.com/2010/12/09/miocarditis-y-pericarditis-en-ninos/>

2.3.2.1. Síndrome de Dressler: Tipus de pericarditis que acostuma a tenir lloc després d'un infart de miocardi. El símptoma, és un dolor de pit freqüentment associat amb la respiració i la postura. Aquest dolor, es pot estendre per altres parts del cos i apareix aproximadament en l'1% de les persones que han patit un infart. Altres símptomes podrien ser febre i malestar general.

2.3.3. ACCIDENT VASCULAR CEREBRAL (AVC): Afecta la circulació cerebral i, consisteix en una lesió irreversible al cervell degut a la pèrdua del flux sanguini en aquest, durant un període de temps més o menys llarg. Segons l'àrea del cervell que ha estat afectada es produeixen un tipus de símptomes o uns altres. Els més freqüents són: paràlisi* d'alguna extremitat o bé de la cara, pèrdua de la visió en un o tots dos ulls, dificultat per expressar-se o entendre les coses, marejos i dificultat per caminar i mantenir l'equilibri.

2.3.3.1. Isquèmic: Té lloc quan hi ha una interrupció d'irrigació sanguínia en una determinada zona del cervell deguda principalment a l'arteriosclerosi, també s'anomena infart cerebral. En trobem de diferents tipus segons el seu origen:

- **Origen vascular:** Produït per l'obstrucció de les artèries que aporten la sang al cervell. Pot ser degut a la disminució del cabal cardíac o bé de la tensió arterial.

▪ **Origen intravascular:**

- **Trombòtiques:** Formació d'un coàgul en una de les artèries que irriga el cervell provocant-ne així l'obstrucció total. Aquest fenomen es veu afavorit per la presència d'arteriosclerosi.
- **Èmbol*:** És conseqüència de la formació d'un coàgul a alguna part de l'organisme que al desprendre's, tot o parcialment, circula a través de l'aparell circulatori fins arribar a una petita artèria cerebral la qual obstrueix totalment degut a la seva mida. Altres elements que poden obstruir les artèries són: fàrmacs, fractures o bé tumors.

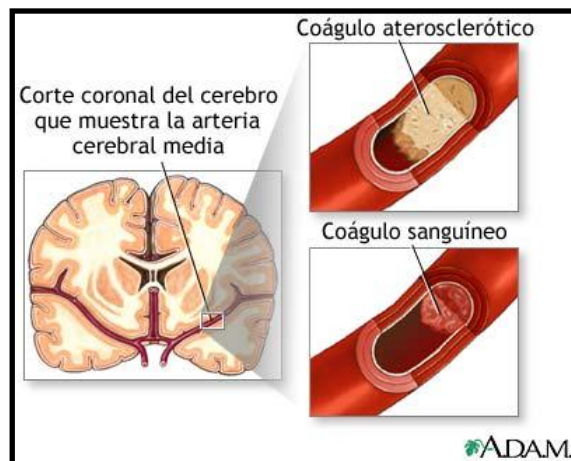


FIGURA 14:
 Embòlia cerebral produïda per l'obstrucció d'una artèria.
Font: Baltimore Washington Medical Center.

- **Origen extravascular:** Obstrucció de les artèries degut a fenòmens externs. Com per exemple, un tumor o un quist.

2.3.3.2. Hemorràgic: Té lloc quan hi ha una ruptura d'un vas sanguini encefàlic*. Té dues conseqüències principals: per una banda priva de l'arribada de sang a una determinada zona del cervell i, per l'altra, la sang que s'ha després del vas sanguini exerceix pressió sobre altres zones del cervell, per tant, la zona afectada augmenta considerablement.



FIGURA 15: Imatge d'una hemorràgia cerebral interna (part més fosca) després de 30 hores del seu inici.

Font:

<http://www.infodoctor.org/www/meshc10.htm?idos=10733>

2.3.4. CLAUDICACIÓ INTERMITENT: Trastorn caracteritzat per l'aparició d'un dolor muscular intens, sobretot a la part més baixa del cos, les cames. Apareix quan s'està realitzant exercici físic i desapareix quan s'està en repòs. La causa d'aquesta malaltia és la progressiva obstrucció de les artèries que transporten la sang cap a totes les zones de l'organisme. Els principals símptomes són cansament general i muscular, més dificultat per a la cicatrització de ferides, pell més pàl·lida i freda, augment del gruix de les ungles entre d'altres.

2.3.5. ANEURISME DE L'AORTA: Degut a la dilatació de la paret de la mateixa. Provoca una debilitat a la paret arterial, que queda molt feble, i es va fent més ampla a mesura que la sang és bombejada. Acaba formant-se una espècie de globus en un sector de l'aorta d'una paret molt dèbil. Afecta sobretot a persones més grans de 60 anys. És deguda principalment a l'arteriosclerosi, tot i que també pot deure's a la hipertensió. Normalment, no presenta símptomes per tant, el diagnòstic es fa mitjançant una ecografia abdominal* o un escàner.

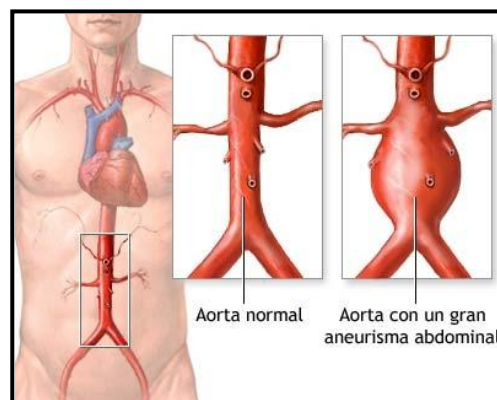


FIGURA 16:

Comparació entre l'artèria aorta en el seu estat normal i quan aquesta ha patit un aneurisma.

Font: Centre de Angiologia y cirugía vascular.

2.3.6. COLITIS ISQUÈMICA: Inflamació d'una part de l'intestí gruixut, impedeix l'arribada de tota la sang necessària per al bon funcionament de l'intestí. Alguns símptomes són: diarrea, vòmits, febre i dolor abdominal. Aquest trastorn es tracta mitjançant medicaments i en els seus inicis, requereix d'una dieta líquida.

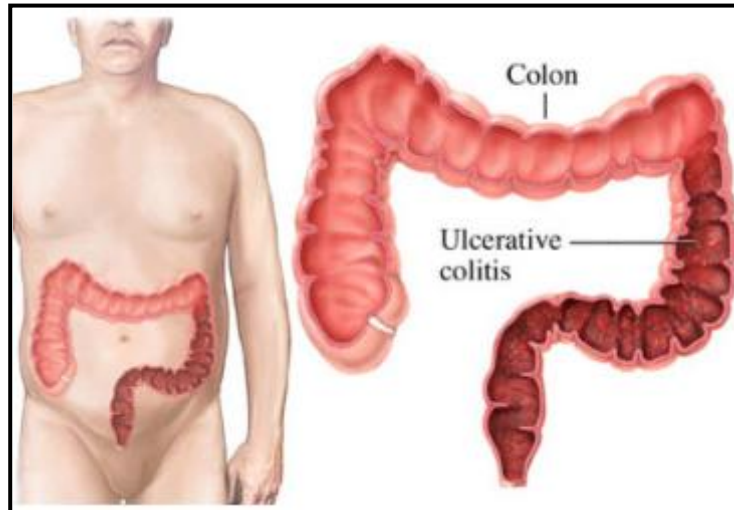


FIGURA 17: Imatge que mostra la inflamació d'una part de l'intestí gruixut.
Font: Diccionari mèdic, quemedico.com.

3. INFART DE MIOCARDI

Com s'ha mencionat anteriorment, l'infart o atac de cor té lloc en el moment en que la irrigació sanguínia que arriba a una determinada part del cor és insuficient i, provoca la deterioració d'aquella zona.

Aquesta disminució de la irrigació sanguínia és causada, principalment, per l'obstrucció de les artèries coronàries, que són les encarregades de fer arribar la sang al cor. L'obstrucció es produeix per coàguls, els quals poden ser produïts per l'arteriosclerosi, essent així coàguls de la pròpia sang, o pel despreniment d'un fragment d'una substància que ha anat circulant pel sistema circulatori fins arribar a una artèria de mida inferior i, n'ha ocasionat la seva obstrucció.

El bloqueig d'una artèria, no permet el pas de sang cap a una determinada zona del cor i això fa que aquesta deixi de rebre oxigen, per tant, la zona afectada no pot

produir l'energia necessària per a dur a terme el moviment de contracció i dilatació propi del cor. Poc a poc, les cèl·lules que no reben sang van morint sense haver-hi la seva regeneració. Es produeix doncs, la necrosi d'una part del teixit cardíac que queda inutilitzable o bé, funciona de manera irregular segons el temps de durada de l'infart.

Quan es produeix un infart de miocardi cal rebre atenció mèdica immediata. Sinó les conseqüències poden arribar a ser molt greus, fins a provocar la mort de la persona. El diagnòstic depèn de l'extensió que aquest ha tingut, és a dir, de la zona que ha quedat afectada, i la rapidesa amb què el pacient ha rebut atenció mèdica.

3.1. SÍMPTOMES:

Els principals símptomes que es presenten durant i després un infart de miocardi són els següents:

- **Dolor toràctic:** Dolor intens i prolongat a la zona del tòrax, pot estendre's per la mandíbula, el coll, l'espatlla i els braços, sobretot l'esquerra. Aquest dolor és el que es coneix com a angina de pit.

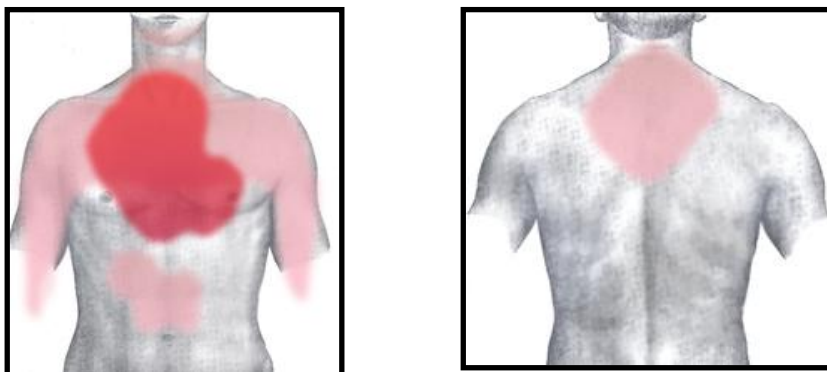


FIGURA 18: Zones més comunes d'afectació del dolor després de patir un infart cardíac. Zones vermelles (dolor més intens) i zones roses (dolor menys intens).

Font: ca.encyclopedia.com, infart de miocardi.

- **Dificultat per respirar:** Síntoma que apareix sobretot quan l'infart afecta el ventricle esquerre del cor, ja que és la zona del cor més comunicada amb els

pulmons. En el moment en que aquesta part del cor deixa de funcionar, augmenta la pressió dels vasos sanguinis que comuniquen amb els pulmons i com a conseqüència una sèrie de líquids es van acumulant als pulmons donant lloc a la formació d'un edema* pulmonar que dificulta la circulació normal de l'oxigen a l'interior dels pulmons.

- **Ganes de vomitar i mareig:** Síntoma que només es presenta en un 10% dels casos.
- **Fred i pell humida:** Deguda a la disminució del treball produït pel cos.
- **Pèrdua del coneixement:** És un dels símptomes més greus i pot donar lloc a la mort sobtada de la persona.

Cal tenir en compte però, que aproximadament un quart dels casos d'infarts no presenten cap tipus de símptoma, dificultant així la seva detecció i posterior diagnòstic. Aquest tipus d'infarts són detectats més tard mitjançant electrocardiogrames o bé, un cop es fa l'autòpsia per descobrir la causa de la mort d'una persona.

El rendiment del cor queda doncs inevitablement disminuït, degut a una mort massiva de cardiomiòcits, produint-se així una cicatriu rica en teixit connectiu* sense capacitat contràctil. Cal doncs, regenerar aquest teixit infartat per tal de recuperar la funció cardíaca. Per fer-ho hi ha diverses tècniques que explicarem a continuació.

4. SOLUCIONS TERAPÈUTIQUES A L'INFART CARDÍAC

A mesura que es va produint l'envelliment del cos, els teixits es van deteriorant i pateixen un gran desgast. Per contrarestar aquest important desgast es produeix l'autorenovació del propis teixits mitjançant les pròpies cèl·lules mare del cos. Amb tot però, quan el dany en el teixit és molt gran, aquestes cèl·lules no tenen la capacitat suficient per reparar-lo completament i per tant, el teixit es veu greument afectat.

El desgast dels teixits i la mort d'aquests és actualment la principal causa de moltes de les malalties que afecten a la gran majoria de la població, entre elles l'infart de miocardi. Per tal de resoldre aquest envelliment la medicina ha desenvolupat les tècniques següents:

4.1. EL TRANSPLANTAMENT:

La primera i la més utilitzada fins al moment és el transplantament d'òrgans. Un trasplantament és una operació quirúrgica que consisteix en reemplaçar un òrgan malalt per un de sa, provinent d'un donant. Si no es substituís l'òrgan que ha deixat de funcionar, degut a una malaltia, la persona afectada podria arribar a morir.

En la gran majoria d'intervencions quirúrgiques de transplantament d'òrgans s'utilitzen òrgans de persones que han mort. A vegades però, els òrgans també es poden obtenir d'una persona en bon estat de salut. Aquesta, pot donar un dels seus ronyons, i en casos no tan comuns, part del fetge, pulmó o intestí, sense que això afecti la seva pròpia salut.

Els avantatges d'un transplantament poden ser molts: el principal és la cura d'una malaltia que podria acabar provocant la mort del pacient. Amb el trasplantament, aconseguim que l'òrgan o teixit nou no tingui marques de cap malaltia i que per tant, funcioni correctament. Des de fa més de vint anys, el nombre de persones que viuen gràcies als transplantaments és cada cop més gran. Al mateix temps, la millora de

les tècniques i la superació dels problemes de rebuig fa que aquests siguin cada vegada més efectius i per tant més imprescindibles.

Cal doncs, buscar donants per tal d'obtenir òrgans sans per als pacients que han perdut la funció dels seus en el transcurs d'una malaltia. Actualment, el trasplantament ha demostrat ser una solució terapèutica eficaç en els casos d'insuficiència terminal de ronyó, fetge, pulmó, cor i pàncrees. Un nombre cada cop més gran de trasplantats segueix vivint vint anys després de l'operació i la gran majoria sobreviu almenys cinc anys.

Cal tenir en compte però, que aquesta tècnica presenta també diversos inconvenients que encara són un obstacle per a la seva total efectivitat.

El principal, és el rebuig, de l'òrgan trasplantat per part del pacient receptor, ja que el seu sistema immunològic el reconeix com a estrany i produeix anticossos per tal d'expulsar la substància externa, l'òrgan.

Per tal de minimitzar aquests efectes, després de l'operació, és necessari que el pacient prengui medicaments que suprimeixin la resposta immunològica normal i fins i tot alguns se'ls han de prendre tota la vida. Els medicaments però, presenten també alguns inconvenients, ja que durant la seva utilització el pacient es troba baix de defenses i per tant, pot ser víctima de qualsevol infecció externa.

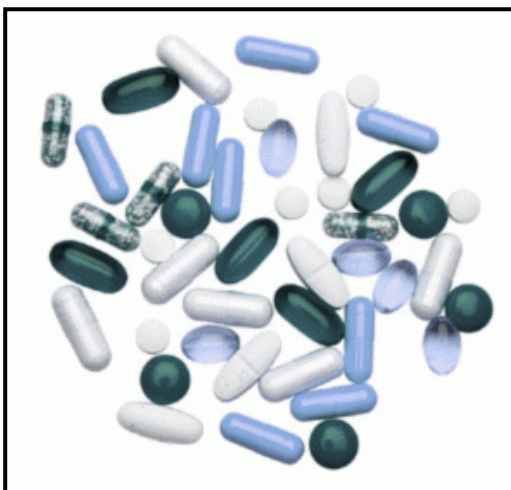


FIGURA 19: Els medicaments immunosupressors costen una elevada quantitat de diners i moltes vegades les persones trasplantades no els poden pagar tot i que són indispensables per a l'èxit del trasplantament.

Font: IPA, International Pediatric Association.

Un altre inconvenient, és la poca disponibilitat d'òrgans sans. Fet que fa dificultar encara més trobar un òrgan per a poder dur a terme el trasplantament.

El temps d'espera per un òrgan compatible amb un determinat organisme és molt gran, això posa en perill les persones que necessiten el trasplantament de manera immediata. Fins i tot, hi ha casos de morts durant l'espera.

En quan als aspectes mèdics, les operacions en que es porten a terme trasplantaments són molt complexes i moltes vegades presenten grans probabilitats d'infecció.

4.1.1. TRANSPLANTAMENT DE COR

Aquesta és un tipus d'operació quirúrgica de trasplantament d'òrgan realitzada sobre pacient en estat d'insuficiència cardíaca o cardiopatia isquèmica. El primer trasplantament de cor amb èxit es va dur a terme el 3 de desembre de 1967.



L'operació és molt complexa i requereix la participació d'un gran equip d'especialistes. El procediment més comú és extreure el propi cor del pacient i en el seu lloc col·locar-hi el cor del donant.

FIGURA 20: Imatge d'una intervenció quirúrgica per a dur a terme un trasplantament de cor.

Font: Medicmena.blogspot.com

La intervenció, es porta a terme sota anestèsia general i acostuma a durar diverses hores. Durant la seva realització, és necessari aturar la funció del cor i dels pulmons momentàniament, per això, aquesta funció ha de ser assumida per una màquina de circulació externa. La màquina, reemplaça la funció del cor mitjançant un complex mecanisme i manté la circulació de la sang per a tot l'organisme.

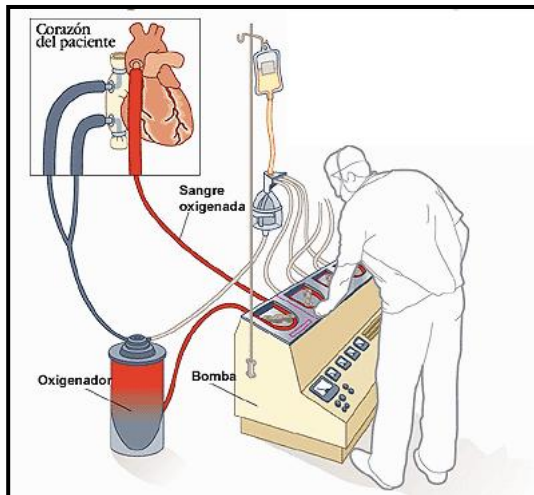


FIGURA 21: Imatge en la qual es representa el funcionament d'una màquina de circulació externa.

Font: ca.encyclopedia.com, maquina de circulación externa.

Degut a la poca disponibilitat de cors sans per a ser trasplantats, s'han hagut d'establir diferents criteris per determinar quins casos són els que cal tractar abans i quins poden esperar durant més temps.

En primer lloc, per tal de que es porti a terme un trasplantament de cor, és necessari que el pacient pateixi un avançat i irreversible fracàs cardíac, amb una limitació molt gran de la seva esperança de vida. Els casos que intenten ser tractats amb més rapidesa degut a la seva gravetat són:

- Malaltia greu de la vàlvula cardíaca.
- Cardiomiopatia*.
- Cardiopatia congènita.
- Cardiopatia isquèmica.
- Arítmies* que amenacen la vida.

Els casos deguts a altres tipus de malalties tenen un temps d'espera superior ja que és creu que el trasplantament no és tan necessari.

En segon lloc, un altre factor determinant per decidir la urgència de la intervenció és la contraindicació que presenta el pacient al trasplantament. Cal assegurar-se que la intervenció tindrà el major grau d'èxit possible per tant, es donarà preferència a un pacient que no presenti cap tipus de contraindicació.

Un cop realitzada la intervenció, segons determinades condicions del seu organisme, hi ha pacients que presenten un pitjor pronòstic de recuperació, el que es coneix com a contraindicació al trasplantament.

Aquesta pot ser absoluta (no es pot realitzar el trasplantament) o relativa (depèn de la situació que el pacient pugui accedir al trasplantament o no).

S'han classificat als receptors segons les possibilitats d'èxit que pot tenir la intervenció mèdica per al trasplantament de cor.

Entre les contraindicacions absolutes podem destacar:

- Infecció activa.
- Tumor.
- Hipertensió arterial pulmonar.
- Malaltia psiquiàtrica.

Entre les contraindicacions relatives trobem:

- Edat.
- Altres malalties com la diabetis Mellitus*.
- Problemes socials.

Cal tenir en compte, que el trasplantament no és una solució per a tots el problemes de cor. Només es pot aplicar a un petit nombre de pacients que, tinguin menys de 55-60 anys, que pateixin les malalties esmentades abans i que tinguin tots els altres òrgans vitals en perfecte estat. Sinó podria ser que l'operació no tingués els resultats esperats.

Els pronòstics d'esperança de vida dels pacient han augmentat positivament durant els últims 20 anys. Els pacients sobreviuen:

- 1 any: 86,1% (homes), 83,9% (dones)
- 3 anys: 78,3% (homes), 74,9% (dones)
- 5 anys: 71,2% (homes), 66,9% (dones)

Fins al moment, la persona que ha sobreviscut més després d'un trasplantament de cor ha estat Tony Huesman, que ha viscut 31 anys després de l'operació.

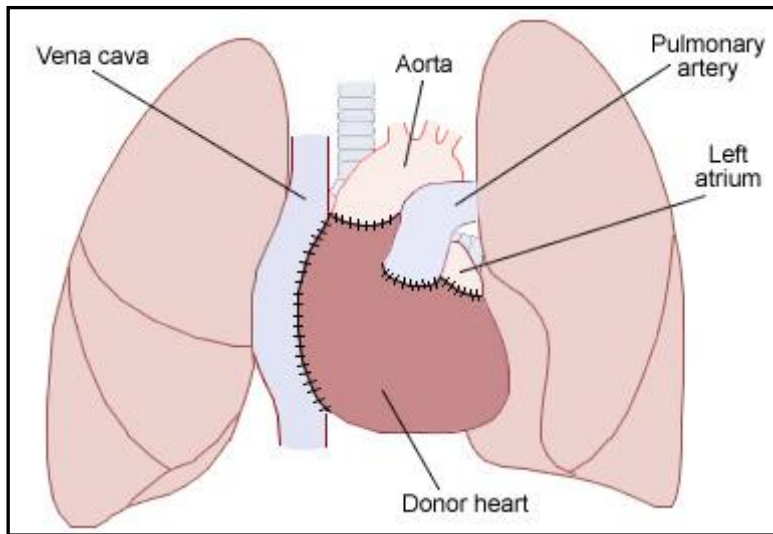


FIGURA 22: Imatge de la posició en què es col·loca el cor del donant dins l'organisme receptor.

Font: ca.ecydia.com, transplantament cardíac.

4.2. MEDICINA REGENERATIVA

Una nova solució al desgast dels teixits i deteriorament dels òrgans és la medicina regenerativa, que té com a objectiu reparar els teixits danyats de l'organisme mitjançant la implantació de cèl·lules mare, que es troben en els diferents teixits del cos. De manera natural, les cèl·lules mare, es van reproduint per substituir les cèl·lules que es van morint i així evitar l'envelliment dels teixits. Però, si l'afectació del teixit és molt gran, un infart de miocardi o bé un infart cerebral, no pot ser reparat pels mecanismes naturals del cos ja que el sistema de reparació del cos és limitat i no pot reparar una afectació d'un teixit que s'hagi produït de manera molt ràpida i a gran escala.

Com a solució, s'han començat a posar en marxa nous protocols per al cultiu "in vitro" de cèl·lules mare que després, mitjançant un conjunt de tècniques avançades podran ser trasplantades a l'interior de l'organisme i regenerar el teixit o òrgan afectat. Aquesta tècnica, fa ús de la capacitat natural que tenen les cèl·lules mare de reproduir-se i, generar noves cèl·lules filles idèntiques a elles.

La medicina regenerativa, està doncs basada en l'ús terapèutic de les cèl·lules mare, i ha aparegut degut a l'augment dels casos de malalties degeneratives.

4.2.1. REGENERACIÓ CARDÍACA

Degut a la poca efectivitat dels transplantaments, s'ha desenvolupat una teràpia alternativa com a solució a la insuficiència cardíaca, que rep el nom de medicina regenerativa.

Fins fa poc, es creia que els cardiomiòcits eren cèl·lules completament diferenciades i que per tant, eren incapaces de poder reproduir-se. Recentment però, s'ha descobert que no és així, els cardiomiòcits es troben en renovació constant a través de mitosis o de divisions cel·lulars que originen noves cèl·lules genèticament idèntiques a les progenitores.

En un temps de tan sols 4- 5 mesos, s'ha observat que es renoven la tercera part de cardiomiòcits i, se sap, que en un home de 50 o 60 anys és possible que la majoria de cardiomiòcits tinguin només entre 4 o 5 anys. El cor, des del punt de vista de constitució cel·lular, és un òrgan en continu moviment.

Tot i així, les mitosis són insuficients per a poder reparar les pèrdues de cardiomiòcits a gran escala i, no poden arribar a reparar l'òrgan danyat. Diem doncs, que la capacitat regenerativa del cor adult dels mamífers és limitada.

Per aquest motiu, s'han desenvolupat tècniques regeneratives basades en la utilització de diferents tipus de cèl·lules mare, per a intentar refer del tot el teixit afectat. La recerca s'ha de centrar doncs, en trobar el grup cel·lular més adient per a reparar el teixit lesionat.

Les teràpies cel·lular es persegueixen bàsicament els següents objectius:

- Reemplaçar els cardiomiòcits morts per altres de funcionals.
- Millorar la vascularització del cor infartat.
- Limitar l'expansió de l'infart i evitar la dilatació ventricular.
- Millorar la funció contràctil del cor.

Per aconseguir posar en pràctica aquest objectius, s'ha observat que abans de trasplantar les cèl·lules a l'organisme és necessari aïllar-les i, mantenir-les durant un

temps en cultiu. Obtenint així un nombre suficient de cèl·lules per al seu ús en estudis clínics relacionats amb el trasplantament.

Durant el seu cultiu, s'avaluarà la capacitat de les cèl·lules mare per a dividir-se i diferenciar-se cap a cardiomiòcits i, es controlarà la possible toxicitat de les cèl·lules, comprovant així que no poden generar cap efecte perjudicial en els humans.

El cultiu de cèl·lules mare humanes, requereix l'ús de medis de cultiu suplementats amb factors de creixement i altres substàncies químiques que promouen la replicació cel·lular i, regulen la diferenciació de les cèl·lules mare humanes cultivades.

La densitat inicial de sembra de les cèl·lules, la freqüència amb la qual es canvia el medi de cultiu, i la densitat de cèl·lules a la qual se'ls permet arribar a subdividir, són factors que afectaran en les característiques de les cèl·lules mare cultivades.

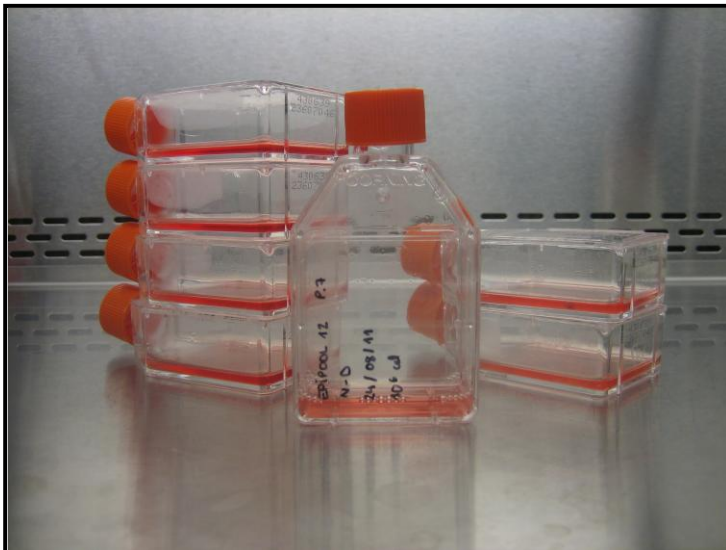


FIGURA 23: Imatge de les cèl·lules en cultiu dins de flascons.

Mitjançant els experiments realitzats a partir dels cultius de cèl·lules mare, s'ha descobert que les cèl·lules mare embrionàries i adultes, tenen la capacitat de diferenciar-se cap a cardiomiòcits i per tant, restaurar la funció del cor de les persones que pateixen insuficiència cardíaca. Els investigadors, estan interessats en explotar aquesta capacitat per proporcionar teixits de reemplaçament per al cor infartat.

Diverses evidències han portat a pensar que realment aquesta pot ser una tècnica eficaç per a la restauració de la funció cardíaca, i la principal és:

S'han utilitzat models animals, ratolins, als quals s'ha provocat un infart cardíac mitjançant una lligadura col·locada al voltant d'un vas sanguini principal que aporta la sang al múscul cardíac, privant així l'arribada d'oxigen i nutrients als cardiomiòcits.

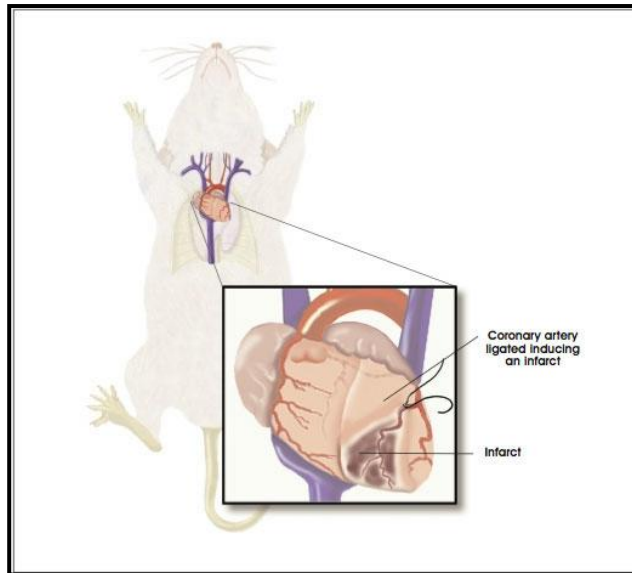


FIGURA 24: Dibuix on es mostra el procediment que es porta a terme per tal de provocar un infart als ratolins.

Font: Stem Cell information, Terese Winslow, Lydia Kibiuk.

Els investigadors van observar que sobreviuen més els ratolins als quals s'havien trasplantat cèl·lules mare, en canvi, els altres, la majoria morien.

En els primers, s'observava una reparació parcial del teixit infartat cosa que va fer suposar que les cèl·lules mare tenien un efecte beneficiós sobre el miocardi lesionat. Les cèl·lules, havien migrat a la regió infartada del ventricle on s'havien multiplicat i s'havien diferenciat a cèl·lules que s'assemblaven en molts aspectes als cardiomiòcits.

Per aquest motiu, la medicina regenerativa, representa una línia d'investigació molt important dins el camp de la medicina. Actualment, s'està intentant trobar el grup cel·lular més adient per tal de que la teràpia sigui el màxim efectiva possible. En aquest moment s'estan investigant els grups cel·lulars següents:

4.2.1.1. CÈL·LULES MARE

Les cèl·lules mare, són cèl·lules no diferenciades que tenen la capacitat d'originar noves cèl·lules d'un teixit especialitzat. Aquesta capacitat, els permet reparar els teixits i els òrgans del cos, substituint les cèl·lules mortes o bé malmeses per altres de noves i amb un millor funcionament. Es creu, que cada dia recanviem unes 100.000 cèl·lules del nostre cos, la majoria epidèrmiques. Aquestes cèl·lules, han de ser substituïdes per altres de noves a través de la reproducció cel·lular.

Moltes cèl·lules ja diferenciades, com les epitelials, les musculars, les hepàtiques, etc. degut a la seva diferenciació, han perdut la capacitat de reproducció, de manera que, les cèl·lules mare són les úniques que tenen la capacitat de reproduir-se i per tant, formar noves cèl·lules genèticament iguals entre elles.

La diferència entre una cèl·lula mare i una cèl·lula ja diferenciada la trobem en els gens que tenen activats. És a dir, tot i tenir el mateix material genètic, les cèl·lules, segons la funció que porten a terme tenen activats un tipus de gens o uns altres. De fet, la majoria de gens d'una cèl·lula estan inactivats i, només es troben en funcionament aquells necessaris per a la funció específica de la cèl·lula.

Davant aquest descobriment, es creu que en un futur les cèl·lules mare tindran la capacitat de curar un ampli ventall de malalties que afecten als humans, podran ser utilitzades per reparar teixits o fins i tot per substituir òrgans sencers. Aquesta tècnica, es coneix amb el nom de medicina regenerativa i està adquirint una gran importància dins l'àmbit de la medicina.

- PROPIETATS:

Les cèl·lules mare tenen tres propietats úniques que les diferencien de les cèl·lules ja diferenciades:

1) **Són capaces de dividir-se i renovar-se durant períodes llargs de temps:**

Aquesta capacitat, permet a les cèl·lules mare originar cèl·lules filles genèticament idèntiques a elles, que poden donar lloc a una cèl·lula diferenciada d'un teixit o bé a una altra cèl·lula mare. Si s'originés una nova

cèl·lula mare, tornaria a fer el mateix procés que la seva progenitora i obtindríem una altre cèl·lula filla. Per aquest motiu, es diu que poden renovar-se durant períodes de temps llargs.

2) **Són cèl·lules no especialitzades:** No tenen la morfologia pròpia de les cèl·lules de cap teixit en concret sinó es convertiren en cèl·lules especialitzades i per tant, perdrien la capacitat de reproduir-se. D'aquesta manera, encara que una cèl·lula mare es trobi en un determinat teixit mai portarà a terme la mateixa funció que fan les cèl·lules que l'envolten.

3) **Poden donar lloc a cèl·lules especialitzades:** Aquest fet, té lloc mitjançant un procés que s'anomena diferenciació, un cop la cèl·lula mare s'ha reproduït i ha originat una cèl·lula filla aquesta, passa per diverses etapes i cada vegada adquireix un major grau de diferenciació.

Recentment, els científics han descobert com es porta a terme el procés de diferenciació. Han observat que hi intervenen tant senyals interns de la pròpia cèl·lula com senyals externs que provenen de les cèl·lules veïnes ja especialitzades. Entenem per senyals interns, els gens que s'activen per tal que la nova cèl·lula pugui dur a terme la funció pròpia del teixit al qual correspon i els senyals externs, són principalment substàncies químiques secretades per les altres cèl·lules per afavorir en el procés de diferenciació.

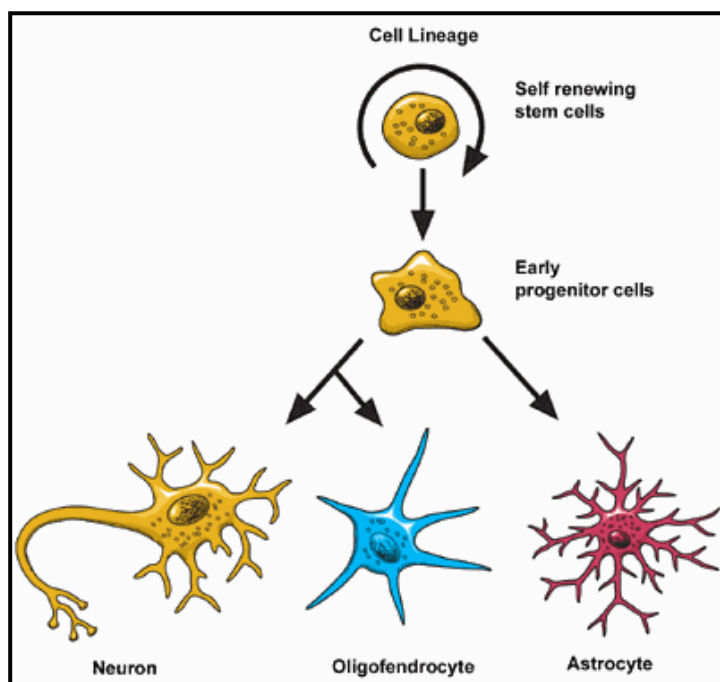


FIGURA 25: Esquema en el qual es mostra la capacitat de les cèl·lules mare per acabar-se diferenciant a grups cel·lulars concrets.
Font: Stem Cell information, Terese Winslow, Lydia Kibiuk.

- **POTENCIALITAT:**

Un dels criteris per a classificar les cèl·lules mare és la seva potencialitat, és a dir, la capacitat que tenen per diferenciar-se en tipus cel·lulars concrets.

Segons aquest criteri trobem les següents classes de cèl·lules mare:

- **TOTIPOTENTS:** Són les cèl·lules mare presents en els primers estadis de l'embrió (pre-mòrula). Són originades per la fusió entre un òvul i un espermatozoide i poden donar lloc a qualsevol tipus cel·lular, fins i tot poden esdevenir un organisme sencer.



FIGURA 26: Imatge mitjançant el microscopi electrònic de l'embrió pre-mòrula.
Font: ufrgs.br/topicosembriao/FIV.html

- **PLURIPOTENTS:** També poden donar lloc a qualsevol tipus cel·lular però per si soles, no poden originar un individu sencer. Només poden donar lloc a cèl·lules derivades dels tres fulls embrionaris: endoderma, ectoderma i mesoderma.
- **MULTIPOTENTS:** Poden esdevenir una família concreta de cèl·lules diferenciades. Exemple: cèl·lules hematopoètiques, poden donar lloc a glòbuls vermells, plaquetes o glòbuls blancs.
- **UNIPOTENTS:** Només poden produir un grup cel·lular concret. Tot i això, es diferencien de les altres cèl·lules perquè tenen la capacitat d'autorenovar-se. Exemples: Cèl·lules musculars o nervioses.

Gràcies a totes les seves característiques, les cèl·lules mare poden constituir la base sobre la qual es desenvoluparà la teràpia cel·lular. En el futur, els pacients amb risc de patir determinades malalties podrien tenir en cultiu les seves pròpies cèl·lules mare per tal d'utilitzar-les en cas de ser necessitades, a més a més les cèl·lules podrien ser preprogramades genèticament per tal que migressin directament a la zona de la lesió i per sintetitzar les proteïnes que el cor necessita per iniciar el procés de regeneració cardíaca.

Els investigadors, estan utilitzant cèl·lules mare de diverses fonts per tal de veure quines són les més indicades per a aquest tipus de teràpia. Diferenciem dos grups cel·lulars dins de les cèl·lules mare: les adultes i les embrionàries. Totes dues són objecte d'estudi per tal de veure quina acaba essent més eficaç.

4.2.1.1.1. CÈL·LULES MARE ADULTES

Les cèl·lules mare adultes són cèl·lules que es troben en l'organisme d'un ésser adult i, tenen la capacitat de dividir-se i formar noves cèl·lules filles cada cop que una d'aquestes mor. Les cèl·lules filles, poden donar lloc a una altra cèl·lula mare que també ajudarà a regenerar el teixit o bé a una cèl·lula diferenciada que s'incorporarà dins d'un teixit i durà a terme una funció determinada.

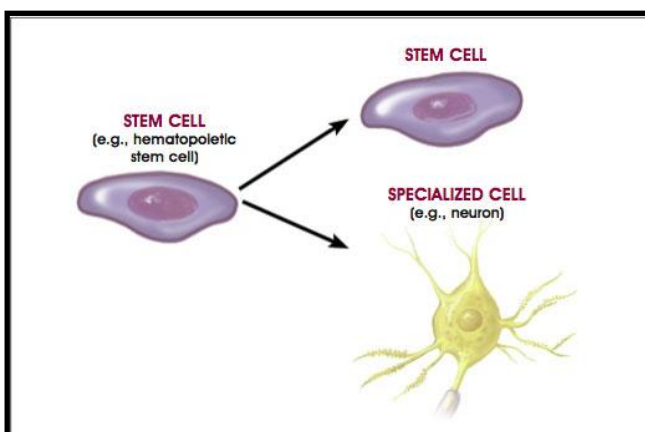


FIGURA 27: La reproducció d'una cèl·lula mare adulta pot donar lloc a una nova cèl·lula mare o bé a una cèl·lula filla especialitzada en una determinada funció.

Font: Stem Cell information, Terese Winslow, Lydia Kibiuk.

D'aquesta manera, es van regenerant els teixits del nostre organisme tot i que a mesura que ens fem grans cada cop tenim menys cèl·lules mare i per tant, aquesta capacitat va desapareixent gradualment ocasionant l'envelliment i deteriorament dels

teixits. Les cèl·lules mare, són molt abundants durant la joventut i al ser tan nombroses poden reemplaçar a les cèl·lules filles mortes, les seves abundants divisions cel·lulars regeneren els teixits danyats. Fins als 25 anys, el recanvi cel·lular és gairebé total. Però a partir dels 25, s'han gastat moltes cèl·lules mare i les que queden ja no són suficients per assolir la restitució cel·lular total, és el què s'entén com a vellesa.

La causa és que les cèl·lules mare tenen disponibles fins a 60 divisions cel·lulars i quan una cèl·lula realitza la seva última divisió cel·lular mor automàticament. Llavors, aquell tros de teixit ja no té autoregeneració i això fa que vagi envellint poc a poc a mesura que les cèl·lules filles es van morint i no poden ser substituïdes per altres de noves.

El motiu de la presència d'aquestes cèl·lules mare adultes en els teixits madurs encara no té una explicació segura. La principal hipòtesis és que durant el desenvolupament embrionari aquestes cèl·lules es van mantenir al marge de la diferenciació que va afectar la resta de cèl·lules. D'aquesta manera, les cèl·lules van quedar indiferenciades i es van anar repartint pels diferents teixits del cos.

Tampoc se sap amb seguretat quins teixits contenen o no cèl·lules mare però cada vegada s'està ampliant més el nombre de teixits que sí que en contenen. Fins ara, s'han identificat cèl·lules mare adultes en els següents constituents: moll de l'os, sang perifèrica, cervell, medul·la espinal, polpa dental, vasos sanguinis, múscul esquelètic, epiteli de la pell, sistema digestiu, còrnia, retina, fetge, pàncrees, múscul cardíac, teixit adipós epicàrdic i teixit adipós subcutani.

Per tal d'identificar les cèl·lules mare adultes, cal que tinguin unes determinades propietats molt similars a les que ha de tenir qualsevol cèl·lula mare sigui embrionària o adulta. En primer lloc, han de tenir la capacitat d'autorenovar-se per tal de regenerar els teixits danyats de l'organisme. A més a més, han de ser capaces de crear noves cèl·lules mare genèticament idèntiques a elles i altres cèl·lules totalment diferenciades i especialitzades en una funció dins un determinat teixit.

Per tal de determinar si les cèl·lules mare adultes poden donar lloc a cèl·lules completament especialitzades hi ha tres procediments diferents:

- Determinant la presència de cèl·lules mare dins un teixit i després, rastrejant-les per tal de veure si realment donen lloc a noves cèl·lules especialitzades amb l'objectiu de regenerar el teixit.
- Aïllant les cèl·lules i trasplantant-les dins un organisme viu com podria ser un ratolí o un porc. Mitjançant aquest experiment controlaríem el comportament de les cèl·lules mare implantades per veure si realment són capaces de regenerar els teixits danyats.
- Aïllant les cèl·lules i cultivant-les "in vitro", sotmetent-les a diverses proves per tal de comprovar la seva funcionalitat. D'aquesta manera, podem provocar la diferenciació de la cèl·lula cap a un tipus cel·lular concret mitjançant l'addició de determinats gens o substàncies.

LA PLASTICITAT DE LES CÈL·LULES MARE ADULTES

Moltes cèl·lules mare presenten un fenomen que s'anomena plasticitat i, significa que tenen la capacitat de diferenciar-se també en un tipus cel·lular diferent del que trobem en el teixit en el qual estan situades.

Per tal de demostrar que les cèl·lules mare adultes poden generar altres tipus de cèl·lules cal fer un estudi i seguiment del seu comportament ja sigui "in vivo" o bé "in vitro". Així, es pot determinar si les cèl·lules mare adultes han adquirit les característiques principals tant a nivell estructural com bioquímic dels teixits en els quals es troben integrades. I també és important veure si les aquestes cèl·lules són capaces d'integrar-se per complet en el teixit i de sobreviure-hi.

Els resultats de diversos estudis confirmen la capacitat de les cèl·lules mare adultes de convertir-se en grups cel·lulars que no són propis dels teixits on es troben.

4.2.1.1.1. CÈL·LULES DE LA MEDUL·LA ÒSSIA

La regeneració de teixits amb cèl·lules mare procedents de la medul·la òssia és una pràctica terapèutica amb molt èxit actualment, que va ser desenvolupada arrel del descobriment de la presència de cèl·lules mare en el teixit hematopoètic. Teixit responsable de produir cèl·lules sanguínies i que es troba sobretot a la medul·la òssia però també a la melsa, els ganglis limfàtics i el timus.

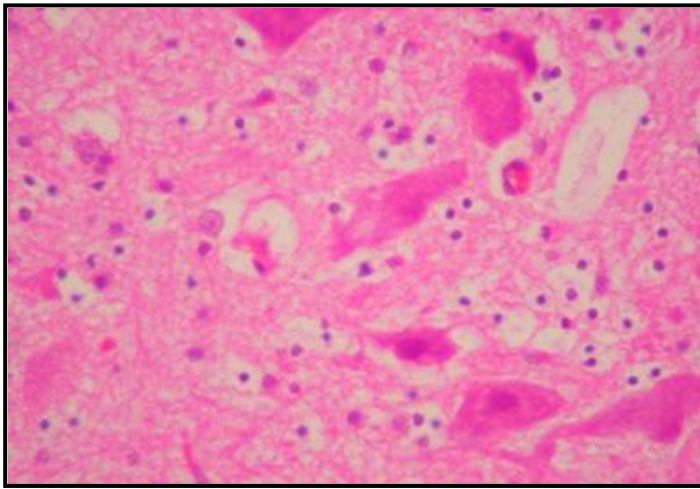


FIGURA 28: Imatge del teixit hematopoètic de la medul·la òssia.

Font:

http://biologiahumanapilar.blogspot.com/2009_11_01_archive.html

Les cèl·lules procedents dels teixits hematopoètics, tenen la capacitat de divisió de manera indiferenciada i, les cèl·lules filles intervenen sobretot en la formació d'eritròcits, granulòcits i monòcits, però també tenen la capacitat de diferenciar-se cap a altres grups cel·lulars diferents. S'ha estimat que la presència de cèl·lules mare en aquest teixit és d'entre 1/10000 i 1/100000. Degut a aquesta baixa quantitat de cèl·lules mare, s'han elaborat protocols per tal d'enriquir el teixit i aconseguir més quantitat de cèl·lules mare.

Una de les aplicacions més importants d'aquestes cèl·lules és la regeneració del teixit muscular cardíac, gràcies a diversos estudis s'ha descobert que exerceixen una influència positiva a la zona infartada deguda segurament a efectes hormonals. Trasplantant cèl·lules mare de la medul·la òssia al teixit cardíac, tenen una gran capacitat per regenerar-lo i evitar-ne la degeneració. Així, mitjançant el trasplantament d'una línia cel·lular de la medul·la òssia podem aconseguir que aquestes es diferenciïn cap a cardiomiòcits, cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars

l·lises que substituiran les cèl·lules mortes i per tant, formaran un teixit cardíac regenerat.

Tot i així, hi ha diferents hipòtesis sobre la capacitat d'aquestes cèl·lules per diferenciar-se a cardiomiòcits.

Alguns estudis assenyalen que els casos de diferenciació observats serien conseqüència de la fusió de les cèl·lules de la medul·la òssia amb cardiomiòcits i, que la major part de les cèl·lules trasplantades al cor donen lloc a cèl·lules hematopoètiques però no a cèl·lules cardíques.

Altres indiquen, que la permanència d'aquestes cèl·lules de la medul·la òssia al cor és molt breu, al voltant de quatre setmanes, tot i que insisteixen en la millora del funcionament cardíac probablement degut a una millora de la vascularització.

Per últim, alguns mostren indicis del contrari, és a dir, que les cèl·lules de la medul·la òssia sí que es diferencien a cardiomiòcits funcionals quan són implantades al cor.

Tots els resultats, coincideixen en que aquesta teràpia és beneficiosa per l'estat del pacient i la millora del funcionament cardíac.

De manera natural però, ja s'han trobat cèl·lules mare en el cor sa. Una hipòtesis sobre aquest fenomen és que aquestes poden haver migrat de la medul·la òssia i s'han incorporat en el teixit cardíac mort. Allà, s'han reproduït i madurat de manera que han donat lloc a cèl·lules cardíques i cèl·lules vasculars totalment diferenciades. Aquestes han regenerat una part del teixit afectat però no han aconseguit regenerar-lo totalment. Per això, per poder regenerar totalment el teixit cal implantar artificialment la quantitat de cèl·lules mare provinents de la medul·la òssia per tal de que el teixit danyat es regeneri totalment.

4.2.1.1.1.2. CÈL·LULES DEL TEIXIT ESQUELÈTIC (MIOBLASTS)

Constitueixen una població minoritària del múscul estriat*, un 3%, però tenen la capacitat de regenerar-lo. Van ser el primer tipus cel·lular implantat al cor, on van donar lloc a estructures contràctils. Fins al moment, han set la font de cèl·lules més utilitzada en estudis experimentals, tenint en compte que són cèl·lules amb una alta capacitat de proliferació "in vitro" i, que no presenten probabilitats de formar un tumor degut a que provenen d'un teixit.

En general, la seva implantació implica una millora de la funció cardíaca, ja sigui per la pròpia capacitat contràctil dels implants o pels efectes indirectes dels mateixos.

Per aquest motiu, aquesta font de cèl·lules es continua investigant degut a les característiques de les que disposa.

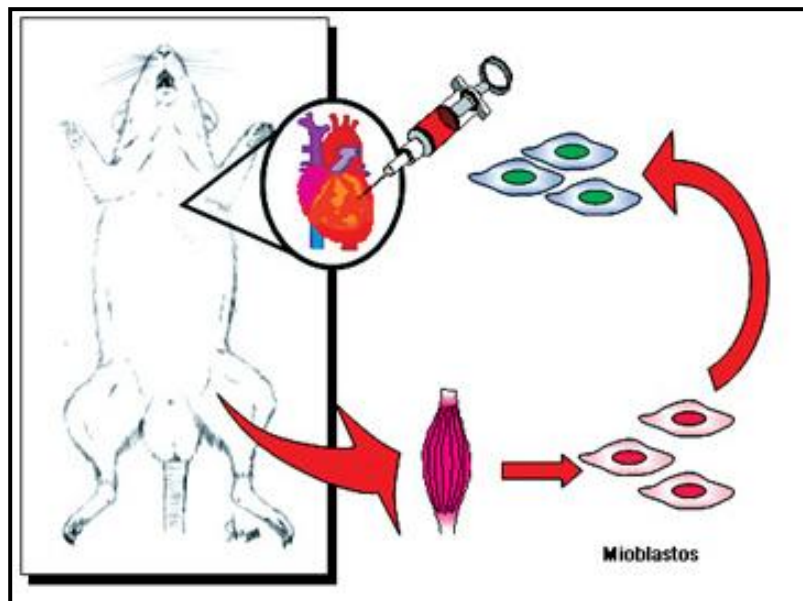


FIGURA 29: Esquema on es mostra la teràpia regenerativa cardíaca en un ratolí mitjançant mioblasts extrets del teixit muscular.

Font: Stem Cell information, Terese Winslow, Lydia Kibiuk.

4.2.1.1.1.3. CÈL·LULES MARE DEL COR

La hipòtesi alternativa és, que les cèl·lules mare ja es troben en el cor i que només és necessari un mecanisme d'estimulació que les faci desplaçar cap a la zona que ha quedat afectada després d'un infart de miocardi per poder reparar-la.

Hi ha grans descobriments que suporten aquesta hipòtesis. Per exemple, en un trasplantament cardíac en el que el donant era de sexe femení i el receptor masculí, es va veure que entre el 7 i el 10% de les cèl·lules cardíques del cor femení sa eren cardiomiòcits amb un cromosoma Y, que procedien del receptor masculí. Aquestes cèl·lules havien migrat cap al nou cor per tal de poder-lo reparar en cas que patís algun dany.

Només un de cada 200.000 cardiomiòcits es troben en el cicle cel·lular, és a dir, en estat de no diferenciació. Aquesta quantitat és insuficient per mantenir la regeneració del teixit cardíac durant molt temps i, el mecanisme és massa lent per a respondre a un cas catastròfic d'infart en el que moren milions de cardiomiòcits en poques hores.

Des d'aquest descobriment, la teràpia regenerativa cel·lular va agafar una gran força ja que es va veure que implantant cèl·lules mare procedents del cor a la zona on s'havia produït un infart cardíac, actuaven regenerant el teixit afectat.

Per aquest motiu, el que es fa és obtenir aquestes cèl·lules i cultivar-les "in vitro" per tal d'obtenir una població cel·lular més gran i que la teràpia sigui més eficaç.

4.2.1.1.1.3.1. CMPCs (cèl·lules mare del teixit cardíac auricular).

Fins fa poc, el cor era considerat un òrgan amb molt baixa capacitat per a regenerar-se. Però amb la descoberta de les CMPCs presents al cor, s'ha posat en dubte aquesta teoria ja que en representen una via de regeneració.

Tot i així, segueix essent un gran repte poder regenerar una zona afectada del miocardi.

Dins aquest camp, la comprensió dels processos de regulació de l'expansió i diferenciació de les CMPCs és clau per a poder desenvolupar noves teràpies per a curar les malalties cardiovasculars. Aquestes cèl·lules són extretes del teixit de l'aurícula del cor humà.

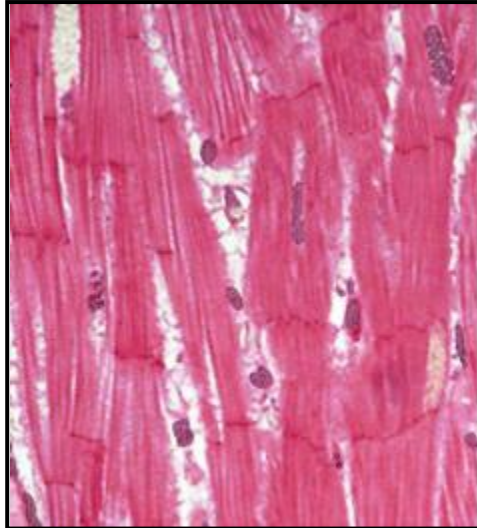


FIGURA 30: Imatge del teixit muscular cardíac de l'aurícula d'on s'extreuen les CMPCs.
Font: infermeravirtual.com

Diverses fonts de teixit cardíac poden ser utilitzades com a material de partida per obtenir CMPCs. En general, s'utilitza l'aurícula del cor humà que s'obté com a residu de les cirurgies cardíques com per exemple el reemplaçament de la vàlvula. Aquesta cirurgia genera residus d'aproximadament de 2-4 cm³ que són una excel·lent font de CMPCs.

Una altre font de teixit cardíac humà és el cor fetal, que s'obté després d'un avortament. Té molt bon resultat, ja que proporciona molta més quantitat de CMPCs i a més a més, la seva expansió és molt més ràpida degut a que es tracta de cèl·lules molt joves. Però, per extreure cèl·lules d'un fetus cal el consentiment informat dels implicats i per tant, moltes vegades és difícil disposar d'aquest material. D'altre banda les CMPCs es poden aïllar mitjançant petites mostres de biòpsia, posant amb comú almenys cinc biòpsies amb agulla.

Tot i que el nombre de cèl·lules que es pot obtenir a partir de les biòpsies és limitat, són una bona eina en investigació per comprendre millors els efectes que poden tenir determinades mutacions en la integritat dels cardiomiòcits.

Però la majoria de CMPCs s'obtenen a partir dels residus obtinguts en les cirurgies cardíques d'on són aïllades aquestes cèl·lules seguint un protocol ja establert.

Degut a que són les cèl·lules mare que més properes es troben als cardiomiòcits, el seu potencial cardiomiogènic és realment elevat, la seva eficàcia per a diferenciar-se a cardiomiòcits és del 80-90%.

Una altre avantatge, és que ja estan adaptades al medi on es troben els cardiomiòcits perquè és d'on les hem extret. Per tant, quan les introduïm de nou al teixit cardíac per regenerar-lo no tindran tants problemes d'adaptació.

Aquestes cèl·lules tenen la capacitat de poder-se duplicar fàcilment "ex vivo", de manera molt ràpida, sense perdre el seu estat indiferenciat. Proporcionant així, un elevat nombre de cèl·lules progenitores en cultiu que poden ser utilitzades per a dur a terme diversos experiments per veure la seva capacitat envers la regeneració cardíaca.

La seva diferenciació és relativament ràpida, es pot aconseguir en només 3-4 setmanes. Aquest tipus cel·lular, després de ser induït a la diferenciació, comença a expressar els gens que són necessaris per a formar les estructures complexes que formen els cardiomiòcits. Les cèl·lules, comencen a mostrar moviments d'excitació i contracció i potencials d'acció que recorden als de les cèl·lules cardíques ventriculars.

Tot i així, un cop acabada la diferenciació cap a cardiomiòcits, aquests no estan llestos per a ser trasplantats al cor dels pacients que han patit un infart cardíac.

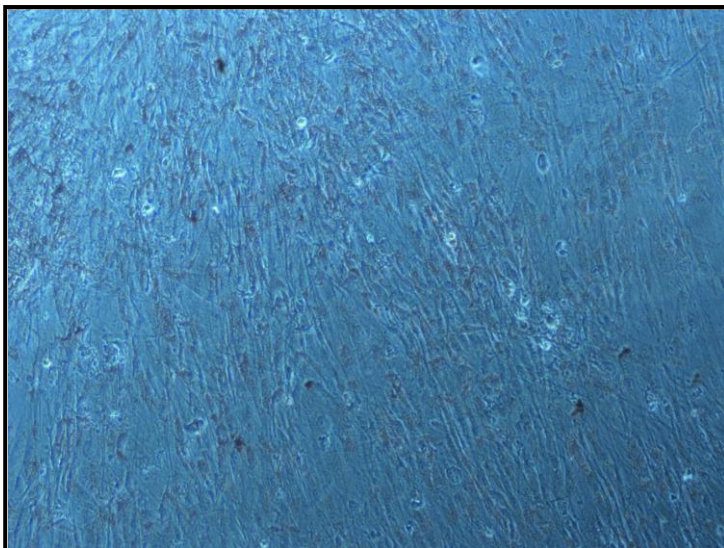


FIGURA 31: Imatge mitjançant el microscopi òptic d'un cultiu de CMPCs (x100).

4.2.1.1.3.2. CardiacATDPCs (cèl·lules mare del teixit adipós epicàrdic).

Les CardiacATDPCs van ser caracteritzades a partir de biòpsies del teixit adipós cardíac d'adults humans. En els éssers humans, es localitza sobretot a la base o arrel de l'aorta així com també en els solcs interventriculars i en el nòdul auriculoventricular.

Un dels problemes que poden presentar aquestes cèl·lules, que es troben en el teixit adipós cardíac que envolta el cor, és no ser fàcilment accessibles. Per aquest motiu, la majoria de mostres d'on s'aïlla aquest tipus cel·lular s'obtenen de les intervencions cardíaques que es porten a terme diàriament a tots els hospitals. L'obtenció de la mostra no implica risc addicional per al pacient o bé cost per al sistema sanitari.

Les cèl·lules presents en el teixit adipós cardíac tenen el potencial necessari per a diferenciar-se a llinatges de cèl·lules cardíaques i endotelials. Per això, la seva aplicació a l'infart cardíac ha donat com a resultat múltiples efectes beneficiosos. Fent pensar que poden ser candidats vàlids per al seu ús futur en la teràpia cel·lular per a regenerar el miocardi lesionat.

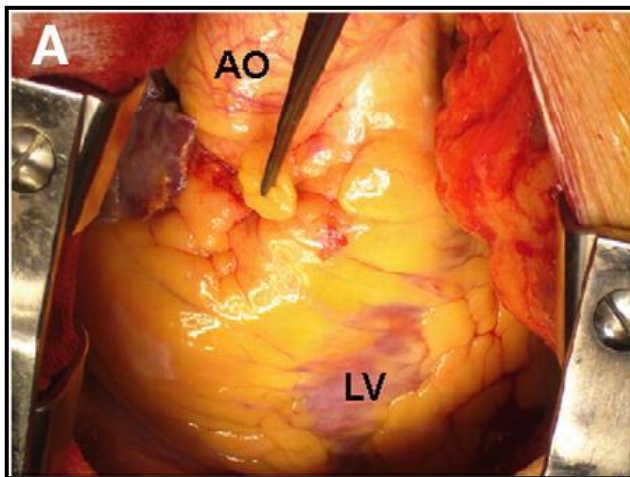


FIGURA 32: Imatge de l'extracció d'un fragment de teixit adipós cardíac extret de la base de l'aorta d'un pacient humà.
Font: Journal of Molecular and Cellular Cardiology.

Curiosament però, aquestes cèl·lules no tenen la capacitat de diferenciar-se cap a adipòcits a diferència d'altres llinatges de cèl·lules mare que sí que tenen aquesta capacitat. Això, denota menys plasticitat i una condició molt compromesa per part d'aquest tipus cel·lular.

Tot i així, les ATDPCs cardíques van demostrar la seva capacitat per a diferenciar-se “in vitro” en cèl·lules que s’assemblen molt als cardiomiòcits en cultiu, tan morfològicament com molecularment.

Així doncs, tenen la capacitat per a diferenciar-se cap a cèl·lules cardíques i per a millorar la funció cardíaca en viu. Diversos estudis han demostrat l’influència positiva d’aquestes cèl·lules en diferents models animals d’infart de miocardi. On el transplantament d’aquestes cèl·lules al cor dóna lloc a una millora de la funció cardíaca. Provoquen un clar augment de la densitat capil·lar en el cor infartat i, indueixen a la formació de nous vasos afavorint la reducció de la mida de l’infart cardíac.

També s’ha observat que la reducció de la mida de l’infart és dues vegades més gran que l’observada per a la injecció de cèl·lules mare de la medul·la òssia, cèl·lules mare adultes cardíques o cèl·lules procedents del greix subcutani sota les mateixes condicions ambientals.

Per a tots aquests motius són uns candidats prometedors i segurs per al seu ús futur en la teràpia cel·lular per a regenerar ferides de miocardi.

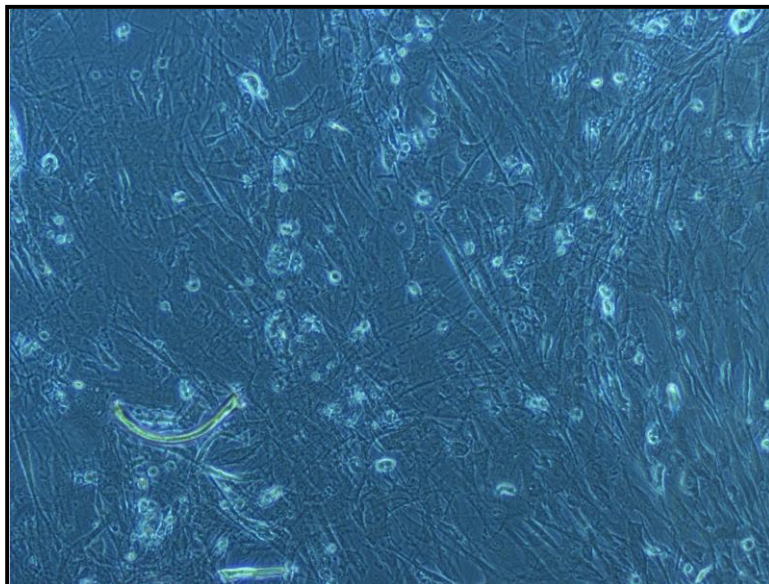


FIGURA 33:
Imatge d'un cultiu de cardíacATDPCs realitzada amb microscopi òptic (x100)

4.2.1.1.1.3.3. SubATDPCs (cèl·lules mare del teixit adipós subcutani).

Aquestes cèl·lules s'obtenen del teixit adipós subcutani que s'obté com a residu de les intervencions quirúrgiques i poden ser mantingudes "in vitro" durant llargs períodes de temps. S'aïllen segons el protocol esmentat a l'apartat de materials i mètodes. Són fàcils d'obtenir i, igual que les cardiacATDPCs no representen un risc afegit per a la salut del pacient.

Tenen la capacitat de diferenciar-se "in vitro" cap adipòcits, condrocits i osteòcits degut a la presència de factors d'inducció d'un llinatge específic, demostrant així la seva multi potencialitat. Però només mantenen la seva capacitat de diferenciació fins com a màxim quinze passatges després de la seva sembra.

El seu paper encara no està del tot clar, però es creu que constitueixen una font de reserva per al manteniment i la reparació dels teixits cel·lulars de l'organisme.



FIGURA 34: Imatge d'un cultiu de subATDPCs realitzada amb el microscopi òptic (x100).

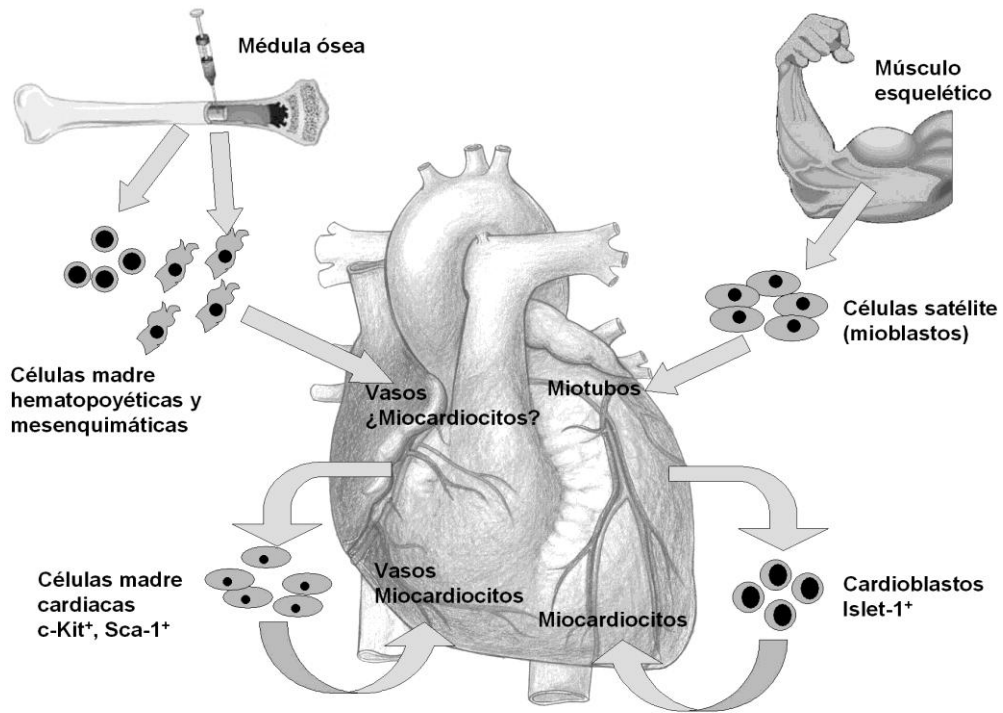


FIGURA 35: Esquema que mostra les possibilitats de teràpia cel·lular en regeneració cardíaca.
Font: Stem Cell information, Terese Winslow, Lydia Kibiuk.

4.2.1.1.2. CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES

Aquestes cèl·lules deriven dels embrions, es troben en els estadis més inicials de la formació de l'embrió concretament el de blastocist. En aquesta etapa, l'embrió està format per entre 50 i 150 cèl·lules la majoria, cèl·lules mare indiferenciades.

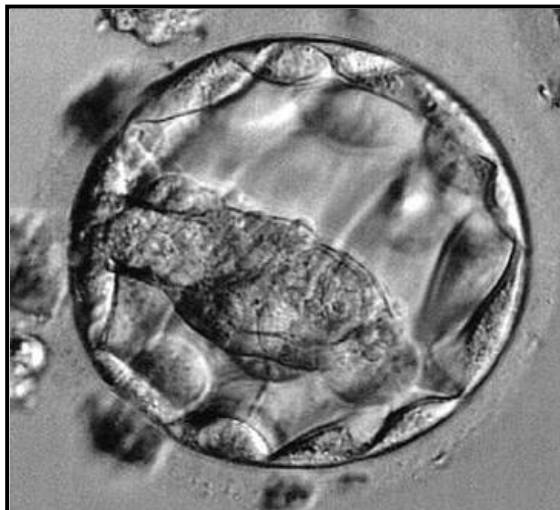


FIGURA 36: Imatge d'un blastocist humà d'on es poden obtenir gran quantitat de cèl·lules mare embrionàries.
Font: C.A.B.A

No van poder ser aïllades en humans fins l'any 1998, en canvi, les cèl·lules mare adultes ja s'estaven estudiant des de 1960. Per aquest motiu, encara estan poc estudiades i queden moltes coses per investigar respecte al seu funcionament i la seva capacitat per regenerar teixits danyats.

Un altre factor en contra, és el fet que per obtenir aquestes cèl·lules cal la destrucció d'un embrió i per tant, d'un ésser humà. Així, sorgeixen gran quantitat de problemes morals, polítics i ètics que fan frenar la investigació amb aquestes cèl·lules mare. Els investigadors han buscat tècniques alternatives per extreure aquest tipus de cèl·lules, sense que això representi la destrucció d'un embrió.

Una d'aquestes alternatives és el cordó umbilical. Les cèl·lules que el constitueixen ja s'utilitzen actualment per tractar algunes malalties com: malaltia de Gunther, síndrome de Hunter, Hurler i leucèmia limfòcita aguda.

Actualment, es comencen a activar projectes de bancs de cordons umbilicals on els pares que acaben de tenir fills poden deixar un tros de cordó umbilical que es neteja i es conserva en nitrogen líquid per tal de poder ser utilitzat per a curar una possible futura malaltia.

- **PROCÉS DE CARACTERITZCIÓ:**

Mitjançant aquest procés, es comprova que les cèl·lules que es tenen en cultiu són realment cèl·lules mare embrionàries. Es porta a terme un anàlisi de les característiques fonamentals de les cèl·lules per veure si coincideixen amb les característiques de les cèl·lules mare embrionàries.

Les proves que s'han de dur a terme encara no estan del tot establertes i, tots els laboratoris fan les que creuen més adients per comprovar si realment tenen o no cèl·lules mare embrionàries. Algunes de les proves són:

- Creixement i subcultiu de les cèl·lules mare durant un període de temps llarg, diversos mesos. Verificant així, que les cèl·lules són capaces de créixer a llarg termini i d'autorenovar-se a mesura que va passant el temps. És necessari fer un seguiment continu de les cèl·lules, observant-les al

microscopi per tal d'assegurar que creixen amb normalitat i que romanen sempre indiferenciades.

- Cal observar si les cèl·lules contenen factors de transcripció típics i específics de les cèl·lules indiferenciades. Dos dels factors més importants són Oct4 i Nanog, ajuden a convertir els gens de la cèl·lula en el moment en què s'ha de produir la diferenciació de la cèl·lula i el desenvolupament embrionari.
- S'utilitzen tècniques per determinar la presència de marcadors que es troben a la superfície cel·lular i que són específics de cèl·lules indiferenciades.
- Cal comprovar que les cèl·lules tenen la capacitat de reproduir-se i renovar-se després de ser congelades i descongelades.
- Comprovar que les cèl·lules mare embrionàries són pluripotents, és a dir, que es poden diferenciar de manera espontània cap a un determinat grup cel·lular.

Les cèl·lules mare embrionàries gaudeixen doncs de la seva gran capacitat de diferenciació, però s'enfronten a gran quantitat de problemes ètics i a l'elevat potencial per a la formació de tumors. Hi ha doncs, risc d'un creixement no regulat si no es controla acuradament la seva proliferació.

Cal tenir present l'història familiar dels embrions, degut a que si aquest conté antecedents de malalties cardiovasculars no pot serà el més adequat per a la derivació de cèl·lules mare amb la intenció de regenerar el teixit danyat del cor.

És per aquesta sèrie d'inconvenient que les cèl·lules embrionàries encara no són una solució del tot segura per a la regeneració del teixit cardíac.

4.2.1.2. FORMES D'ADMINISTRACIÓ DE LES CÈL·LULES SOBRE EL TEIXIT INFARTAT:

Cal trasplantar el nombre suficient de cèl·lules i arribar a la màxima retenció possible d'aquestes a la regió danyada del miocardi. És important el lloc d'administració de les cèl·lules, no tan sols perquè les cèl·lules vagin a parar amb certesa al lloc de la lesió, sinó també perquè les cèl·lules semblen diferenciar-se cap al tipus cel·lular més proper al lloc on han estat injectades.

Les cèl·lules s'han d'implantar a una zona perifèrica de la zona afectada per l'infart ja que sinó, la possibilitat de la seva mort és molt elevada deguda a la baixa presència de nutrients i oxigen que presenta el miocardi infartat.

Les principals rutes d'administració de les cèl·lules es mostren a la figura següent:

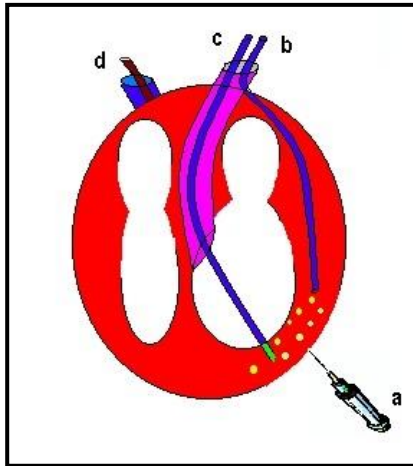


FIGURA 37: Imatge de les principals vies d'administració de les cèl·lules mare al cor.

- a) transepicàrdica b) intracoronària
- c) transendocàrdica d) intravenosa

Font: Stem Cell information, Terese Winslow, Lydia Kibiuk.

Algunes de les vies són:

- **TRANSVASCULAR:**
 - **Via intravenosa:** Consisteix en la injecció de les cèl·lules al torrent sanguini. Té l'avantatge de ser un procediment simple, que pot ser emprat en casos d'infart agut. El desavantatge és que la dispersió de les cèl·lules cap a altres òrgans redueix el nombre de cèl·lules que arriben al miocardi i s'adhereixen a ell.
 - **Infusió intracoronària:** Les cèl·lules són injectades a través d'un capil·lar intracoronari i depenent del lloc on es trobi, les cèl·lules es dispersen per l'artèria coronària o bé es situen en una àrea específica del miocardi. Aquesta tècnica és molt eficaç en les cardiopaties en què no existeix una zona d'infart ben delimitada, les cèl·lules es dispersen a través de la circulació coronària cap a les diferents àrees afectades.
 - **Mobilització de les cèl·lules de la sang perifèrica:** Consisteix en l'ús de factors estimuladors de mobilització de les cèl·lules mare endògenes, sense realitzar-ne extracció. Basat en la hipòtesi que les

cèl·lules migren cap a l'àrea del teixit afectada mitjançant un mecanisme d'atracció.

- **INJECCIÓ DIRECTE AL MÚSCUL CARDÍAC**

Ruta més eficaç en pacients en fases més avançades de la degeneració del teixit cardíac:

- **Per via transepicàrdica:** Les cèl·lules s'injecten directament a la zona afectada del miocardi. Teòricament, representa la forma més precisa d'administració de les cèl·lules i ha estat la via més utilitzada en els estudis clínics
- **Via transendocàrdica:** Es porta a terme mitjançant una succió del miocardi que permet determinar quina zona està afectada i quina no, augmentant la precisió en el moment d'injectar les cèl·lules.
- **A través de les venes coronàries:** Les cèl·lules s'injecten de forma paral·lela a la paret del ventricle amb més profunditat.

- **INTRODUCCIÓ DE LES CÈL·LULES A PARTIR D'UNA MATRIU DE SUPORT**

Les cèl·lules s'introdueixen sobre l'infart cardíac mitjançant un "parxe" o "tirità". Es troben immerses dins una matriu que les protegeix i n'evita la dispersió excessiva, aconseguint així que la majoria de cèl·lules vagin al lloc on es desitja.

En els experiments realitzats amb aquest mètode s'ha pogut comprovar una millora del teixit infartat deguda a l'acció de les cèl·lules mare.

TREBALL DE CAMP

5. MATERIAL I MÈTODES

En aquest apartat citarem els principals mètodes i materials necessaris per tal de poder cultivar les cèl·lules mare procedents del cor. Per després poder fer tots els experiments necessaris amb aquestes.

5.1. PROTOCOLS AÏLLAMENT CEL·LULAR

5.1.1. AÏLLAMENT CEL·LULAR DE LES cardiacATDPCs i les subATDPCs.

Per aïllar mostres de cèl·lules mare d'aquests dos teixits primer de tot cal obtenir una mostra d'aquests. Les mostres s'obtenen de les cirurgies cardíacues rutinàries que es duen a terme en els quiròfans de l'hospital. Durant les quals els cirurgians extreuen petites mostres que guarden de manera totalment estèril dins de falcons amb sèrum fisiològic. Un cop s'ha anat a recollir la mostra al quiròfan ja es pot començar el procés d'aïllament cel·lular.

En aquest cas l'aïllament cel·lular es porta a terme amb mostres de greix epicàrdic (aproximadament 0,5-1g) el qual s'obté de la base de l'artèria aorta i greix subcutani (5g) que s'obté d'entre la pell i l'estèrnum. El protocol per a aquestes dues mostres és el mateix i es tracta d'una adaptació del descrit per Martínez-Estrada i col·laboradors:

Abans de començar cal col·locar tot el material necessari dins de la campana ja que aquest procés s'ha de dur a terme en condicions totalment estèrils. Sinó els resultats dels experiments que es poden dur a terme amb les cèl·lules resultants de l'aïllament podrien resultar alterats.

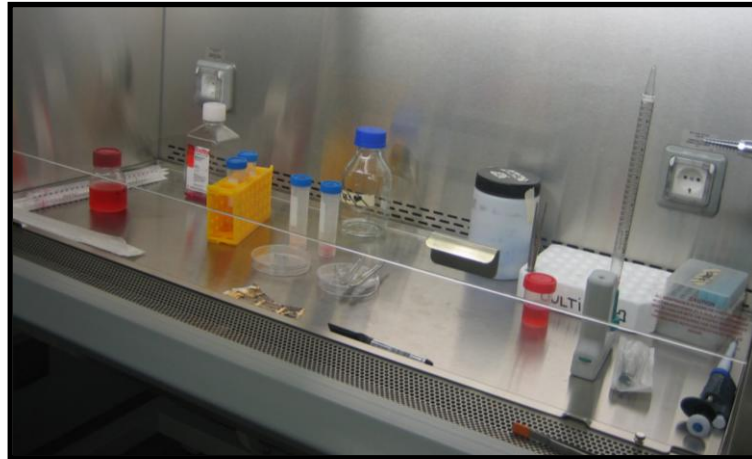


FIGURA 38: La següent imatge mostra tot el material necessari per a realitzar l'aïllament cel·lular d'una mostra de greix epicàrdic i una altre de greix subcutani. Tot el material ha d'estar completament estèril per aquest motiu es treballa sempre dins de la campana.

1. Rentat de la mostra amb PBS (solució salina) per extreure totes les restes que hagin pogut quedar a la mostra com per exemple la sang.

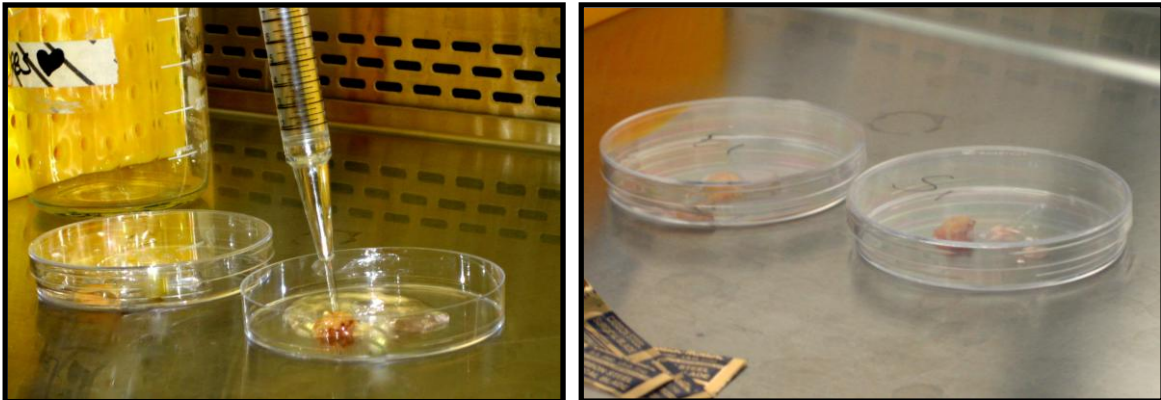


FIGURA 39 i 40: En les següents imatges podem observar les dues mostres de greix cada una dins una placa de petri on també col·loquem PBS i fem el rentat. A l'esquerre de les fotografies hi trobem la mostra de greix epicàrdic i a la dreta la de greix subcutani.



FIGURA 41: Mostra de greix epicàrdic extreta d'un pacient durant una intervenció quirúrgica.

2. Tallem la mostra en petits fragments mitjançant un bisturí, intentem eliminar totes les restes de vasos i altres substàncies de rebuig per tal de reduir la contaminació de les cèl·lules que és el que ens interessa. Aquest procés rep el nom de digestió mecànica.

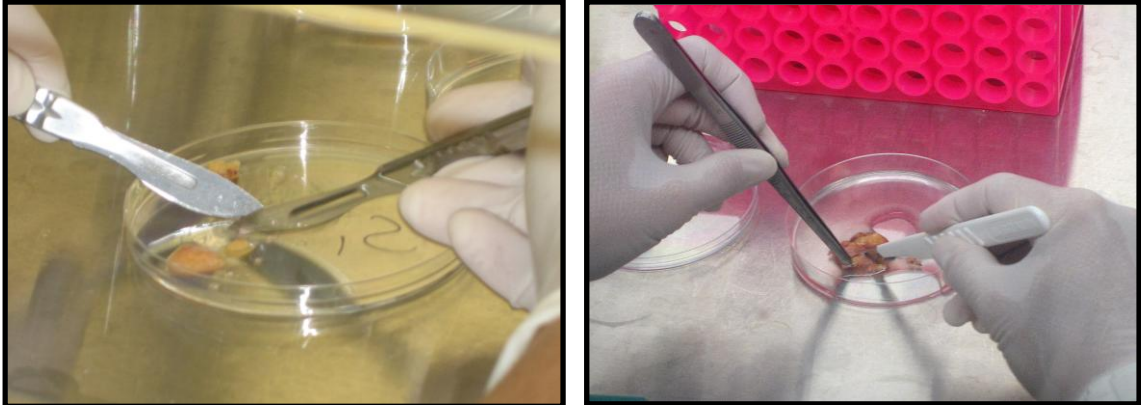


FIGURA 42 i 43: En la imatge veiem com es talla la mostra dins la mateixa placa on s'ha fet el rentat. Ho fem mitjançant dos bisturins o bé amb un bisturí i unes pinces. Mostra de greix subcutani a l'esquerre i de greix epicàrdic a la dreta.

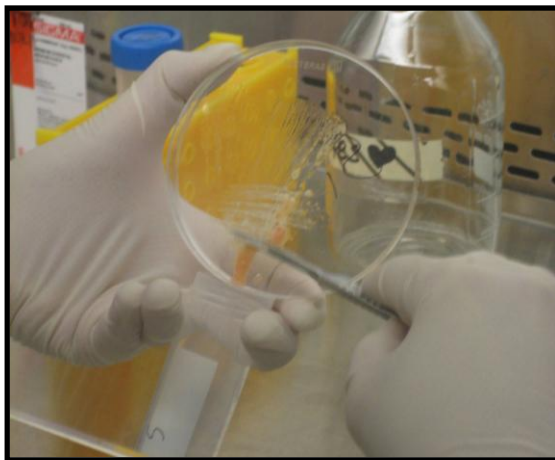


FIGURA 44: Un cop la mostra està disgregada la col·loquem dins un altre recipient.

3. Afegir a la mostra 10ml de solució estèril al 0,05% de col·lagenasa II (5mg de col·lagenasa / 10 mL α -MEM). Ho deixem actuar durant 30 min a 37°C i amb agitació constant. Cada 10 minuts podem ajudar en la disgregació pipetejant la solució amb una pipeta de 25 mL. És el que es coneix com a digestió química.



FIGURA 45: Pesem la col·lagenasa que necessitarem per elaborar la solució al 5%.



FIGURA 46: Per afegir la col·lagenasa dins el recipient necessitarem un embut i una xeringa per tal que la solució de col·lagenasa sigui totalment estèril.

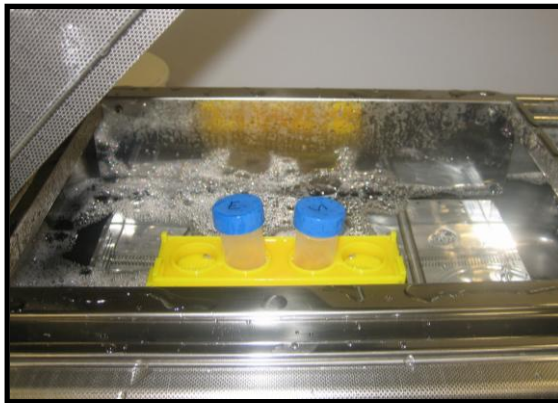


FIGURA 47 i 48: En la imatge observem els recipients, amb les dues mostres, dins un bany que els mantindrà amb agitació constant i a una temperatura de 37°C per tal de facilitar l'actuació de la col·lagenasa.

4. Afegir 10 mL de medi complet (medi α -MEM + 10% FBS (sèrum) + 1% P/S + 1% L-Gln) per tal d'inactivar l'acció de la col·lagenasa ja que sinó aquesta acabaria malmetent les cèl·lules. Al afegir-hi medi, la col·lagenasa passa a trencar els enllaços dels nutrients i deixa d'actuar disgregant el teixit.



FIGURA 49 i 50: En les imatges anteriors s'observa el moment en què s'afegeix el medi complet per tal d'inactivar la col·lagenasa.

5. Centrifugar la suspensió durant 10 min a 1200xg per tal de que les cèl·lules sedimentin al fons del recipient.
6. Eliminar el sobrenedant (restes de rebuig que han quedat suspeses) i tornar a col·locar medi complet per tal de tornar a obtenir una suspensió però aquest cop sense col·lagenasa.

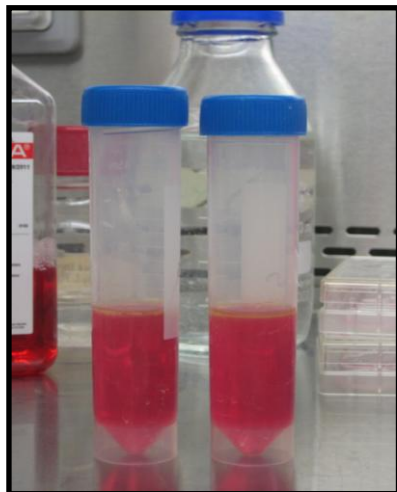


FIGURA 51: Les dues mostres després de sortir de la centrifugadora. Podem apreciar el sobrenedant a la part superior.



FIGURA 52: Extraiem tot el medi de cultiu de la part superior vigilant de no endur-nos les cèl·lules.

7. Col·locar la suspensió cel·lular dins un pouet i col·locar-ho tot dins l'incubador on es cultivaran a 37°C en atmosfera al 5% de CO₂.



FIGURA 53: Col·loquem la solució de les mostres cada una dins un pouet d'una placa que és on creixeran i les mantindrem en cultiu.

8. Al cap de 48h retirem el medi per tal d'eliminar les cèl·lules que no s'han enganxat i afegim medi complet nou dins el pouet.

A partir d'aquí, cal anar canviant el medi de les cèl·lules regularment dos cops per setmana. També s'ha de controlar el seu creixement per tal de saber quan cal fer una tripsinització per evitar la falta d'espai de les cèl·lules i per tant, la seva possible mort.

5.1.2. AÏLLAMENT CEL·LULAR DE LES CMPCs.

Les cèl·lules que s'aïllen del teixit cardíac de les aurícules segueixen un procés una mica diferent dels dos teixits esmentats abans. Es tracta d'un procés més complicat i llarg, té una durada de 5 hores, ja que aquestes mostres són més heterogènies que les anteriors ja que contenen molts tipus cel·lulars diferents. Hi ha també més interès en què les mostres siguin el més pures possibles ja que, contenen menys quantitat de cèl·lules mare que les mostres de greix epicàrdic i subcutani.

Tot i així el procediment d'aïllament no varia gaire. Tots els passos s'han de dur a terme de manera més acurada i precisa per extreure el màxim nombre de cèl·lules possible.

El què és important és que la col·lagenasa ha d'actuar com a mínim mitja hora ja que ha de disgregar un teixit com ja hem dit més heterogeni que l'anterior. A més a més, després s'ha de fer una filtració per fer desaparèixer el màxim de brutícia possible i que per tant, la mostra quedi més neta.

Així, al final d'aquest procediment obtindrem cèl·lules mare procedents del teixit de l'aurícula que sembrarem en els seu corresponents flascons on deixarem que proliferin.

5.2. PROTOCOL PER A TRIPSINITZAR LES CÈL·LULES

A mesura que les cèl·lules mare van creixent en el seu cultiu corresponent, cada cop ocupen més espai i per tant, arriba un moment que no tenen espai suficient per créixer i reproduir-se ja que tot l'espai està ocupat. És llavors quan hem de fer la tripsinització del cultiu de cèl·lules ja que sinó, no podrien dur a terme les seves funcions vitals i s'acabarien morint degut a la falta d'espai dins el flascó.

Quan tenim les cèl·lules dins un flascó estan totalment repartides i enganxades a la zona inferior. Per tant per canviar-les de flascó cal que seguim el procediment següent per desenganxar-les i poder-les moure sense que els fem cap mal. El procediment segueix el protocol següent:

S'ha de fer en condicions estèrils per aquest motiu, necessitem preparar tot el material necessari abans de començar i col·locar-lo dins de la campana.

Material: PBS, Tripsina, pipetes, medi de cultiu complet, pipetejador, flascons de cultiu cel·lular.

- 1) Extreure el medi brut de l'interior del flascó mitjançant una pipeta i el pipetejador.



FIGURA 54: Extracció del medi vell de dins el flascó.

- 2) Rentat amb PBS per tal d'acabar d'extreure les restes de medi que hagin pogut quedar. D'aquesta manera evitarem que la tripsina es distregui actuant sobre el medi i només es centri en desenganxar les cèl·lules que és el que ens interessa.



FIGURA 55: Afegim el PBS: aproximadament 10mL si es tracta d'un flascó gran com en aquest cas i si és petit, 7mL aproximadament.

- 3) Afegir la Tripsina, que hem extret una estona abans de la nevera perquè agafi la temperatura ambient, a l'interior del flascó de manera que cobreixi només la zona on es troben les cèl·lules enganxades. Deixem actuar la tripsina durant cinc minuts, posem el flascó dins l'incubador.

*La Tripsina actua millor a 37° però aquesta temperatura ja l'assolirà un cop tornem a posar la mostra dins l'incubador.



FIGURA 56: Moment en el que pipetegem 2mL de tripsina per col·locar-ho dins el flascó. Si es tractés d'un flascó petit seria 1mL.

- 4) Un cop transcorreguts els cinc minuts, afegir medi complet al flascó per tal que la tripsina deixi d'actuar sobre les cèl·lules ja que sinó les acabaria matant.

Al afegir aquest medi el tirem directament on estaven enganxades les cèl·lules per acabar de desenganxar totes, això no ho farem mai quan no vulguem que es desenganxin les cèl·lules. La quantitat de medi és la mateixa que de PBS 10mL en el cas dels flascons grans i 7mL en el cas dels petits.



FIGURA 57: En la imatge observem com afegim 10mL de medi al flascó que conté 2mL de tripsina.

- 5) Treure tot el contingut del flascó i posar-ho dins un falcon.

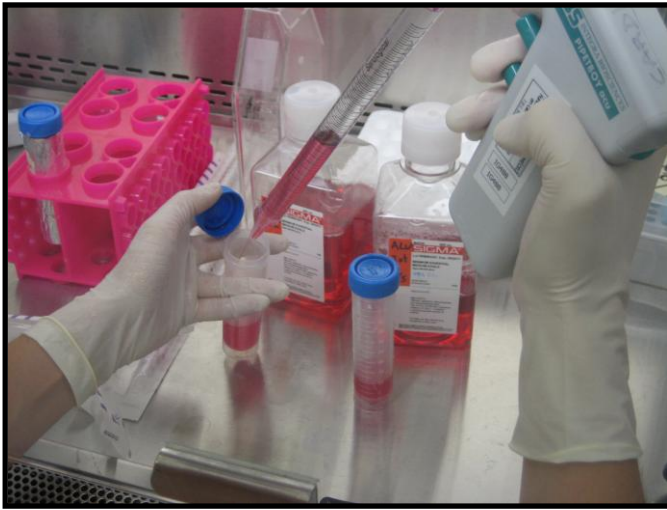


FIGURA 58:

Mitjançant una pipeta de 25mL canviem de recipient les cèl·lules, en aquest cas les passem en un falcon.

- 6) Centrifugar les cèl·lules durant 10 minuts a 1200 rpm per tal de poder-les separar de la solució que conté medi complet i tripsina.



FIGURA 59 i 60: Centrifugació dels falcons, cal tenir en compte que per centrifugar la centrifugadora ha d'estar equilibrada. Per tant, sempre col·locarem recipients amb la mateixa quantitat de líquid en posicions oposades.

- 7) Extreure el medi brut i la tripsina deixant a l'interior del falcon només les cèl·lules mare que han sedimentat al fons.

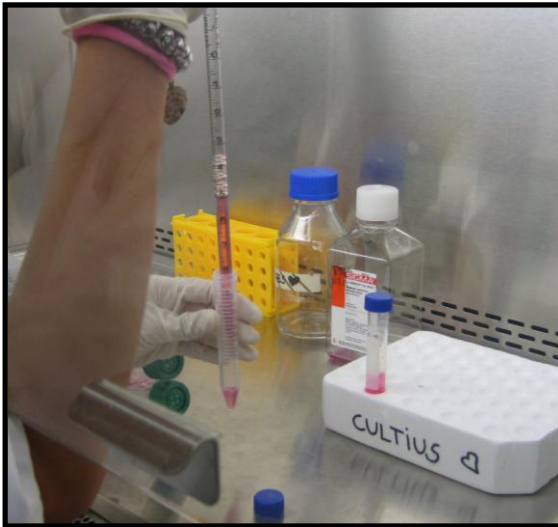


FIGURA 61: En la imatge veiem com amb l'ajuda d'una pipeta i el pipetajador extraiem el medi amb tripsina per evitar que aquesta pugui fer mal a les cèl·lules.

- 8) Col·locar les cèl·lules en flascons nous, el nombre de flascons dependrà de la quantitat de cèl·lules que tinguem. Abans cal comptar-les mitjançant la cambra de Neubauer.
- 9) Afegir el medi i moure lleugerament el flascó per tal que les cèl·lules es dispersin i no ens quedin totes situades en el mateix lloc. Tindran així més espai per anar creixent i les podrem tenir durant un període de temps més llarg sense haver-les de tripsinitzar un altre cop.

Cada tripsinització que fem a les cèl·lules rep el nom de passatge i cal que els anotem per tal de controlar les vegades que un cultiu cèl·lules ha estat canviat de flascó. Quan més passatges s'han fet a un cultiu cel·lular, més velles són les cèl·lules que el constitueixen.

5.3. PROTOCOL PER A CONGELAR LES CÈL·LULES

MATERIAL: Medi complet (escalfat prèviament), pipetes (5mL, 10mL i volums inferiors), Pipetboi, Dimetilsulfòxit (evita que es formin cristalls dins les cèl·lules).

1. Extreure les cèl·lules del flascó en el qual es troben en cultiu per tal de traspasar-les en el recipient en què les congelarem. Per fer això cal tripsinitzar les cèl·lules.
2. Fer un recompte de les cèl·lules per saber el nombre que en congelarem.
3. Col·locar aproximadament 10.000 cèl·lules dins d'uns tubs molt petits anomenats criotub. Les cèl·lules estan dins una solució composta per medi α -MEM, 20% de FBS (sèrum) i 10% de DMESEO (producte tòxic a temperatura ambient que evita que durant la congelació es formin cristalls dins les cèl·lules que podrien matar-les).
4. Guardar els tubs dins un recipient anomenat Culler. La seva funció és evitar que les cèl·lules es congelin de manera instantània sinó que ho vagin fent gradualment. Això es degut a que el Culler conté alcohol pur el qual no es congela directament sinó que va assolint la temperatura de manera gradual. Aquest s'introdueix dins el congelador en el mínim temps possible ja que sinó el DMESEO podria matar les cèl·lules.

Per tal de congelar les cèl·lules durant un període de temps curt ho fem al congelador de -80° . Si al cap d'uns mesos encara no les necessitem per cap experiment les traspasarem als tancs de nitrogen que tenen una temperatura de -196°C .

5.4. PROTOCOL PER A DESCONGELAR LES CÈL·LULES

Preparar tot el material necessari dins la campana ja que el procés de descongelació ha de ser molt ràpid. Sinó el DMESEO, el producte tòxic a temperatura ambient que hem introduït al medi al congelar les cèl·lules, al descongelar-se podria fer malbé les cèl·lules fins al punt de matar-les.

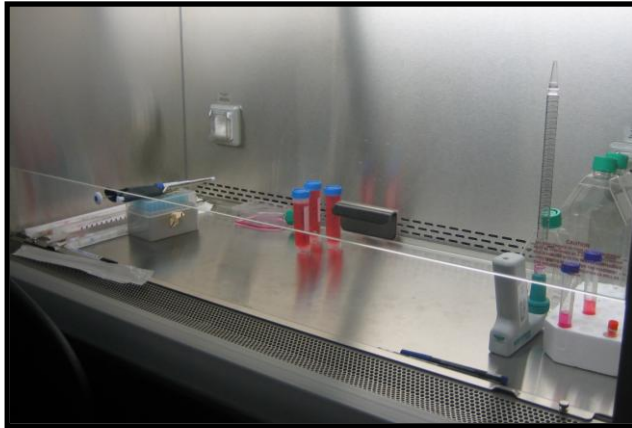


FIGURA 62: Igual que en altres protocols anteriors el material ha de ser totalment estèril per aquest motiu el col·loquem dins de la campana.

1. Extreure els criotubs que contenen les cèl·lules del congelador.



FIGURA 63: En la següent imatge podem observar un criotub, recipient en el qual es congelen les cèl·lules. En aquest cas cèl·lules anomenades CMPCs.

2. Posar el tub dins el bany i agitar-ho per tal de descongelar-les. Cal vigilar no acabar de submergir el tub del tot ja que podria ser que se'ns contaminessin les cèl·lules.



FIGURA 64: Bany que es troba aproximadament a uns 37°C de temperatura. Descongelem les cèl·lules ràpidament i evitem que el DMESEO pugui afectar-les.

3. Canviar les cèl·lules de recipient. És important no tirar el tub del qual hem extret les cèl·lules per tal de saber tota la seva informació i poder-la apuntar a la nova etiqueta.

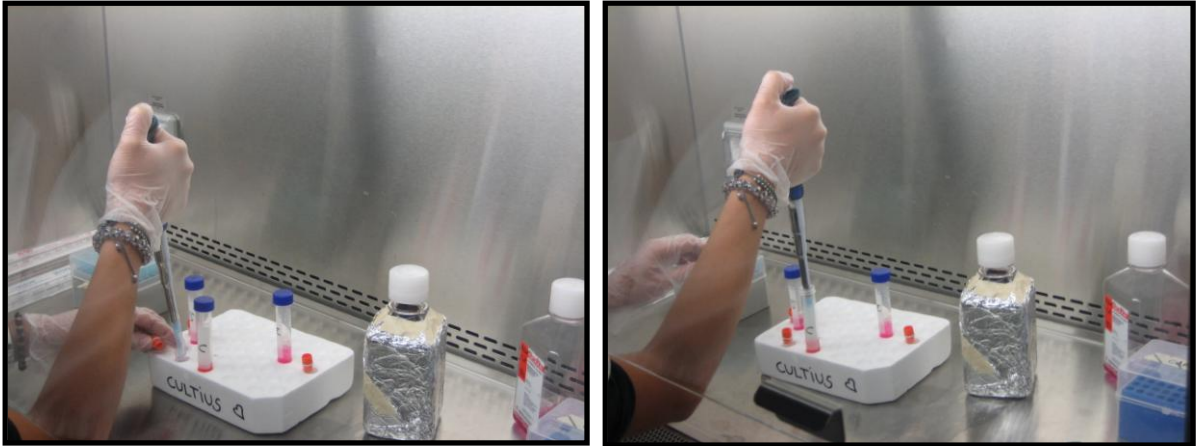


FIGURA 65 i 66: En les imatges s'observa com extraiem les cèl·lules del criotub i les traslladem a un tub més gran (falcon) per tal de poder-les centrifugar després.

4. Centrifugar durant 5 minuts per tal de que les cèl·lules sedimentin al fons i extreure el medi amb el producte tòxic per tal que no faci malbé les cèl·lules.

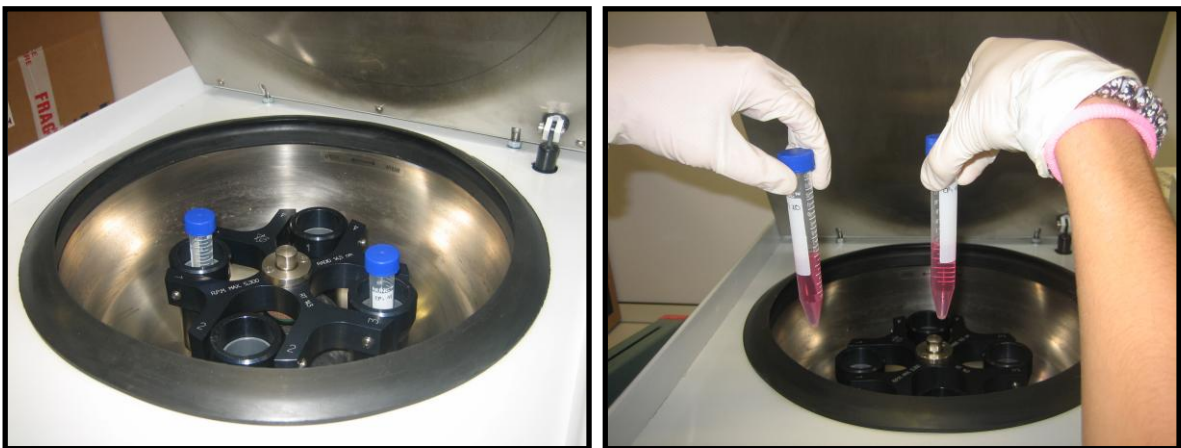


FIGURA 67 i 68: En les imatges interiors podem veure la centrifugadora que utilitzem per tal de que les cèl·lules sedimentin al fons i que així la separació de les cèl·lules del medi sigui més fàcil.

5. Extreure el medi dels tubs deixant només el pelet (cèl·lules sedimentades). Afegir medi complet nou i resuspendre les cèl·lules per tal de que quedin repartides uniformement.



FIGURA 69: La imatge mostra en el moment en què s'extreu el medi amb el DMSESO i només es deixen les cèl·lules.

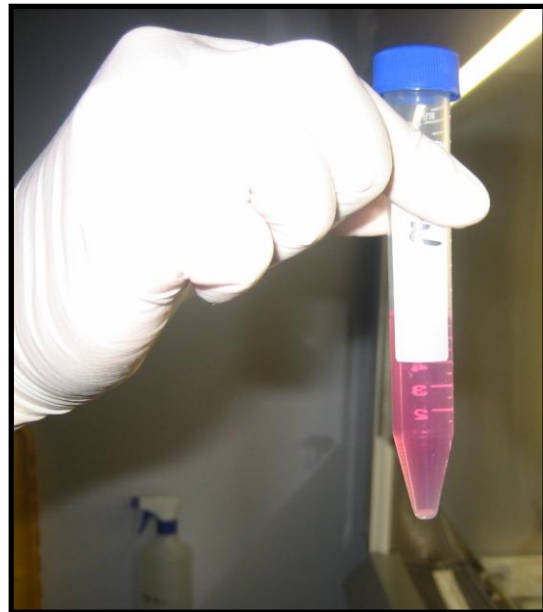


FIGURA 70: Tub amb medi complet nou i les cèl·lules repartides uniformement.

6. Traslladar les cèl·lules a un nou flascó i apuntar en aquest tota la informació que és important saber: tipus cel·lular, data de descongelació, passatge en el qual es troben i si el pacient era diabètic o no.

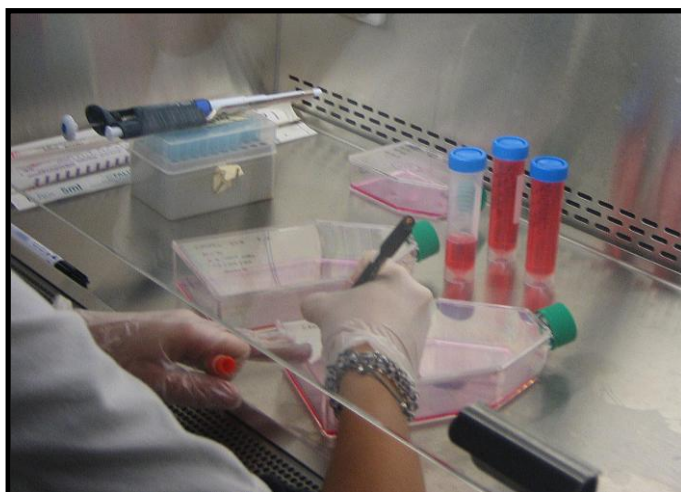


FIGURA 71: Retolació dels flascons on hem sembrat les cèl·lules descongelades.

7. Moure el recipient que conté les cèl·lules perquè quedin repartides uniformement i no creixin totes en un determinat lloc. Per últim, introduir les cèl·lules dins l'incubador, allà per si soles s'enganxaran al fons del flascó.



FIGURA 72: Incubador que manté les cèl·lules a 37°C de temperatura per tal de que la seva proliferació sigui més eficaç.

5.5. MEDIS

5.5.1. MEDI DE CULTIU

Per cultivar les cèl·lules durant un període de temps llarg, necessitem anar canviant el medi en el qual es troben perquè no se'ls esgotin mai els nutrients ni les substàncies necessàries per a la seva supervivència. El canvi de medi es porta a terme dos cops per setmana, aproximadament cada 3-4 dies.

La composició del medi és la següent:

- 500mL de medi base α -MEM en el cas de les cardiacATDPCs i les subATDPCs i medi m-199 en el cas de les CMPCs.
- Suplements:
 - 10% de sèrum fetal boví.
 - 1% Penicil·lina/Estreptomicina 100X
 - 1% L-Glutamina 200mM, 100X

El procediment que cal seguir per elaborar el medi complet és el següent:

1. Col·locar tot el material necessari dins la campana, el medi com tot el que entra en contacte amb les cèl·lules ha de ser completament estèril.
2. La quantitat total de medi que volem obtenir és de 500mL per tant, el primer que hem de fer és extreure una mica de medi del recipient per tal de que al afegir-hi els suplementes la quantitat sigui exactament de 500mL.
3. Mitjançant una pipeta afegir tots els complements dins els recipient del medi α -MEM.
4. Cal apuntar a l'etiqueta tot el què conté el medi i la data en què aquest ha estat elaborat perquè si algú l'ha d'utilitzar en sàpiga la composició.

5.5.2. MEDI DE CONGELACIÓ

Per congelar les cèl·lules és necessari un medi específic que impedeix que es formin cristalls de glaç a l'interior de les cèl·lules i que per tant, aquestes acabin morint.

La composició d'aquest medi és la següent:

- Medi complet.
- 20% FBS (sèrum fetal boví).
- 10% DMESEO (substància que impedeix la formació de cristalls a l'interior de la cèl·lula).

6. CORBA DE CREIXEMENT CEL·LULAR

6.1. OBJECTIU

- Esbrinar quines cèl·lules mare tenen un ritme de creixement més alt.
- Saber si aquest ritme de creixement es veu condicionat per la vellesa de les cèl·lules.

6.2. HIPÒTESI

És difícil determinar de manera qualitativa quin grup cel·lular serà el que tindrà un temps de duplicació més baix però, si ens fixem en aspectes que tenen lloc durant el cultiu de les cèl·lules al laboratori podem fer una hipòtesi prèvia.

Es tenen els següents grups de cèl·lules en cultiu: cèl·lules progenitores de cardiomiòcits (CMPCs), cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós subcutani (subATDPCs) i cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós epicàrdic (cardiacATDPCs).

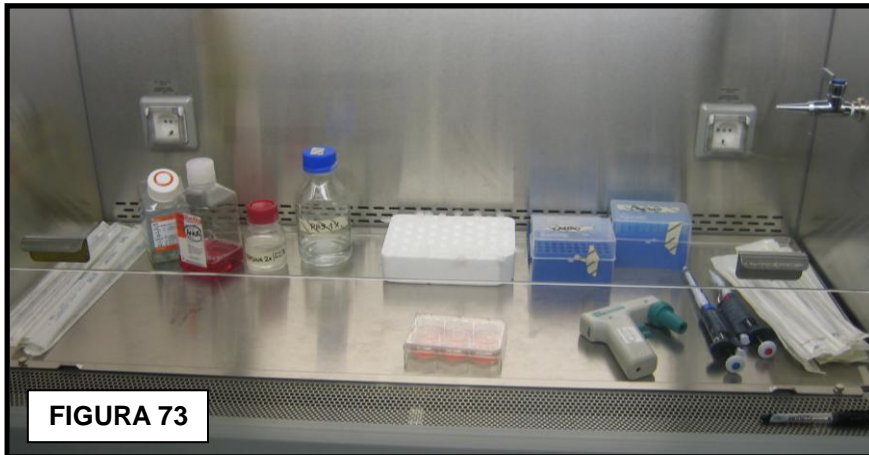
Observem que les que necessiten passar-se a majors superfícies de cultiu més sovint són les CMPCs. Això significa que tenen una velocitat de creixement més gran, que els permet ocupar tota la superfície del flascó en menys temps que els altres grups cel·lulars.

Pel què fa a les cardiac ATDPCs, és totalment al contrari, aquestes necessiten molt temps per ocupar tota la superfície del flascó. Moltes vegades, això provoca problemes a l'hora de realitzar certs experiments, se'n pot no obtenir la quantitat suficient. D'aquí podem extreure la hipòtesi que seran el grup cel·lular que tindrà el temps de duplicació més alt i per tant, que tardaran més a proliferar.

En aquest experiment hem utilitzat tres tipus cel·lulars, un d'ells amb diferents passatge, per comparar els seus ritmes de creixement. El fet de posar dos passatges diferents d'un mateix tipus cel·lular s'ha fet per demostrar si la vellesa pot

afectar al ritme de creixement. La hipòtesi és que les cèl·lules amb un passatge més elevat tindran una velocitat de creixement menor que les de passatge inferior.

6.3. MATERIAL



- Pipetes de 5mL i de mesures inferiors 1000 μ i 10 μ .
- Medi complet (veure'n la composició a l'apartat 5.5.1 de materials i mètodes)
- Tripsina
- Solució salina (Phosphate buffered saline, PBS)
- Pipetejador
- Rascador
- Eppendors (recipients d'1,5 mL)
- Falcons (recipients tubulars de 10mL)
- 8 plaques de 6 pouets (necessitem dues plaques per cada tipus cel·lular, en el cas de les CMPCs seran quatre plaques perquè tenim dos passatges diferents).

6.4. PROCEDIMENT

6.4.1. DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES

Primer de tot, cal descongelar les cèl·lules que necessitem per a dur a terme l'experiment. En aquest cas, descongelem els grups cel·lulars següents:

- subATDPCs de passatge 7.
- cardiacATDPCs de passatge 5.
- CMPCs de passatge 7.
- CMPCs de passatge 3.

De cada tipus cel·lular en descongelem aproximadament 1,5 milions de cèl·lules, que és la quantitat aproximada que conté un criotub. Ens assegurem tenir la quantitat suficient de cèl·lules per poder realitzar la sembra completa.

Un cop tenim els diferents vials descongelats, sembrem cada un dels grups cel·lulars dins un flascó. Ho fem per tal de deixar-les reposar un dia en un ambient normal i veure si les cèl·lules estan en bones condicions o bé la descongelació les ha afectat i per tant, no les podem fer servir per a dur a terme l'experiment.

6.4.2. SEMBRA DE CÈL·LULES

Representa el dia -1 de la corba de creixement. El que fem és fer un recompte de les cèl·lules que vam descongelar i sembrar en flascons el dia abans. Així sabem del nombre de cèl·lules del que disposem i quina quantitat de solució cel·lular hem de posar a cada lloc per tenir el nombre de cèl·lules que desitgem.

Necessitem 10.000 cèl·lules per pou. En total 120.000 cèl·lules de cada tipus cel·lular ja que necessitem omplir 12 pouets.

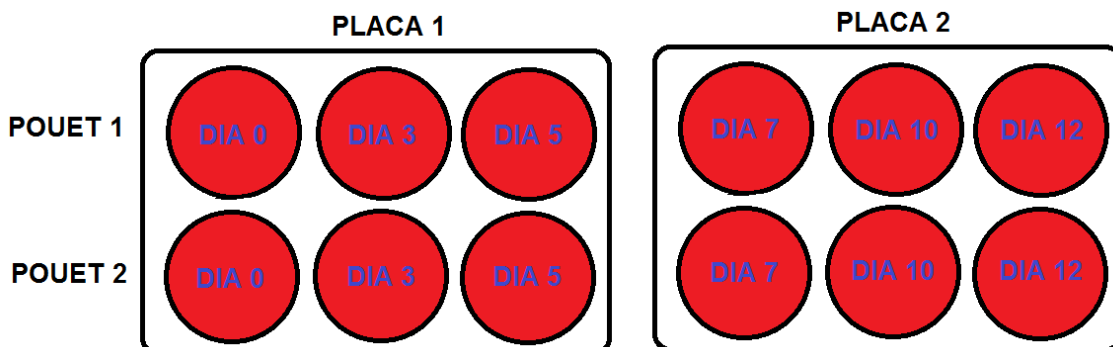


FIGURA 74

En l'esquema anterior es mostra la distribució de les dues plaques utilitzades per a cada un dels grups cel·lulars. Cada una representa les mostres de tres dies diferents, com es pot observar cal recollir mostra de la corba de creixement els següents dies: 0, 3, 5, 7, 10 i 12. Aquests dies, només es compleixen en el cas de les CMPCs i les Sub ATDPCs ja que van ser sembrades en el mateix moment.

Les mostres de les cardiac ATDPCs van ser recollides els dies: 0, 2, 5, 7, i 9. Això és degut a que aquestes van ser sembrades més tard perquè el dia en què es va realitzar la sembra dels altres grups cel·lulars no disposàvem de la quantitat de cèl·lules necessària. La descongelació del vial de cardiac ATDPCs no s'havien realitzat correctament i les cèl·lules no estaven en bon estat, vam haver de descongelar un altre vial. Com es pot comprovar, es va recollir un dia menys de mostra.

Cada dia la mostra va ser recollida de dos pouets diferents per tal de poder contrastar els resultats que obtinguts i poder assegurar que no hi havia hagut cap error en la sembra i que per tant, els valors són els que tocaven.

6.4.2.1. RECOMPTE DE CÈL·LULES

Els passos a seguir per fer el recompte de les cèl·lules són els següents:

- 1) Tripsinitzar els flascons en els quals vam sembrar les cèl·lules després de descongelar-les. Al fer això les cèl·lules passen a tenir un passatge superior. Així ara tenim: Sub ATDPCs P.8, CMPCs P.8, CMPCs P.4 i Cardiac ATDPCs P.6.
- 2) Fer-ne el recompte mitjançant la cambra de Neubauer.
- 3) Realitzar la resta de càlculs per tal de saber la quantitat total de cèl·lules.
 - a. Fem la mitjana aritmètica entre tots els valors obtinguts.

- b. Calculem la concentració de cèl·lules per mil·lilitre de solució cel·lular.
 - c. Calculem el nombre real de cèl·lules que tenim segons el volum real de solució cel·lular.
 - d. Calculem la quantitat de solució que hem de posar en cada pouet, tenint en compte que a cada un hi ha d'haver 10.000 cèl·lules.
- 4) Posem la quantitat necessària de solució cel·lular a cada pouet juntament amb 3mL de medi per tal que les cèl·lules puguin tenir suficients nutrients per créixer i proliferar.

A continuació, mostrem els càlculs que vam dur a terme nosaltres seguint els passos explicats anteriorment per tal de saber la quantitat de solució cel·lular que havíem de sembrar a cada pouet.

subATDPCs P.8

43	50
60	35

* Valors dels quatre requadres blaus de la imatge superior.

$\bar{x} = 47$ $V_r = 1,9 \text{ mL}$

Concentració cel·lular = $\bar{x} \cdot 2 \cdot 10^4 = 47 \cdot 2 \cdot 10.000 = 940.000 \text{ cèl/mL}$

Nº cèl·lules totals = concentració cel·lular · volum real = $940.000 \cdot 1,9 = 1786000$
cèl·lules totals.

Volum de solució cel·lular que hem de posar en cada pouet:

$$10.000\text{cèl} \cdot \frac{1\text{mL}}{940.000\text{cel}} = 0,0106\text{mL} = 10,6\mu\text{L}$$

* Com que el resultat que obtenim és molt petit, només 10,6µL, cal resuspendre la solució amb 8,1 mL de medi complet per tal d'aconseguir tenir-ne 10 mL en total. D'aquesta manera haurem de posar més quantitat de la solució a cada pouet per tal de posar-hi 10.000 cèl·lules. Aconseguint així reduir l'error comès en la mesura.

$$V_r = 1,9 \text{ mL} + 8,1 \text{ mL} = 10 \text{ mL}$$

Volum real de solució cel·lular que hem de posar en cada pouet:

$$10.000 \text{ cèl} \cdot \frac{10 \text{ mL}}{1786000 \text{ cel}} = 0,05599 \text{ mL} = 56 \mu\text{L}$$

En el cas de les subATDPCs caldrà posar 56µL de la solució cel·lular a cada pouet per tal de sembrar-hi 10.000 cèl·lules aproximadament.

CardiacATDPCs P.6

31	18
19	16
30	

$$\bar{x} = 22,8 \quad \hat{x} = 36 \quad \check{x} = 29,4 \quad V_r = 2 \text{ mL}$$

$$\text{Concentració cel·lular: } 29,4 \cdot 2 \cdot 10.000 = 588.000 \text{ cèl/mL}$$

$$\text{Nº cèl·lules totals: } 588.000 \cdot 2 = 1.176.000 \text{ cèl·lules totals}$$

34	40
43	27

Volum de solució cel·lular que hem de posar en cada pouet:

$$10.000 \text{ cèl} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{588.000 \text{ cèl}} = 0,017 \text{ mL} = 17 \mu\text{L}$$

* En aquest cas el volum també és massa petit per tan tornarem a seguir el mateix procediment que en el cas anterior. Afegim 8mL de medi complet sense cèl·lules per tal de diluir la concentració cel·lular.

$$V_r = 2 \text{ mL} + 8 \text{ mL} = 10 \text{ mL}$$

$$10.000 \text{ cèl} \cdot \frac{10 \text{ mL}}{1.176.000 \text{ cèl}} = 0,085 \text{ mL} = 85 \mu\text{L}$$

En el cas de les cardiacATDPCs cal que afegim 85µL de solució cel·lular a cada pouet.

CMPC's P.7

15	12
20	23

$$\bar{x} = 42,25 \quad V_r = 1 \text{ mL}$$

$$\text{Concentració cel·lular} = 42,25 \cdot 2 \cdot 10.000 = 350.000 \text{ cèl/mL}$$

Nº cèl·lules total = $350.000 \cdot 1 = 350.000$ cèl·lules

Volum de solució cel·lular que hem de posar en cada pouet:

$$10.000\text{cèl.} \cdot \frac{1\text{mL}}{350.000\text{cèl.}} = 0,02857\text{mL} = 28,57\ \mu\text{L}$$

* Afegim medi per tal de diluir la solució cel·lular. Concretament amb 9mL de medi complet.

$$V_r = 1\text{mL} + 9\text{mL} = 10\ \text{mL}$$

Volum real de solució cel·lular que hem de posar a cada pouet:

$$10.000\text{cèl.} \cdot \frac{10\text{mL}}{350.000\text{cèl.}} = 0,2857\text{mL} = 290\ \mu\text{L}$$

Per tant, en cada pouet haurem de posar 290 μ L de la solució cel·lular corresponent.

CMPC's P.4

$$\bar{x} = 42,25 \quad V_r = 1\text{mL}$$

56	36
37	40

Concentració cel·lular: $42,25 \cdot 2 \cdot 10.000 = 845.000$ cèl/mL

Nº cèl·lules total: $845.000 \cdot 1 = 845.000$ cèl.T

Volum de solució cel·lular que hem de posar a cada pouet:

$$10.000\text{cèl.} \cdot \frac{1\text{mL}}{845.000\text{cèl.}} = 0,012\text{mL} = 12\ \mu\text{L}$$

* Igual que ens els altres casos afegim medi complet, en aquest cas 9mL.

$$V_r = 1\text{mL} + 9\text{mL} = 10\ \text{mL}$$

Volum real de la solució cel·lular que hem de posar a cada pouet:

$$10.000\text{cèl.} \cdot \frac{10\text{mL}}{845.000\text{cèl.}} = 0,118\text{mL} = 118\ \mu\text{L}$$

Per tant, haurem de posar 118 μ L a cada pouet per tenir-hi aproximadament 10.000 cèl·lules.



La imatge mostra les plaques corresponents als tipus cel·lular: SubATDPCs P.8, CMPCs P.4 i CMPCs P.8.

Un cop ja hi hem sembrat la quantitat de solució cel·lular necessària per a tenir-hi aproximadament 10.000 cèl·lules.

CANVIS DE MEDI

Durant la realització de l'experiment serà necessari el canvi del medi dels pouets. Sinó, les cèl·lules s'acabarien morint degut a la falta de nutrients i a la toxicitat produïda per les substàncies de rebuig generades.

Al principi, quan la quantitat de cèl·lules és relativament baixa, només cal fer canvis de medi dos cops per setmana. Quan la quantitat de cèl·lules és molt superior, és recomanable fer el canvi de medi tres cops per setmana ja que així assegurem el benestar de les cèl·lules.

Cal tenir en compte que segons el tipus cel·lular hem de posar un medi de cultiu o un altre. Així posarem el mateix medi per les SubATDPCs i les cardíacATDPCs i un medi diferent per a les CMPCs.

6.4.3. RECOLLIDA DE MOSTRA DELS POUETS

La corba de creixement té una durada de 14 dies, durant aquest temps hi ha uns dies establerts en els quals s'ha de recollir mostra dels pouets i fer-ne un recompte

per saber el nombre de cèl·lules que tenim. Després, aquests valors seran els que utilitzarem per elaborar la corba de creixement dels diferents grups cel·lulars.

Per a fer aquest recompte, cal fer una tripsinització dels pouets seguint el procediment següent:

- 1) Extreure el medi brut dels pouets (pipeta 5mL). Cada dia haurem de tripsinitzar dos pouets de cada tipus cel·lular.

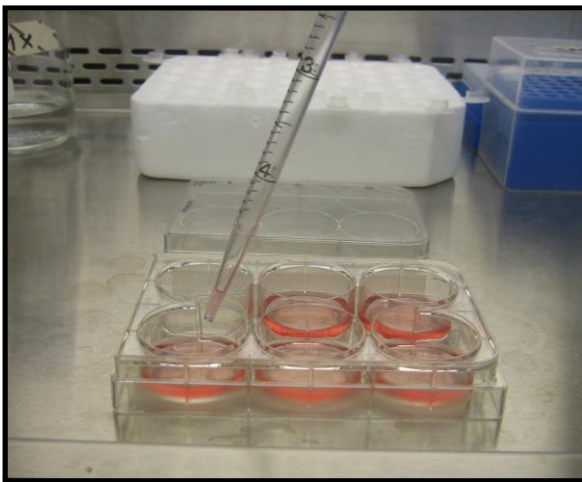


FIGURA 76: Imatge de l'extracció del medi brut d'una placa de 6 pouets de cèl·lules cardíacATDPCs.

- 2) Rentat amb PBS per eliminar totes les restes de medi que hagin pogut quedar dins els pouets. Es fa perquè quan s'afegeix la tripsina aquesta no vegi la seva activitat parcialment inhibida per les proteïnes del medi i no actuï íntegrament sobre les cèl·lules.

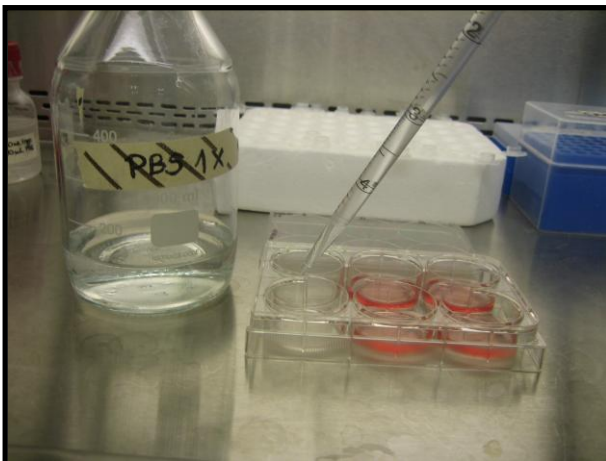


FIGURA 77: Imatge del rentat amb PBS dels pouets corresponents.

3) Afegir 0,5mL de tripsina a cada pouet. Col·locar la placa dins l'incubador durant 3 minuts per tal d'assolir la temperatura òptima on l'activitat enzimàtica de la tripsina és màxima.

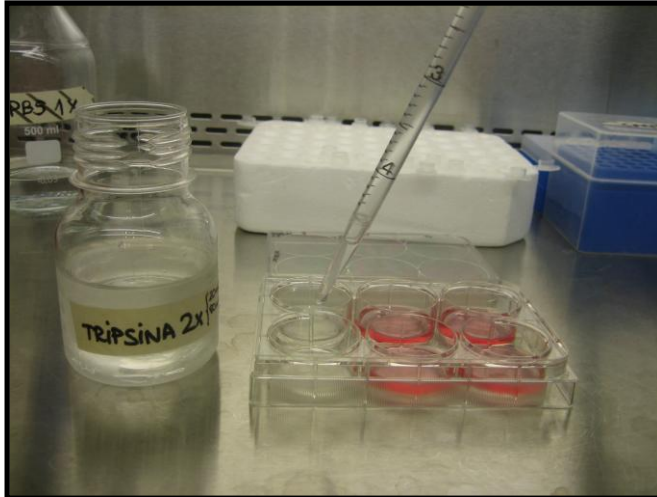


FIGURA 78: Afegim la tripsina mitjançant una pipeta de 5mL.

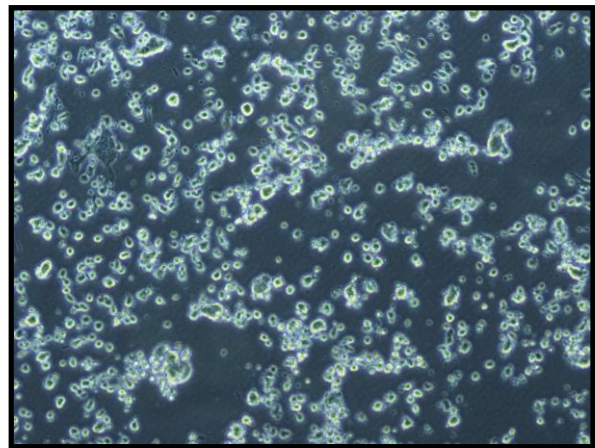
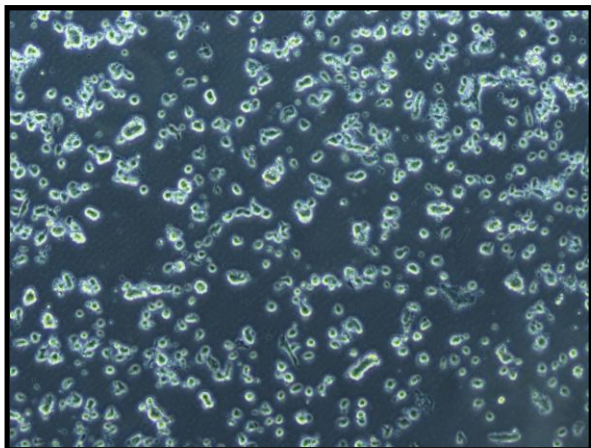


FIGURA 79 i 80: Imatge mitjançant el microscopi òtic (x100) de les cèl·lules després d'estar tres minuts en tripsina. Podem comprovar que estan totalment desenganxades i que han adoptat una morfologia globular.

4) Extreure la placa de l'incubador i afegir-hi medi complet per inhibir l'efecte de la tripsina. Rascar el pouet amb un rascador per tal d'acabar de desenganxar les cèl·lules que encara hagin pogut quedar enganxades.

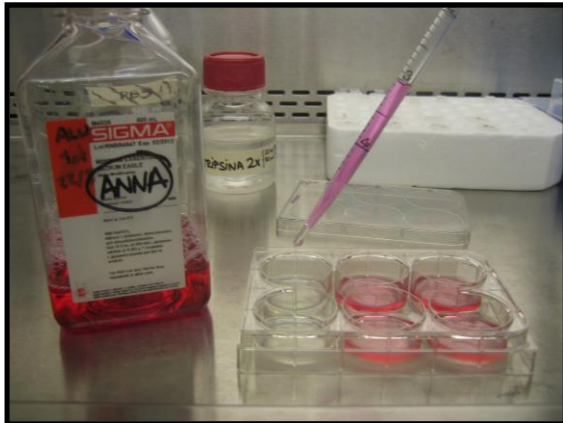


FIGURA 81: Imatge de quan afegim medi dins els pouets mitjançant una pipeta de 5mL.

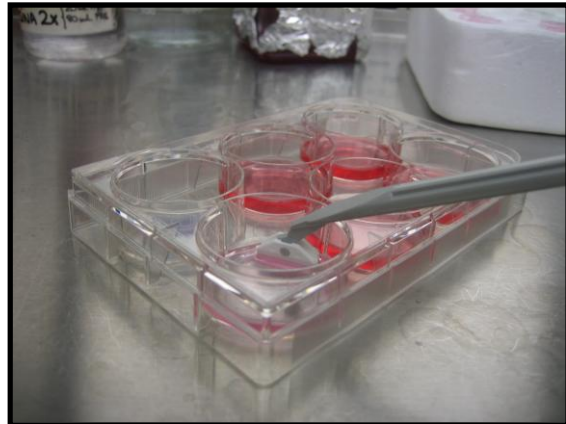


FIGURA 82: Rascat dels pouets mitjançant un rascador.

5) Mitjançant una pipeta de 200 μ L-1000 μ L posar el contingut dels pouets dins d'ependorns d'1,5 mL.

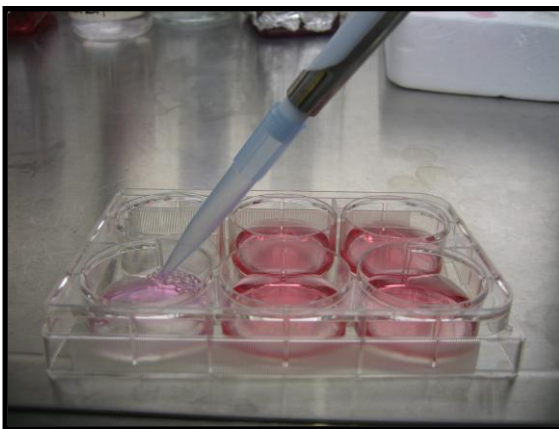


FIGURA 83 i 84: Imatges del trasllat del contingut dels pouets cap als nous recipients per tal de poder-los centrifugar després.

* És molt important tenir tots els tubs i els ependorns rotulats per tal de saber sempre quina mostra tenim a cada lloc i no equivocar-nos.

- 6) Centrifugar els recipients per a què les cèl·lules precipitin al fons i puguem extreure el medi sobrant. Si els nous recipients contenen poca quantitat de solució cel·lular els centrifugarem només durant 2 minuts, en canvi, si contenen entre 1,5 i 2mL els centrifugarem durant 10 minuts a 1200 rpm.

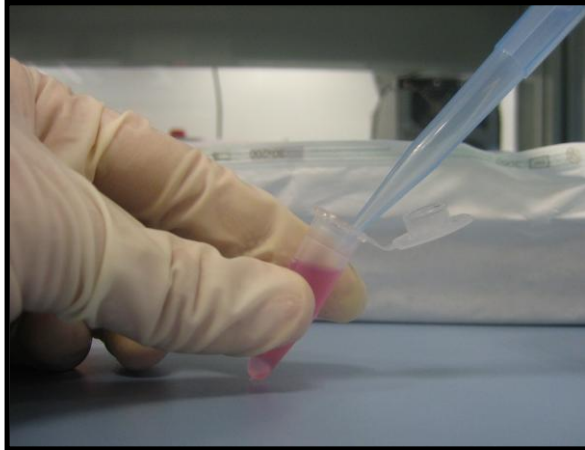


FIGURA 85: Extracció del medi sobrant mitjançant una pipeta per fer que la solució sigui més concentrada i per tan el comptatge de les cèl·lules sigui més fàcil.

- 7) Barrejar 10 μ L de la solució cel·lular amb 10 μ L d'un colorant anomenat blau de tripà. Aquest penetrarà a les cèl·lules i, si aquestes estan vives l'expulsen, però si estan mortes el retenen i es veuen blaves; així, podem diferenciar les vives de les mortes. Després mitjançant una pipeta de 10 μ L col·loquem la barreja a la cambra de Neubauer, instrument que serveix per fer el recompte de les cèl·lules al microscopi òptic.



FIGURA 86: Imatge del Blau de tripà i la Cambra de Newbawer.

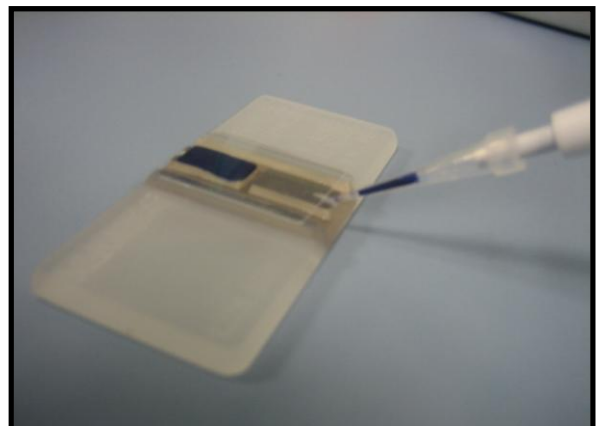


FIGURA 87: Imatge del moment en què s'omple la cambra de Neubauer amb la solució cel·lular més el Blau de tripà.

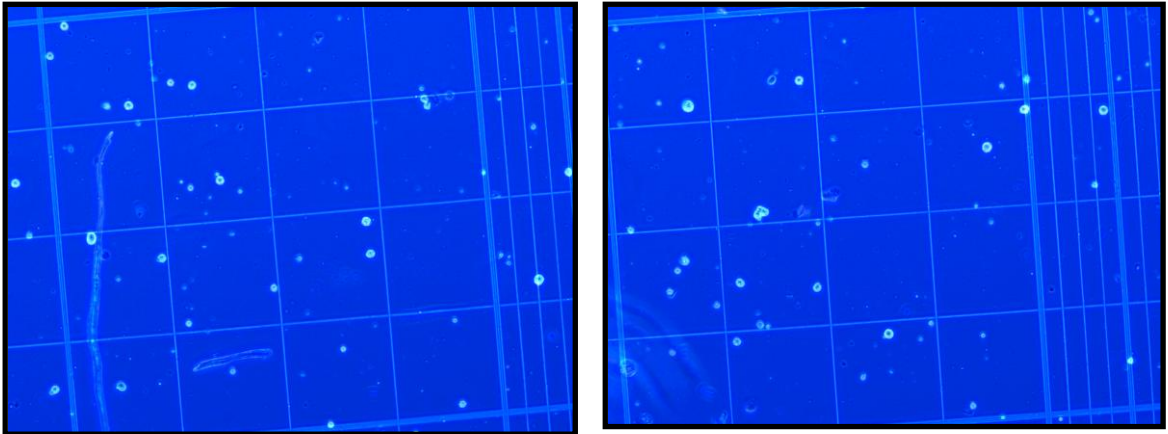
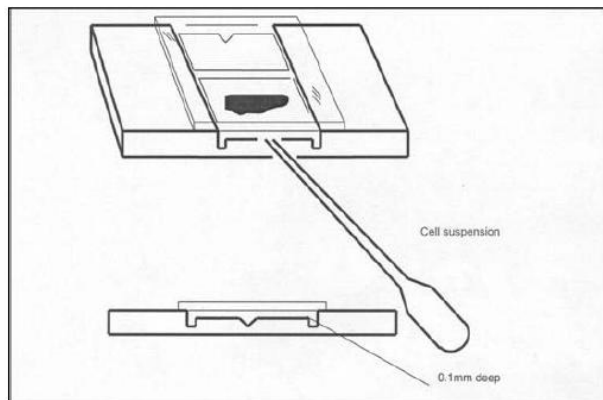


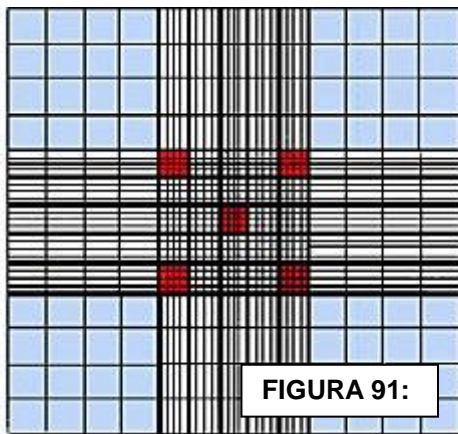
FIGURA 88 i 89: Imatge realitzada amb el microscopi òptic (x100) de la cambra de Neubauer, cal contar les cèl·lules que hi ha en tots els quadrats.

Aquest instrument de comptatge és un portaobjectes que té dos zones lleugerament deprimides al fons de les quals s'ha representat una quadrícula amb l'ajuda d'un diamant.

FIGURA 90: Imatge del portaobjectes que constitueix la cambra de Neubauer en aquest moment s'està introduint el líquid del qual volem fer el recompte dins una de les dues cambres.



El què és fa és cobrir aquestes zones o cambres amb un cobreobjectes que s'adhereix per simple tensió superficial. Després, s'introdueix el líquid que volem comptar dins les cambres mitjançant una pipeta. Per últim, només cal posar la cambra de Neubauer al microscopi i seleccionar l'objectiu correcte per tal de poder visualitzar les cèl·lules i comptar-les.



Per cada pouet omplirem les dues cambres de la Cambra de Neubauer i per tant en farem dos recomptes per tal de que el resultat sigui el més exacte possible.

La imatge del costat representa un esquema del que veiem quan observem la cambra a través del microscopi. Per tal de comptar les cèl·lules només comptarem aquelles que es

trobin dins de les zones de coloració blava. Així al final tindrem quatre valors diferents dels quals haurem de fer la mitjana aritmètica per fer-ne els càlculs posteriors.

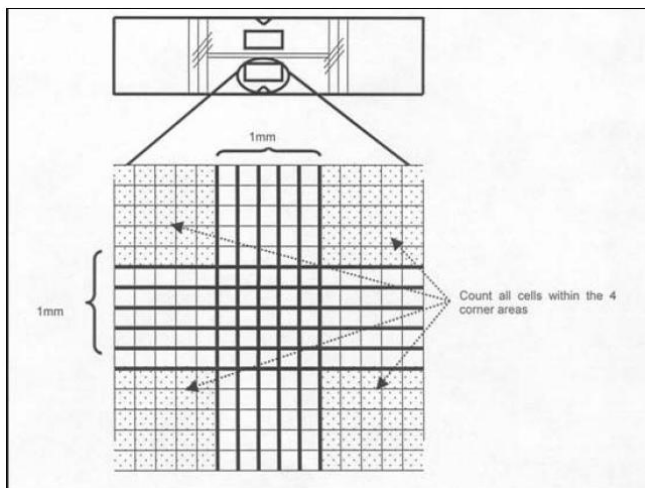


FIGURA 92: En aquesta imatge s'observa clarament la representació de l'estructura interior de cada cambra. La part inferior del dibuix, mostra mitjançant fletxes quines són les zones en les quals s'ha de fer el recompte.

A vegades tenim cinc valors en comptes de quatre. Això és degut a que també fem el recompte de les cèl·lules que hi ha a la quadrícula central de la cambra.

Prenem també aquest valor en el cas que els altres no ens surtin del tot homogenis.

En les dues imatges posteriors, observem una representació augmentada d'un dels quatre quadres on s'ha de fer el recompte. En la primera imatge concretament ens mostra la mida d'aquest quadre que és d'1mm x 1mm. La segona imatge, és una representació del que veuríem al microscopi un cop ja haguéssim introduït la solució cel·lular dins la cambra de Neubauer.

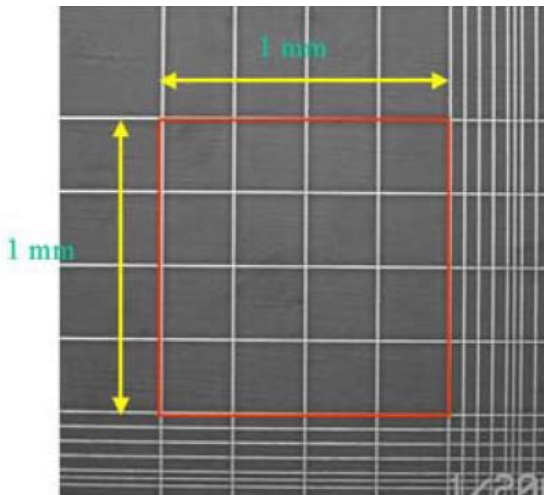


FIGURA 93

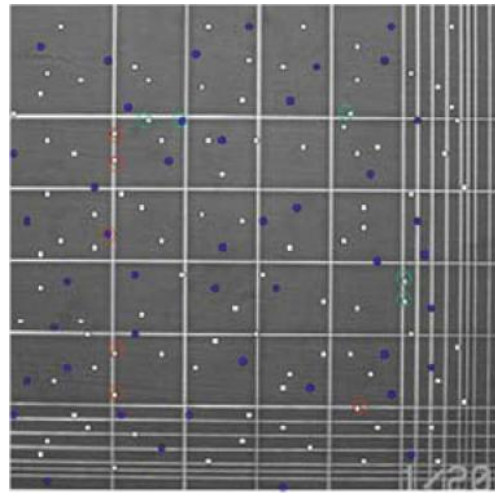


FIGURA 94

6.5. CÀLCULS

Un cop hem comptat les cèl·lules de cada un dels quadres de les dues cambres que hem omplert per cada pouet primer de tot hem de fer les mitjanes d'aquests valors per tal de quedar-nos amb un sol valor.

A continuació calcularem la concentració de cèl·lules que hi ha per mil·lilitre de solució cel·lular i per fem això utilitzarem la fórmula següent:

$$\text{Concentració cel·lular (cèl/mL)} = \bar{x} \cdot 2 \cdot 10.000$$

* \bar{x} representa la mitjana aritmètica de cèl·lules d'un determinat tipus cel·lular que hi ha en cada un dels pouets que hem comptat.

Un cop tenim aquest valor el que hem de fer és calcular quantes cèl·lules totals tenim en el volum real de solució cel·lular del que disposem.

$$\text{Nº cèl·lules totals} = \text{cèl/mL} \cdot \text{volum real}$$

Un cop les cèl·lules han estat sembrades ja podem començar la corba de creixement. Haurem d'agafar mostra durant aproximadament 15 dies i cada cop

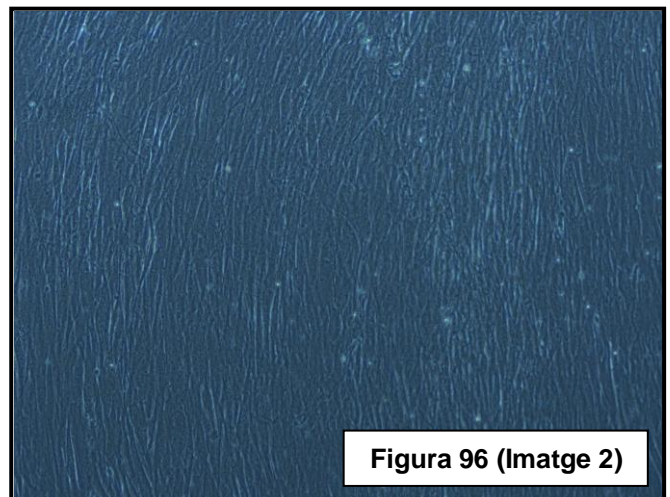
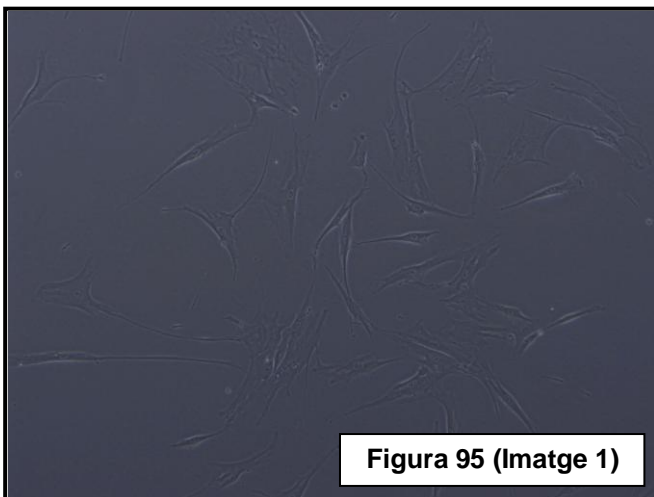
farem el recompte de les cèl·lules que hi ha en els dos pouets que toca tripsinitzar i comptar cada dia.

* Tots els càlculs pertanyents al recompte de cèl·lules per a elaborar la corba de creixement els pots trobar a l'apartat d'annexos.

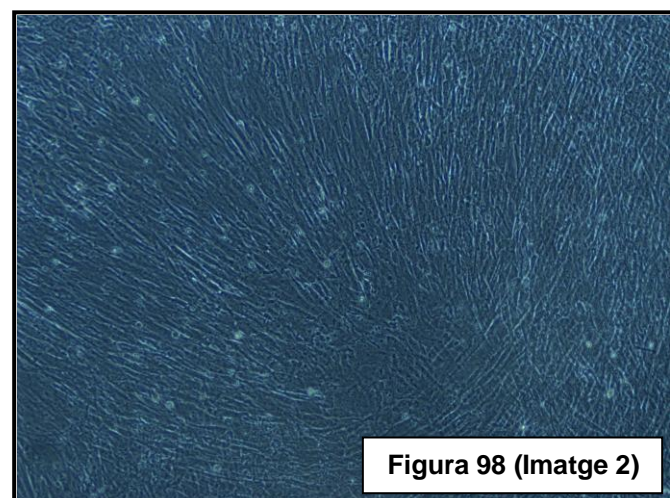
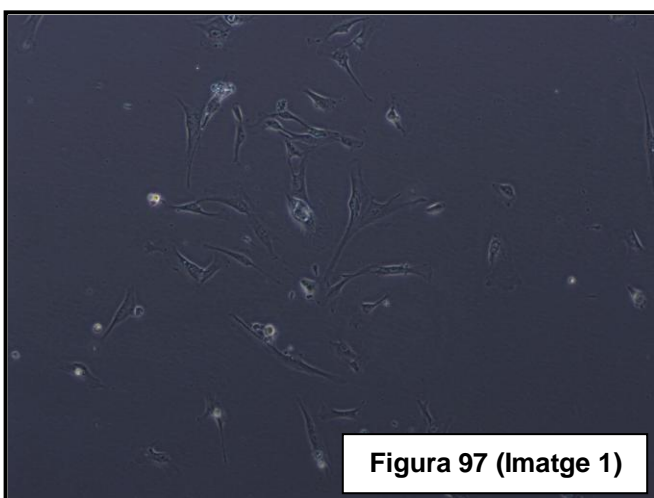
6.6. RESULTATS

6.6.1. IMATGES DE LA CORBA DE CREIXEMENT

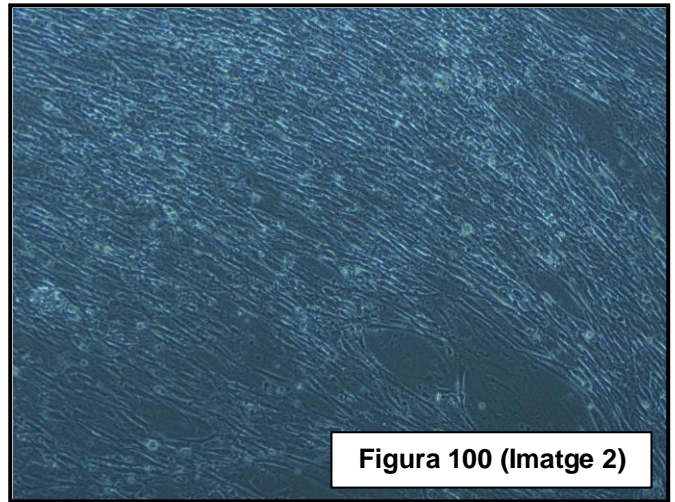
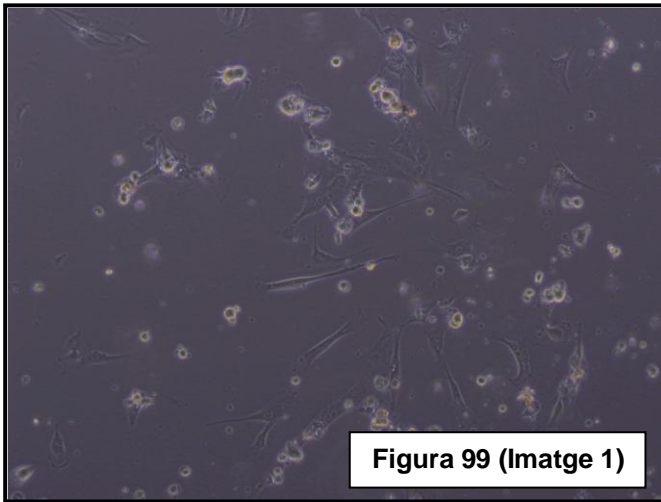
SubATDPCs P.8



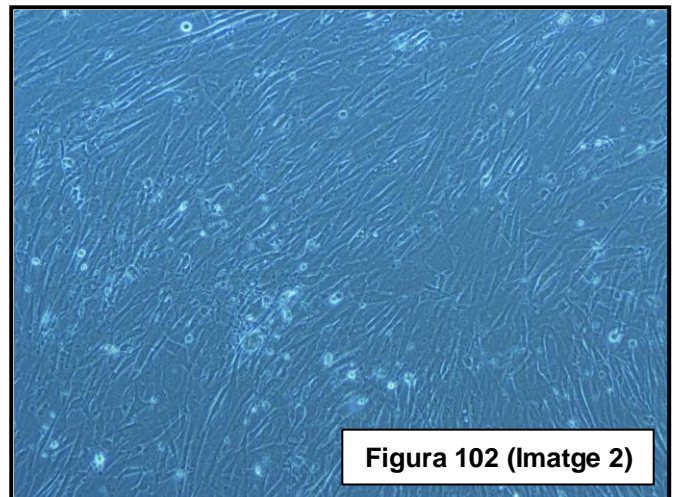
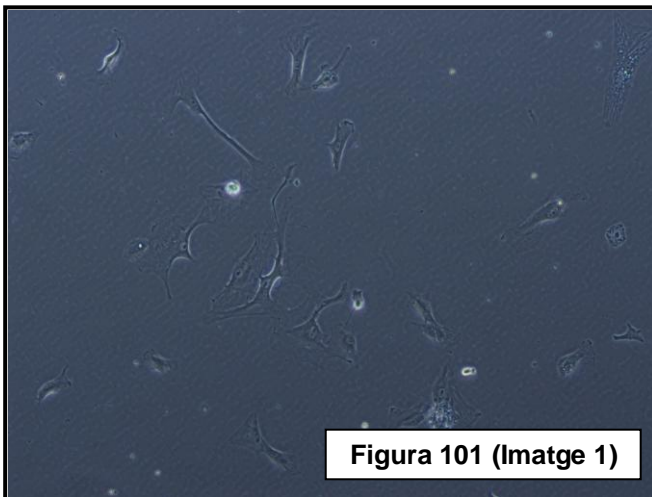
CMPCs P.4



CMPCs P.8



CardiacATDPCs P.6



Imatges 1: En aquestes imatges podem observar molt poca quantitat de cèl·lules adherides al fons del flascó. Això és degut a que les imatges van ser fetes durant el dia 0 de la corba de creixement, és a dir, un dia després de la seva sembra. Per tant, encara no han tingut temps de reproduir-se i expandir-se sinó que el que han fet és adherir-se al fons del pouet en el qual on les vam introduir el dia de la sembra.

Imatges 2: Aquestes imatges són fetes l'últim dia de la corba de creixement. El dia 12, en el cas de les SubATDPCs i les CMPCs, en canvi, en el cas de les CardiacATDPCs la imatge va ser feta 9 dies després de la sembra. En aquestes

imatges s'observa una elevada confluència entre les cèl·lules, que ja han ocupat gairebé tota la superfície del pouet.

En aquestes imatges ja es pot observar i començar a determinar quin serà el grup cel·lular que tindrà un temps de duplicació més baix. Per fer això només cal fixar-se en quin és el tipus cel·lular del qual la segona imatge mostra més quantitat de cèl·lules.

6.6.2. CORBA DE CREIXEMENT

6.6.2.1. INTRODUCCIÓ

Les corbes de creixement cel·lular es porten a terme per tal de determinar quin és el temps de duplicació que té un determinat tipus cel·lular. Així podem comparar temps de duplicació de diferents tipus cel·lulars i passatges.

Per a que una corba de creixement sigui correcta ha de constar de les següents parts:

- **Fase de latència:** És la primera fase en la qual les cèl·lules que acaben de ser sembrades s'adhereixen al fons dels pouets i s'adapten a la nova situació.
- **Fase de creixement exponencial:** En aquesta fase les cèl·lules comencen a duplicar-se i el seu creixement és exponencial.
- **Fase de Plateau:** Moment en el qual hi ha un equilibri entre el nombre de morts i de naixements cel·lulars. Com a conseqüència ja no hi ha creixement cel·lular sinó que el nombre de cèl·lules es manté estable.
- **Fase de mort:** Si el cultiu s'allarga durant massa temps totes les cèl·lules acaben morint degut a la falta d'espai i de nutrients.
Aquesta fase no apareix a la nostra corba de creixement, ja que només té una durada de 12 dies, insuficient per arribar a aquesta fase.

6.6.2.2. EXPLICACIÓ DADES

TAULA: La taula mostra els números de cèl·lules totals que hi havia d'un determinat tipus cel·lular en relació al dia en que va ser recollida la mostra.

GRÀFIC 1: Aquest gràfic està fet mitjançant la taula de valors anterior i mostra com és el creixement cel·lular d'un determinat tipus cel·lular. Relaciona el número de cèl·lules amb el temps, en dies, que ha passat des de la seva sembra.

GRÀFIC 2: Mostra la línia de tendència associada als valors de la fase exponencial de la corba de creixement, treballant amb eixos logarítmics. És necessari fer aquest gràfic ja que necessitem l'equació que descriu aquesta línia de regressió per a poder fer els càlculs per saber el temps, en dies, que tarden les cèl·lules a duplicar-se.

CÀLCUL: El resultat del càlcul ens mostrarà el temps en dies que tarda un determinat tipus cel·lular a duplicar-se. És a dir a passar d'una cèl·lula a dues. El càlcul que s'ha de dur a terme és el següent:

$$Td = \frac{\ln 2}{a}$$

*a = valor de la pendent de la línia de regressió de cada tipus cel·lular (gràfic 2)

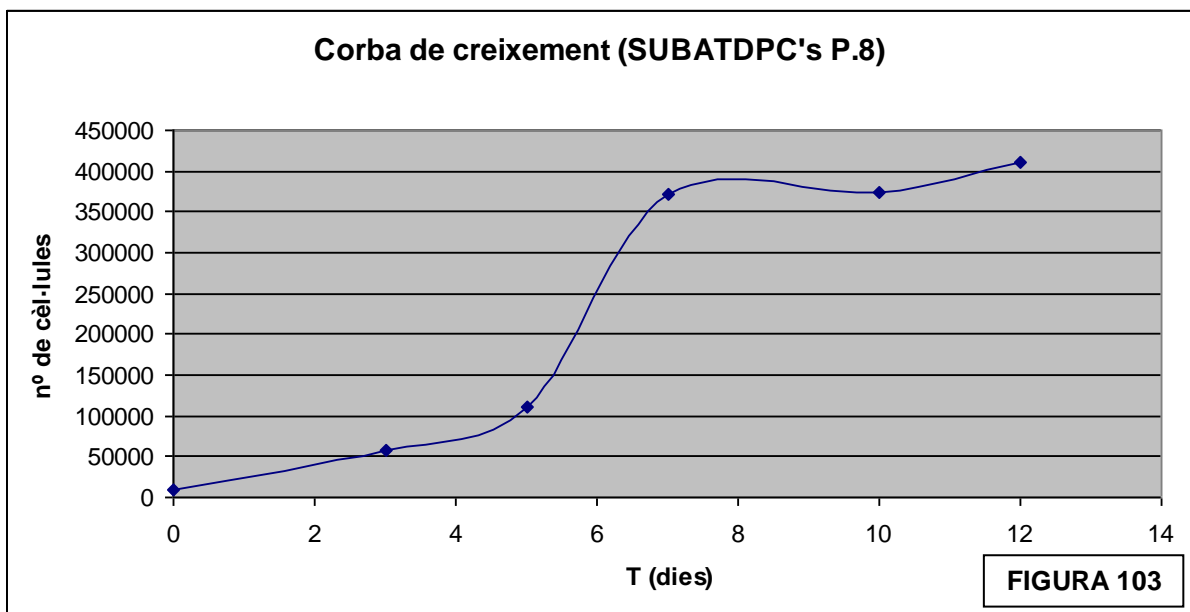
6.6.2.3. CORBA DE CREIXEMENT SUBSATDPCS

SubATDPCs P.8

Temps (dies)	nº cèl·lules
0	9244
3	56833
5	109905
7	370720
10	374500
12	411100

$$Td = \frac{\ln 2}{a} \longrightarrow Td = \frac{\ln 2}{0.4688} = 1.48 \text{ dies}$$

El temps de duplicació de les cèl·lules SubATDPCs és de 1,48 dies.

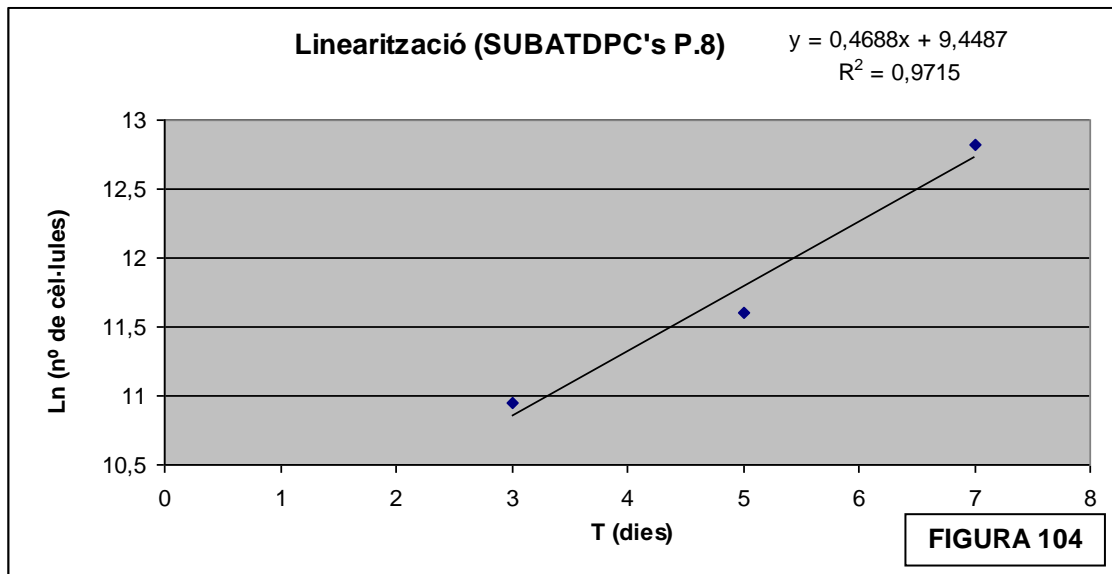


Aquest gràfic mostra el creixement de les cèl·lules SubATDPCs i en ell podem observar clarament les 3 fases principals de les quals hem fet esment anteriorment.

Entre els dies 0 i 3 trobaríem la fase de latència, on les cèl·lules s'estan acomodant al nou ambient i, per tant, hi ha un nivell de duplicació molt baix.

Tot seguit, en el període que avarca des del dia 3 fins al 7 tindria lloc la fase de creixement exponencial. En aquesta fase, les cèl·lules comencen a duplicar-se molt ràpidament i per tant el seu creixement és molt elevat i ràpid.

Per últim, trobem la fase Plateau que engloba els dies 7, 10 i 12. La gràfica mostra perfectament com ha disminuït el creixement en nombre de les cèl·lules i per tant té lloc la gradual estabilització del nombre total de cèl·lules.



Aquest és el gràfic que correspon a la línia de regressió de la corba de creixement del grup cel·lular SubATDPCs. El d'a que hem d'aplicar a la fórmula en aquest cas és de 0,4688.

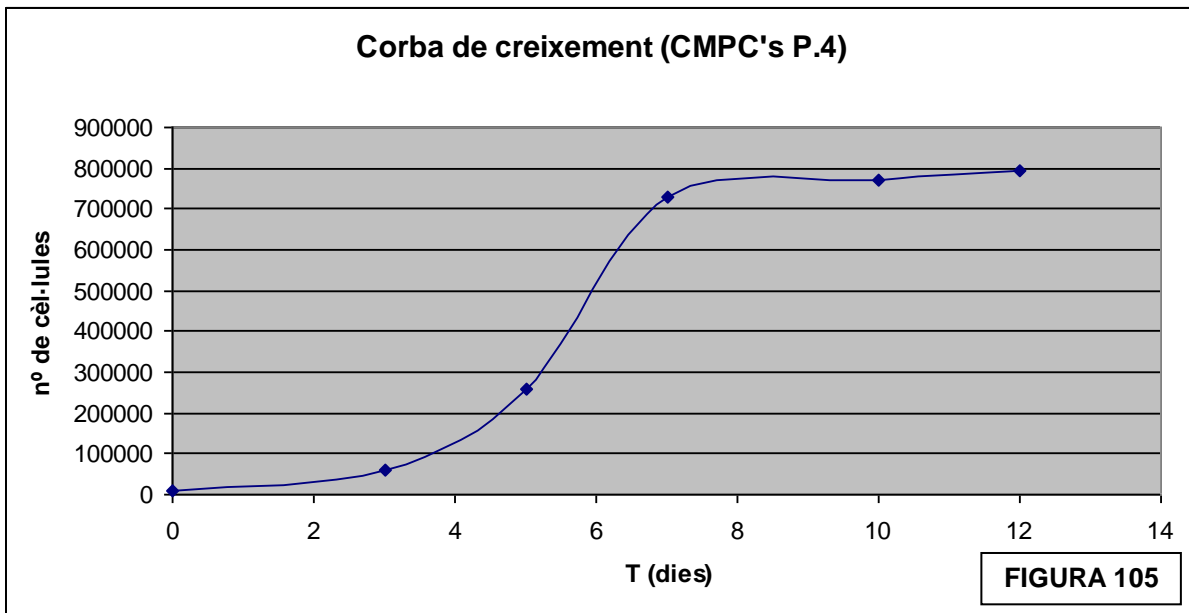
6.6.2.4. CORBA DE CREIXEMENT CMPCS P.4

CMPCs P.4

Temps (dies)	nº cèl·lules
0	7395
3	60843
5	256980
7	727640
10	773050
12	795000

$$Td = \frac{\ln 2}{a} \longrightarrow Td = \frac{\ln 2}{0.6204} = 1.12 \text{ dies}$$

El temps de duplicació de les CMPCs de P.4 té un valor d'1,12 dies.

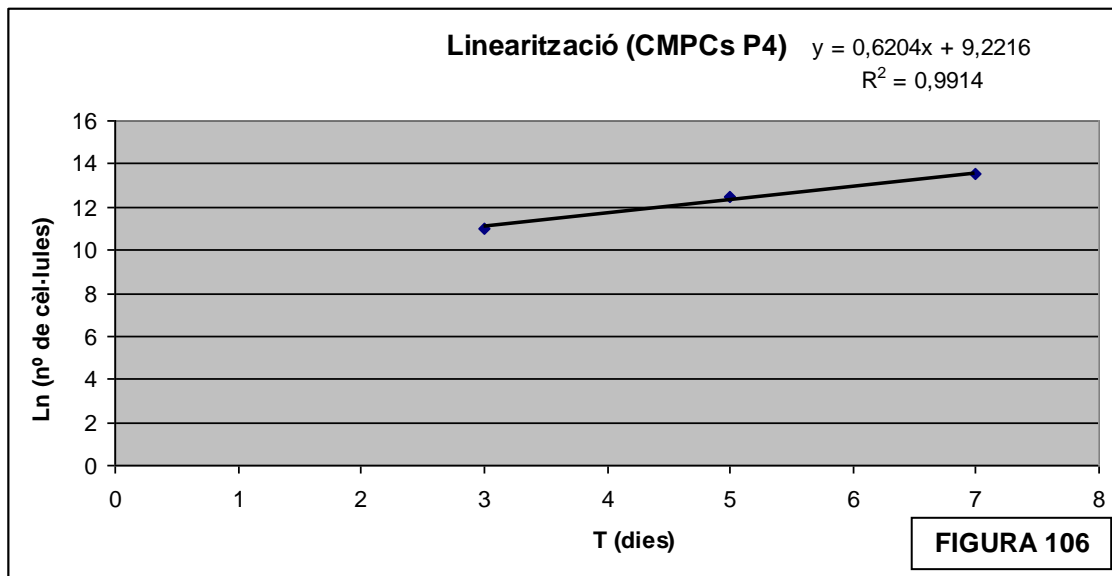


Aquesta gràfica ens mostra la corba de creixement de les CMPCs de passatge 4. En aquest cas també es poden apreciar del tot diferenciades les tres fases principals que constitueixen la corba de creixement.

En primer lloc, entre els dies 0 i 3 tindria lloc la fase de latència on les cèl·lules s'estan acomodant al nou entorn i, per tant, la seva duplicació encara és baixa.

Durant els dies 3, 5 i 7 trobem la fase de creixement exponencial en la qual les cèl·lules es dupliquen i creixen de forma molt ràpida. Això fa que en el mateix període de temps que en la fase anterior aconseguen augmentar molt més el nombre de cèl·lules presents en el cultiu.

Per últim trobem la fase de Plateau que s'estén des del dia 7 fins al 12 en el qual hi ha l'equilibri entre morts i naixements per tan el nombre de cèl·lules totals es comença a mantenir relativament constant.



La gràfica mostra la línia de regressió de les cèl·lules CMPCs de passatge 4 durant els seus dies de màxim creixement, creixement exponencial. Que en aquest cas són des del dia 3 fins al 7.

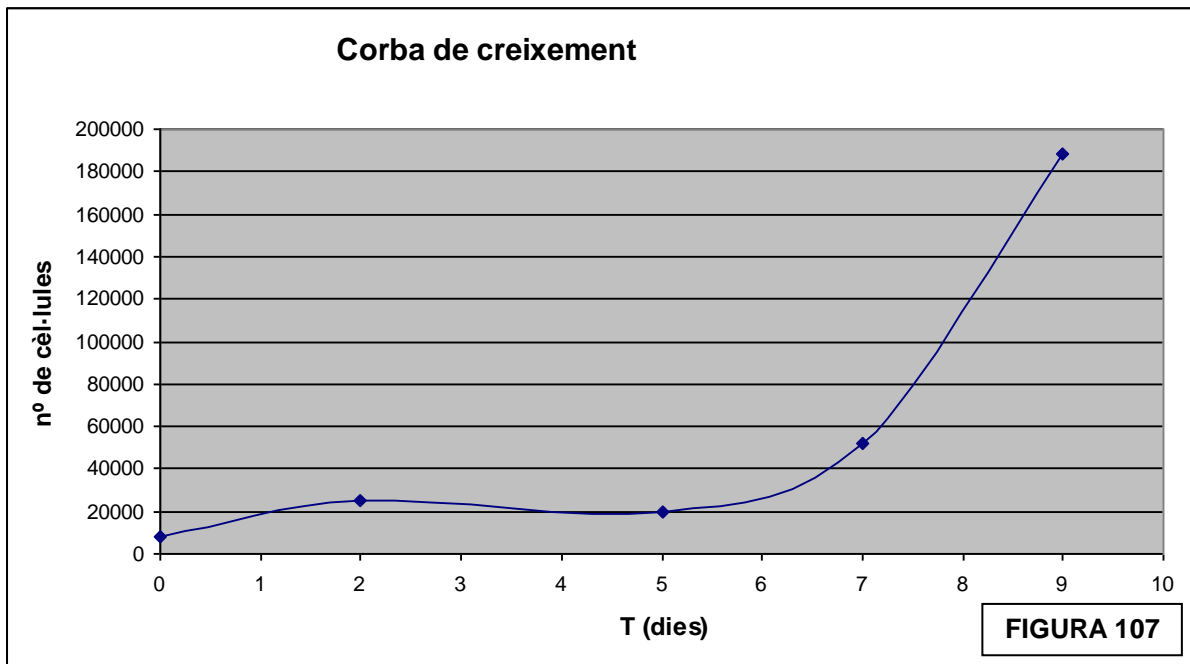
El valor d'a que després cal fer servir en la fórmula és de 0,6204.

6.6.2.5. CORBA DE CREIXEMENT CardiacATDPCS

Temps (dies)	nº cèl·lules
0	8130
2	25080
5	19440
7	52330
9	188153

$$Td = \frac{\ln 2}{a} \longrightarrow Td = \frac{\ln 2}{0.2998} = 2.31$$

El temps de duplicació en dies és de 2,31.



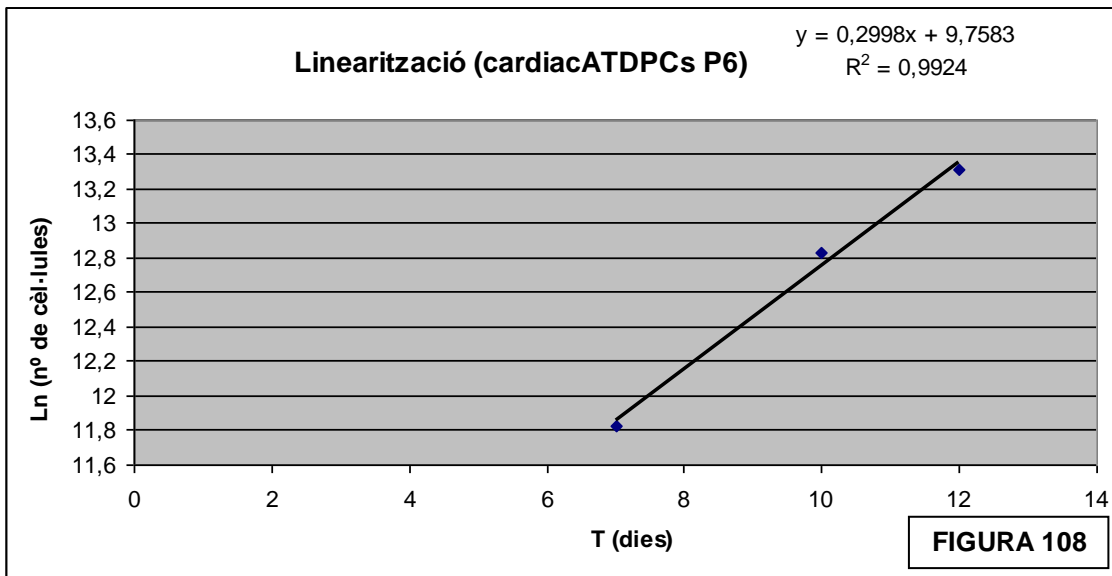
Aquesta gràfica mostra el creixement de les cardiacATDPCS. Com ja hem dit, la seva corba de creixement es va fer en un període de temps diferent al de les altres degut a que en el moment de començar l'experiment no teníem prou quantitat de cèl·lules per poder sembrar.

Així doncs, la seva corba de creixement només va tenir una durada de 9 dies en els quals es van recollir només mostra 5 dies diferents (en el cas dels altres tipus cel·lulars va durar 12 dies i es va recollir mostra 6 dies).

Per aquest motiu, doncs, era d'esperar que aquestes cèl·lules no arribarien a assolir l'última fase de la corba de creixement, l'anomenada fase Plateau. Ja que no tindrien suficient temps per assolir l'equilibri entre les cèl·lules que es moren i les que neixen.

Efectivament, així ha estat i en el gràfic només podem observar la primera fase o de latència, que s'estén des del dia 0 fins al dia 5 i la fase de creixement exponencial que té lloc des del dia 5 fins al dia 9.

Un aspecte a destacar és el fet que la quantitat de cèl·lules el dia 2 sigui una mica superior a les cèl·lules que hi havia el dia 5. No significa que hi hagi hagut un error en el recompte, sinó que és possible que aquell pouet contingués més cèl·lules per un error durant la sembra de les cèl·lules. I per tant, des d'un principi ja contenia més cèl·lules que els altres pouets.



La gràfica mostra la linearització de les cardiacATDPCs durant la fase de creixement exponencial, que com ja hem dit, avarca des del dia 7 fins al dia 12.

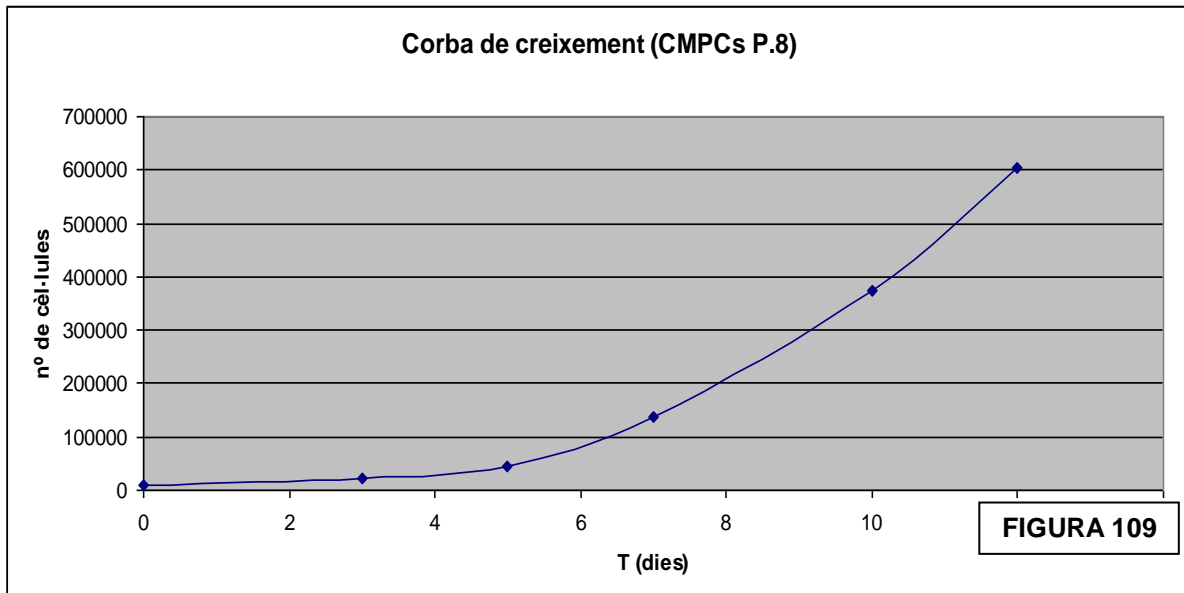
En aquest cas, el valor d'a és de 0,2998.

6.6.2.6. CORBA DE CREIXEMENT CMPCS P.8

Temps (dies)	nº cèl·lules
0	8563
3	22640
5	44595
7	136833
10	374075
12	603375

$$Td = \frac{\ln 2}{a} \longrightarrow Td = \frac{\ln 2}{0.3664} = 1.89 \text{ dies}$$

El temps de duplicació de les CMPCs de passatge 8 és d'1,89 dies.

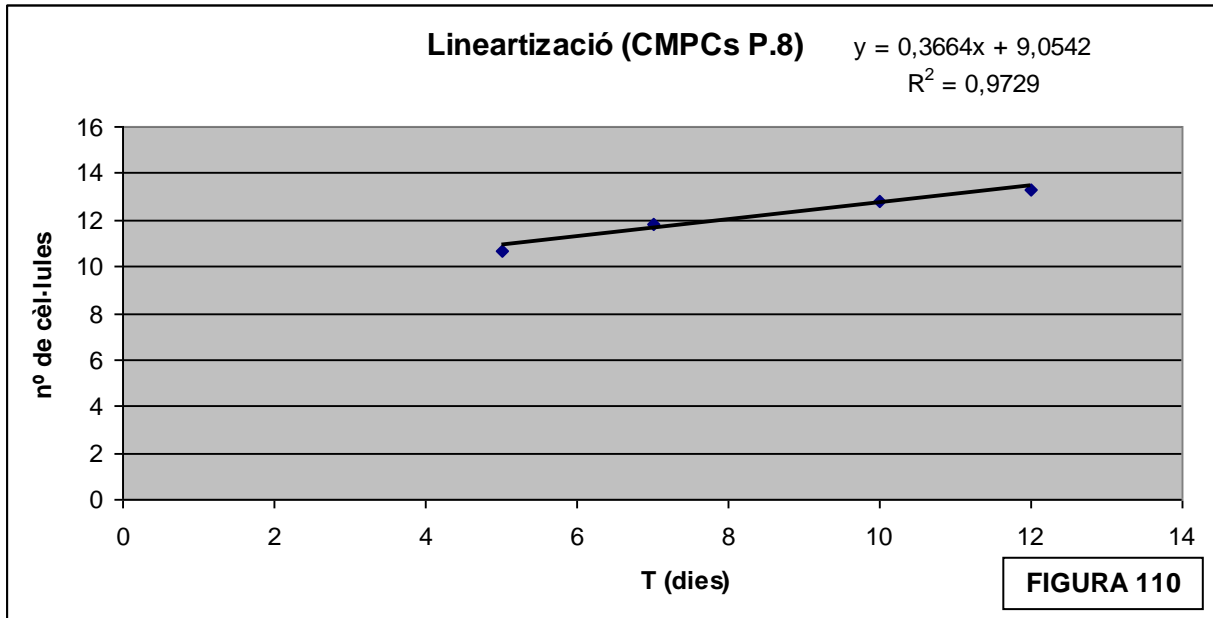


La gràfica anterior mostra el creixement de les cèl·lules CMPCs en aquest cas però de passatge 8. A simple vista ja podem apreciar una diferència amb els dos gràfics anteriors. En aquest cas, les cèl·lules no han arribat a assolir la fase Plateau que es caracteritza per l'equilibri entre morts i naixements i per tant, l'estabilització del nombre de cèl·lules que hi ha en cultiu.

Només podem diferenciar la fase de latència que es comprèn durant els dos primers dies, dia 0 i 3, i la fase de creixement exponencial que tindria lloc entre els dies 5 i 12.

Aquest fet pot ser degut a que les cèl·lules necessitaven estar més dies en cultiu per tal de poder assolir la fase Plateau ja que sembla que l'experiment es va aturar just en el moment a partir del qual les cèl·lules haurien deixat de créixer de manera

exponencial i s'haurien anat equilibrant la quantitat de cèl·lules que hi havia entre un dia i l'altre.



Gràfica que ens mostra la línia de regressió de les cèl·lules CMPCs P.8. En aquest cas, la fase de creixement exponencial engloba més dies i, per tant, els hem de tenir en compte a l'hora de fer la lineartització. El valor d' a és de 0,3664.

Si l'experiment hagués durat més, és possible que la corba de creixement es veiés lleugerament modificada i, a l'hora de fer els càlculs, el temps de duplicació obtingut hagués variat. Potser hauria disminuït, el que és d'esperar observant el ràpid creixement dels cultius de CMPCs de P.8. Així doncs, aquest temps d'1,89 dies s'ha d'analitzar en el context d'una corba de creixement incompleta.

6.7. DISCUSSIÓ

Els diferents tipus cel·lulars per ordre decreixent de velocitats de duplicació.

CMPCs P.4 (1,12 dies), SubATDPCs P.8 (1,48 dies), CMPCs P.8 (1,89 dies) i cardiacATDPCs P.6 (2,31 dies).

En primer lloc, trobem les CMPCs de P.4 que són el grup cel·lular que té un temps de duplicació menor, concretament de 1,12 dies. Així doncs una cèl·lula tarda només 1,12 dies a duplicar-se i originar dues cèl·lules filles.

Aquest resultat és fàcilment constatable a nivell de laboratori ja que si tens un cultiu de CMPCs aquest necessita ser tripsinitzat i canviat moltes més vegades de flascó degut al seu ràpid creixement que no pas els cultius d'altres tipus cel·lulars.

A continuació venen les SubATDPCs amb una temps de duplicació de 1,48 dies, i finalment, les cardiacATDPCs amb un temps de duplicació de 2,31 dies sent així les que tarden més a duplicar-se, i per tant, a augmentar la seva població en un cultiu cel·lular.

És important destacar el fenomen que ha tingut lloc en fer la corba de creixement amb dos cultius del mateix tipus cel·lular però de diferent passatge. Unes eren relativament joves (P.4) i les altres ja eren més velles (P.8). El nostre objectiu era comprovar si realment l'envelliment de les cèl·lules afectava al temps de duplicació d'aquestes.

Efectivament, hem vist que sí afecta. Les cèl·lules de passatge superior tenen un temps de duplicació superior a les de passatge inferior. Concretament, les CMPCs de P.8 tenen un temps de duplicació de 1,89 dies mentre que com ja hem dit les CMPCs de P.4 tarden només 1,12 dies en duplicar-se. La diferència és molt gran si tenim en compte la gran quantitat de cèl·lules que hi ha dins un cultiu cel·lular i que, per tant, depenent del temps de duplicació es dividiran més o menys ràpid i la seva població augmentarà també de manera proporcional.

Tot seguit ens centrarem en el fet de perquè les cèl·lules segueixen un cicle de tres etapes diferents durant la corba de creixement.

En primer lloc, al sembrar les cèl·lules aquestes encara s'han d'adaptar al nou entorn i adherir-se al fons del flascó per aquest motiu tot i tenir els nutrients i l'espai suficient per a reproduir-se no ho fan, ja que encara no estan acostumades al nou entorn.

A continuació, en la fase de creixement exponencial les cèl·lules ja s'han adaptat a l'entorn i, per tant, comencen a reproduir-se. És doncs en aquest moment quan més augmenta la població cel·lular del cultiu donant lloc així al creixement exponencial de la població cel·lular. Durant aquesta fase, les cèl·lules absorbeixen una gran quantitat de nutrients del medi ja que es troben en la seva màxima activitat biològica i per tant necessiten cobrir les seves necessitats. A causa d'això, el medi s'ha de canviar molt més sovint durant aquesta fase ja que sinó les cèl·lules acabarien quedant-se sense nutrients i per tant es moririen.

Per últim, la fase Plateau en la qual s'equilibren el creixement i la mort cel·lular i per tant la població cel·lular s'estabilitza, és deguda a que aquesta ja ha assolit la seva confluència màxima i atura el creixement perquè els recursos del medi no abunden tant. El fet de que les cèl·lules estiguin tan juntes també provoca una certa inhibició per contacte de la seva proliferació.

A part d'aquest factors, en el cas de les cèl·lules mare no hi ha cap mecanisme intern que inhibeixi la seva proliferació passa en el cas dels teixits humans. Aquestes creixerien i s'expandirien sense parar sempre que disposessin de l'espai i els nutrients necessaris per a fer-ho.

6.8. CONCLUSIONS

Un cop fet l'experiment, podem extreure com a conclusió que el tipus cel·lular segons la seva velocitat de creixement que seria més adequat per a la teràpia regenerativa és les CMPCs extretes del teixit cardíac de l'aurícula.

Aquestes cèl·lules són les que tenen una velocitat de creixement major, és a dir, que tarden menys temps a originar cèl·lules filles genèticament idèntiques a elles i per tant, a augmentar la població cel·lular.

Aquesta característica és de gran interès ja que s'ha descobert que perquè les teràpies de regeneració cardíaca puguin arribar a ser efectives es necessita incorporar un nombre molt elevat de cèl·lules sobre el teixit infartat per així recuperar-lo el màxim possible. Gràcies al seu baix temps de duplicació aquestes cèl·lules presenten una gran disponibilitat que fa que no en tinguis mai una quantitat inferior a la que necessites.

A més a més abans d'aplicar la nova teràpia als humans s'han de fer nombrosos experiments tan a nivell "ex vivo" com "in vivo" i per dur-los a terme cal disposar de quantitats de cèl·lules elevades. Així doncs, aquestes cèl·lules amb una ràpida velocitat de creixement no presentaran problemes en quan a quantitat a l'hora de fer un experiment.

En canvi, en el cas de les cardiacATDPCs que tenen un temps de duplicació més elevat pot ser que a l'hora de voler realitzar un experiment ens trobem que no tinguem la quantitat suficient de cèl·lules per a dur-lo a terme. Ens haurem doncs, d'esperar més temps per tal d'aconseguir el nombre desitjat de cèl·lules.

7. DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES MARE

7.1. OBJECTIU

Determinar quin és el tipus cel·lular amb major capacitat de diferenciar-se cap a diferents llinatges cel·lulars.

7.2. HIPÒTESI

És difícil plantejar-se una hipòtesis sobre aquesta qüestió, no ens podem basar en cap dada quantitativa de les cèl·lules que ens ajudi a determinar el seu potencial de diferenciació.

Així doncs, la nostra hipòtesi és que tots els tipus cel·lulars tindran la capacitat per a diferenciar-se cap a adipòcits, condròcits i osteòcits. De fet, això és el que interessaria, ja que voldria dir que són cèl·lules amb un nivell de plasticitat molt elevada i que segurament també tindran la capacitat per a diferenciar-se cap a cardiomiòcits, que és el que realment ens interessa.

7.3. MATERIAL

En primer lloc, per tal de poder dur a terme l'experiment necessitàvem una determinada quantitat de cèl·lules de cada tipus cel·lular.

Necessitàvem 20.000 cèl·lules per cada pouet, per tant, en total 120.000 cèl·lules de cada tipus cel·lular.

Les cèl·lules utilitzades tenien les característiques següents:

- **Cèl·lules de greix epicàrdic:** cardiacATDPCs de passatge 8, és a dir, que han estat canviades de flascó 8 vegades i per tant, són relativament velles.
- **Cèl·lules del greix subcutani:** SubATDPCs de passatge 8, també són relativament velles.

- **Cèl·lules d'un fragment d'aurícula:** CMPCs de passatge 6. Són les més joves de l'experiment ja que són les que han estat canviades de flascó menys vegades.

Totes aquestes cèl·lules van ser extretes de mostres de diferents pacients proporcionades per l'hospital Germans Trias i Pujol (Can Ruti).

Les cèl·lules van ser aïllades mitjançant el protocol d'aïllament cel·lular descrit en l'apartat de procediments i mètodes . Un cop aïllades, les cèl·lules es posen en cultiu dins de flascons que es mantenen a l'incubador. Cal anar fent un seguiment del seu creixement així com canviant els medis i canviant-les de flascó sempre que sigui convenient.

A més a més, també necessitem les 3 plaques de 24 pouets una per a cada diferenciació. En aquest cas, adipogènica, condrogènica i osteogènica.

També són necessaris tant els medis complets normals com els medis de diferenciació per poder anar fent els canvis regulars de medis que els pertoquen als cultius.

7.4. PROCEDIMENT

7.4.1. DESCONGELACIÓ CEL·LULAR

Concretament, les cèl·lules d'aquest experiment van ser descongelades un dia abans de la sembra ja que en aquell moment no hi havia suficients cèl·lules en cultiu per dur a terme l'experiment. Un cop les vam haver descongelat les vam sembrar en els flascons petits. L'objectiu era que les cèl·lules estiguessin juntes i per tant, més còmodes. Així l'endemà poder començar l'experiment tenint el màxim nombre de cèl·lules possible.

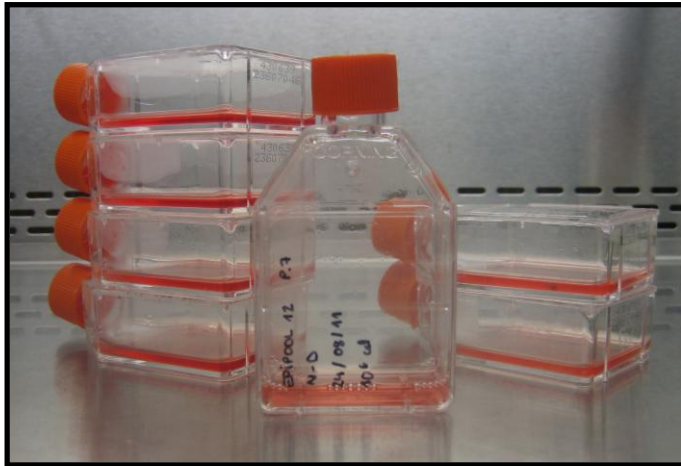


FIGURA 111: Imatge dels flascons en els quals van ser sembrades les cèl·lules després de ser descongelades.

Abans de sembrar-les, les vàrem haver de comptar i fer els càlculs corresponents per tal de saber quina quantitat de cultiu havíem d'afegir a cada pouet.

7.4.2. CÀLCULS ANTERIORS A LA SEMBRA DE CÈL·LULES

Per tal de dur a terme el recompte de les cèl·lules de les quals disposem i després calcular el volum de solució que hem de sembrar a cada pouet, hem seguit el mateix procediment utilitzat per als càlculs de la corba de creixement.

SubATDPCs P.8 $\bar{x} = 47$ $V_r = 1,9\text{mL}$

Concentració cel·lular: $47 \cdot 2 \cdot 10.000 = 940.000 \text{ cèl/mL}$

Nº cèl·lules totals: $940.000 \cdot 1,9 = 1.786.000 \text{ cèlT}$

Volum de solució cel·lular que hem de sembrar a cada pouet:

$$20.000\text{cèl} \cdot \frac{10\text{mL}}{1.786.000\text{cèl}} = 112\mu\text{L}$$

Per tal d'obtenir aquest valor, abans hem hagut d'afegir 8,1 mL de medi a la solució per tal de diluir-ne la concentració. Aconseguint haver de posar més quantitat de solució a cada pouet i per tant l'error que podem cometre és molt més petit.

CMPCs P.6 $\dot{x} = 37,75$ $V_r = 1\text{mL}$

Concentració cel·lular: $37,75 \cdot 2 \cdot 10.000 = 755.000 \text{ cèl/mL}$

Nº cèl·lules totals: $755.000 \cdot 1 = 755.000 \text{ cèlT}$

Volum de solució cel·lular que hem de sembrar a cada pouet:

$$20.000\text{cèl} \cdot \frac{10\text{mL}}{755.000\text{cèl}} = 265\mu\text{L}$$

En aquest cas hem hagut de resuspendre la solució cel·lular amb 9mL de medi per tal d'aconseguir reduir l'error el màxim possible.

CardiacATDPCs P.8 $\dot{x} = 20,75$ $V_r = 0,9\text{mL}$

Concentració cel·lular: $20,75 \cdot 2 \cdot 10.000 = 415.000 \text{ cèl/mL}$

Nº cèl·lules totals: $415.000 \cdot 0,9 = 373.500 \text{ cèlT}$

Volum de solució cel·lular que hem de sembrar a cada pouet:

$$20.000\text{cèl} \cdot \frac{10\text{mL}}{415.000\text{cèl}} = 112\mu\text{L}$$

Hem afegit 9,1 mL de medi per així reduir l'error de mesura de la solució cel·lular.

7.4.3. SEMBRA DE LES CÈL·LULES

Mitjançant una pipeta (200-1.000µL) afegim la quantitat de solució cel·lular calculada anteriorment al pouet corresponent. Hi afegim també 1mL de medi complet per tal que les cèl·lules tinguin nutrients i puguin sobreviure.



FIGURA 112:
 Imatge de les tres plaques en les quals duia a terme l'experiment de la diferenciació.

Vam utilitzar tres plaques, cada una per un tipus de diferenciació diferent: osteogènica, adipogènica i condrogènica.

En cada una de les plaques hi havia dos pouets destinats a cada tipus cel·lular: un era el control (cèl·lules amb medi normal), i l'altre eren les cèl·lules a les quals posàvem el medi de diferenciació. En cada pouet sembràvem 20.000 cèl·lules que havíem descongelat el dia abans. Així doncs, necessitàvem 120.000 cèl·lules de cada tipus cel·lular per tal de poder dur a terme la diferenciació.

A més a més, alguns dels pouets dels extrems de les plaques estaven plens d'aigua per tal de mantenir la humitat de la placa en tot moment.

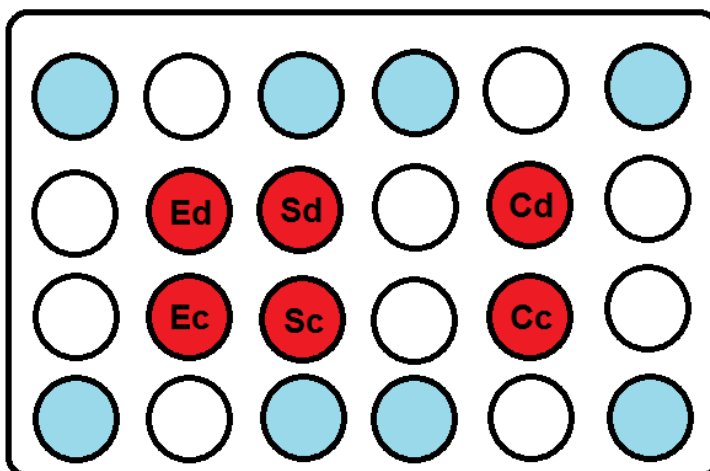


FIGURA 113

En l'esquema anterior es mostra la distribució que hi havia en cada una de les plaques de diferenciació.

Els pouets de color blau signifiquen els pouets que contenen aigua per tal de mantenir la humitat de la placa. Els pouets de color vermell representen els que contenen les cèl·lules sembrades. Els de la fila de més amunt Ed, Sd i Cd representen els pouets destinats a la diferenciació, i en canvi, els de la part inferior són els pouets control (Ec, Sc i Cc).

E= CardiacATDPCs S = SubATDPCs C = CMPCs

Després de sembrar les cèl·lules, cal tenir-les uns quants dies en observació per veure si realment s'adapten al nou entorn i s'adhereixen a la part inferior del flascó. També és necessari comprovar si les cèl·lules sobreviuran suficients dies com per poder tirar endavant l'experiment. En el nostre cas, vam esperar quatre dies fins a veure que ja teníem la quantitat de cèl·lules necessària per poder dur a terme l'experiment.

7.4.4. CANVIS DE MEDI

Un cop fets tots els passos preliminars, només cal anar canviant els medis regularment dos cops per setmana al principi i tres cops a mesura que el nombre de cèl·lules al pouet va augmentat degut a la seva duplicació.

4.4.1) Medis normals

Cal tenir en compte que als pouets control hem de posar medi complet normal, i que aquest no és el mateix per les CMPCs que per a les cardiacATDPCs i les SubATDPCs (Explicat apartat 5.1.1 i 5.1.2 de material i mètodes).

4.4.2) Medis de diferenciació:

Els medis que vam utilitzar eren tots de marques comercials. Per aquest motiu, no en podem saber la composició exacta que aquests tenen. Però sí que podem extreure alguna informació dels protocols que ens subministra l'empresa proveïdora. Aquests medis són sensibles a la llum i cal conservar-los en fred. Per aquest motiu, els conservarem en una caixa dins de la nevera per tal de que la llum els toqui el mínim possible.

- **Medi adipogènic:**

Aquest medi conté tots els components i reactius necessaris per tal de que les cèl·lules mare mesenquimals es diferenciïn cap a cèl·lules de llinatge adipogènic, concretament adipòcits.



FIGURA 114

- **Medi condrogènic:**

Aquest kit ha estat desenvolupat per portar a terme la diferenciació condrogènica de les cèl·lules mare. Així, amb l'addició d'aquest medi aconseguim generar condrocits.



FIGURA 115

- **Medi osteogènic:**

Desenvolupat per aconseguir la diferenciació osteogènica de les cèl·lules mare cultivades en recipients de cultiu de teixits. El kit conté tot els reactius per generar osteòcits.



FIGURA 116

7.4.5. FIXACIÓ I TINCIÓ DELS CULTIUS CEL·LULARS

Aquest procés és la part final de l'experiment i es porta a terme per tal de determinar quins tipus cel·lulars tenen la capacitat o no de diferenciar-se cap a un llinatge cel·lular concret. En aquests cas cap a adipòcits, condrocits, o osteòcits.

Per portar a terme aquesta part, cal que les cèl·lules hagin estat el temps necessari en medi de diferenciació:

- **Adipogènic:** 4 setmanes (02/09/11 - 22/09/11)
- **Condrogènic:** 21 dies (02/09/11 - 15/09/11)
- **Osteogènic:** 21 dies (02/09/11 - 15/09/11)

7.4.5.1. FIXACIÓ

A continuació ja podem dur a terme la fixació d'aquests cultius cel·lulars per tal de després poder-ne fer la tinció. D'aquesta manera, no hi ha perill que mentre fem els diversos rentats necessaris, arrosseguem també les cèl·lules i per tant malmetem el cultiu.

- a) 3 rentats amb 1ml de PBS per pou.
- b) 1mL de PFA 4% o formalina 10%, 10 minuts a temperatura ambient.
- c) 3 rentats amb 1ml de PBS per pou.
- d) Emmagatzemar en PBS-azida a 4°C. PBS 1X i 0,1% azida.

Vam emmagatzemar les cèl·lules ja que la fixació no va ser feta el mateix dia que vam portar a terme la tinció de les cèl·lules. Si haguéssim deixat les cèl·lules sense conservar amb PBS-azida es podrien haver malmès degut a alguna contaminació externa.

7.4.5.2. TINCIÓ

Un cop feta la fixació, el següent pas és la tinció. Cal tenir en compte que per cada diferenciació s'ha de seguir un procés de tinció diferent. Això és degut a que cada tint és específic per a tenyir d'un determinat color l'aspecte més rellevant de cada una de les diferenciacions, és a dir, el paràmetre que ens fa adonar de que les cèl·lules realment s'han diferenciat.

RedOil: Tenyeix les gotes lipídiques que es formen a l'interior de les cèl·lules quan es diferencia cap a adipòcits.

Alcian Blue: Tenyeix els cúmuls de cèl·lules que es formen degudes a la diferenciació condrogènica.

Alizarin Red: Tenyeix els dipòsits de calci que s'han format com a conseqüència de la diferenciació cap a osteòcits.

7.4.5.2.1. ADIPOGÈNICA

- 2 rentats amb 1ml de PBS per pou (si estaven emmagatzemades).
- 2ml de RedOil 1 hora a T^a ambient en agitació:
 - o Solució stock: 0,5% (pols) en Isopropanol.
 - o Solució de treball: 60% en H₂O_{bd} de la solució stock. Filtrar-ho i 2ml per pou.
- 3 rentats amb 1ml de PBS per pou.

7.4.5.2.2. CONDRÒGÈNICA

- 2 rentats amb 1ml de PBS per pou (si estaven emmagatzemades).
- Tinció amb Alcian Blue 1% en 0,1N d'HCl durant 30 min a T^a ambient:
 - o HCl: la solució mare és 1N. Per tenir 0,1N= 20ml d'HCl 1N + 180ml de H₂O_{bd}

- Per preparar 10ml de tinció: 0,1g d'Alcian Blue en 10ml d'HCl 0,1N.
Filtrar-ho.
- 3 rentats amb HCl 0,1N
- Afegir H₂O_{bd} per neutralitzar l'àcid.

7.4.5.2.3. OSTEOGÈNICA

- 2 rentats amb 1ml de PBS per pou (si estaven emmagatzemades).
- Tinció amb Alizarin Red 1% en H₂O_{bd} durant 10 minuts a T^a ambient.
- 1ml de PBS-azida per pou (si no captem imatges al moment).

7.5. RESULTATS

7.5.1. IMATGES DE LA DIFERENCIACIÓ MITJANÇANT EL MICROSCOPI

- **Imatges del pouet control de la diferenciació el dia després de la seva sembra (IMATGE 1):** Es pot observar un baix nivell de confluència entre les cèl·lules ja que al haver-n'hi encara poca quantitat no ocupen tot l'espai del que disposen.
- **Imatge del pouet control de la diferenciació dues setmanes després de la seva sembra (IMATGE 2):** Es pot observar que el nivell de confluència entre les cèl·lules ha augmentat de forma notable. Això és degut a que el nombre de cèl·lules és molt superior i l'espai de cultiu és el mateix.
- **Imatge de la diferenciació adipogènica de les cèl·lules (IMATGE 3):** Les cèl·lules comencen a formar dins seu gotes lipídiques i la seva morfologia canvia lleugerament.
- **Imatge de la diferenciació condrogènica de les cèl·lules (IMATGE 4):** Les cèl·lules tendeixen a ajuntar-se formant grans esferes. La seva morfologia també es veu modificada degut a la diferenciació.

- **Imatge de la diferenciació osteogènica de les cèl·lules (IMATGE 5):** En aquest cas, les cèl·lules tendeixen a acumular calci i així es poden observar alguns dipòsits de calci entre elles. La seva morfologia també varia lleugerament.

* Cal que tenir en compte que no tots els tipus cel·lulars donen positiu en cada una de les diferenciacions, per tant, no tenim perquè observar aquests resultats a totes les imatges ja que pot ser que les cèl·lules no s'hagin diferenciat.

Això ho podrem esbrinar quan en l'última fase de l'experiment fem la tinció de dels cultius cel·lulars.

7.5.1.1. CardiacATDPCS P.8

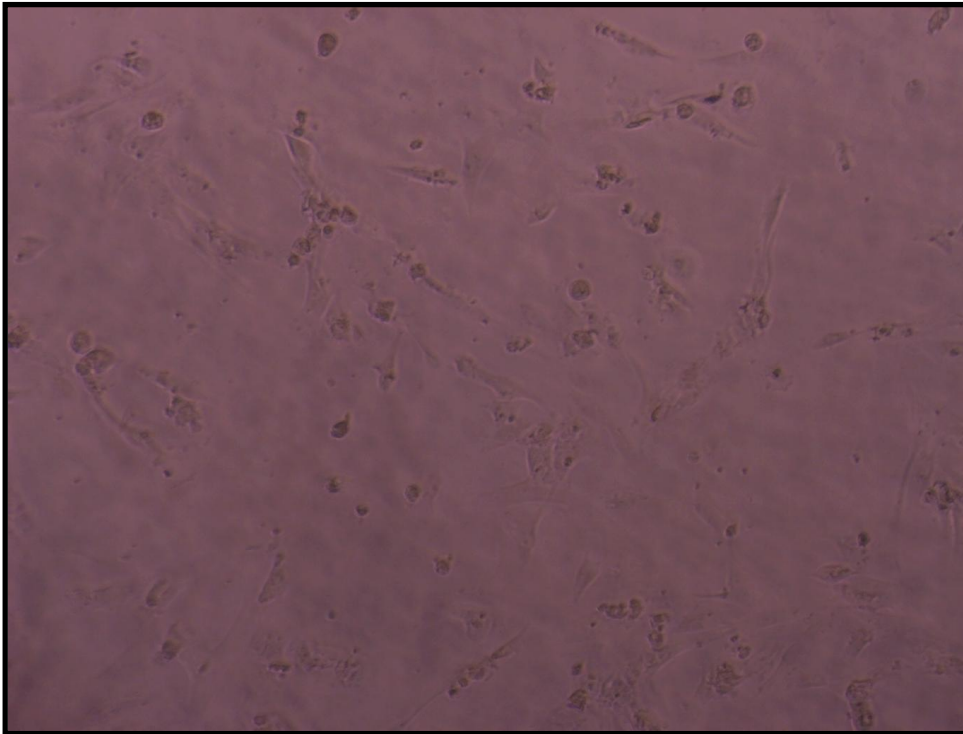


FIGURA 117: (IMATGE 1) Imatge de les cardiacATDPCs en el pouet control de la diferenciació el primer dia després d'haver estat sembrat.

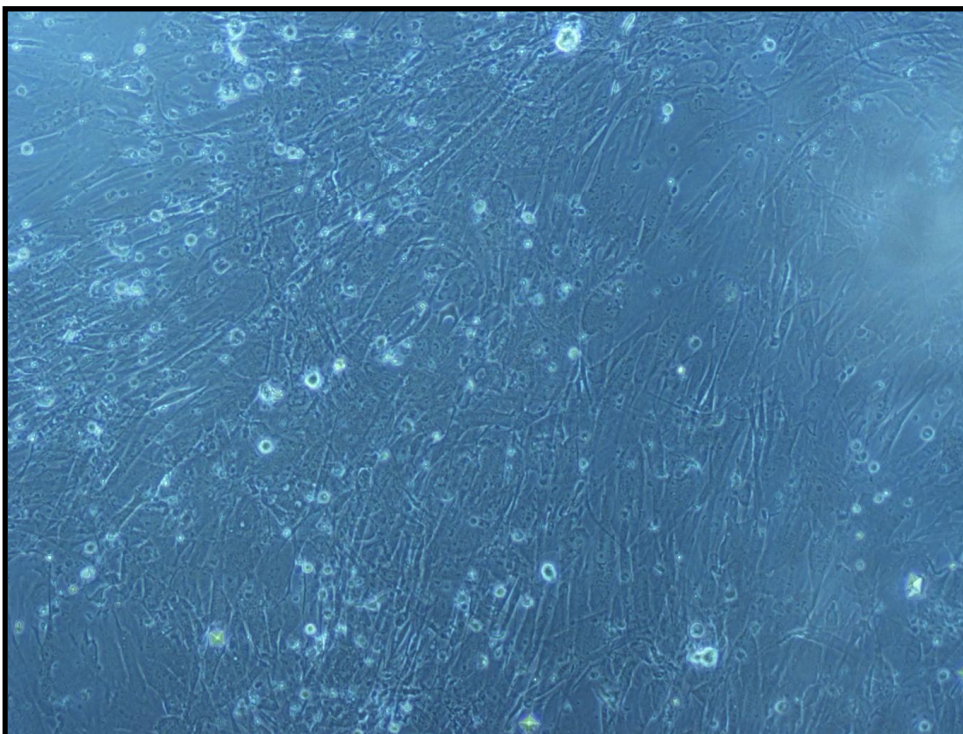
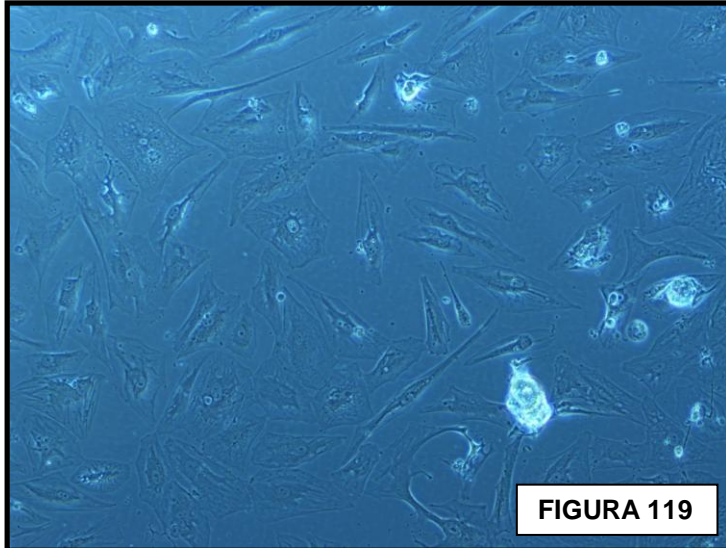
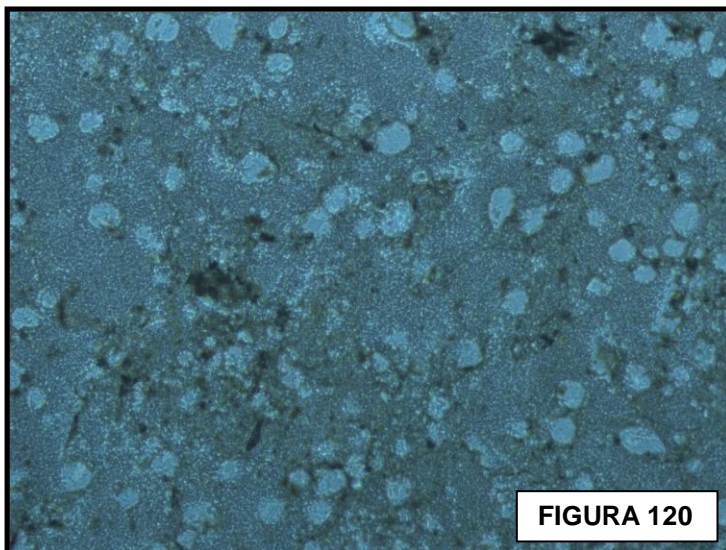


FIGURA 118: (IMATGE 2) Imatge del pouet control de les cardiacATDPCs després de dues setmanes d'estar sembrades.



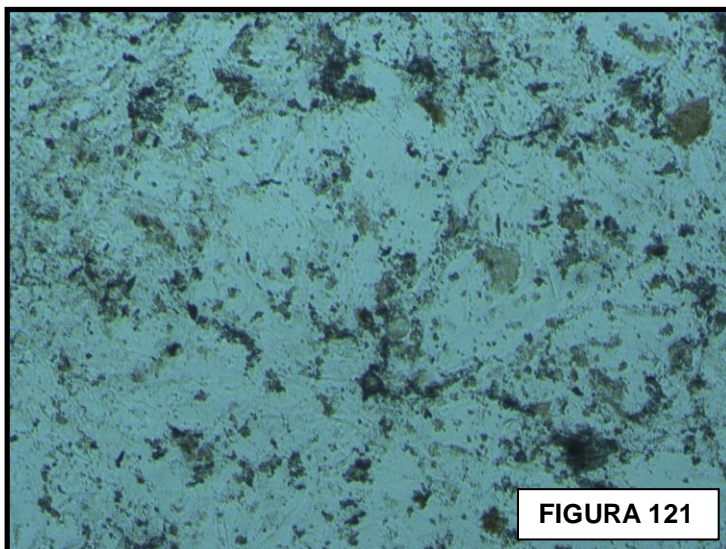
DIF. ADIPOGÈNICA:

En aquesta imatge les cèl·lules continuen tenint la mateixa morfologia que abans de la diferenciació. Per aquest motiu, intuïm que aquest tipus cel·lular pot ser que no tingui la capacitat de diferenciar-se cap a adipòcits. (IMATGE 3)



DIF. CONDRÒGÈNICA:

En aquest cas, degut al canvi bruscat al qual estem sotmetent a les cèl·lules i a que les estem forçant a que diferenciïn cap a un tipus cel·lular diferent, hem observat que desprenen molta matèria de rebuig que dificulta la visualització de les mateixes. Per tant, no podem apreciar si s'han diferenciat o no. (IMATGE 4)



DIF. OSTEOGÈNICA:

Les cèl·lules també han després una certa quantitat de matèria de rebuig que també dificulta la bona observació de les cèl·lules. (IMATGE 5)

7.5.1.2. SubATDPCS P.8

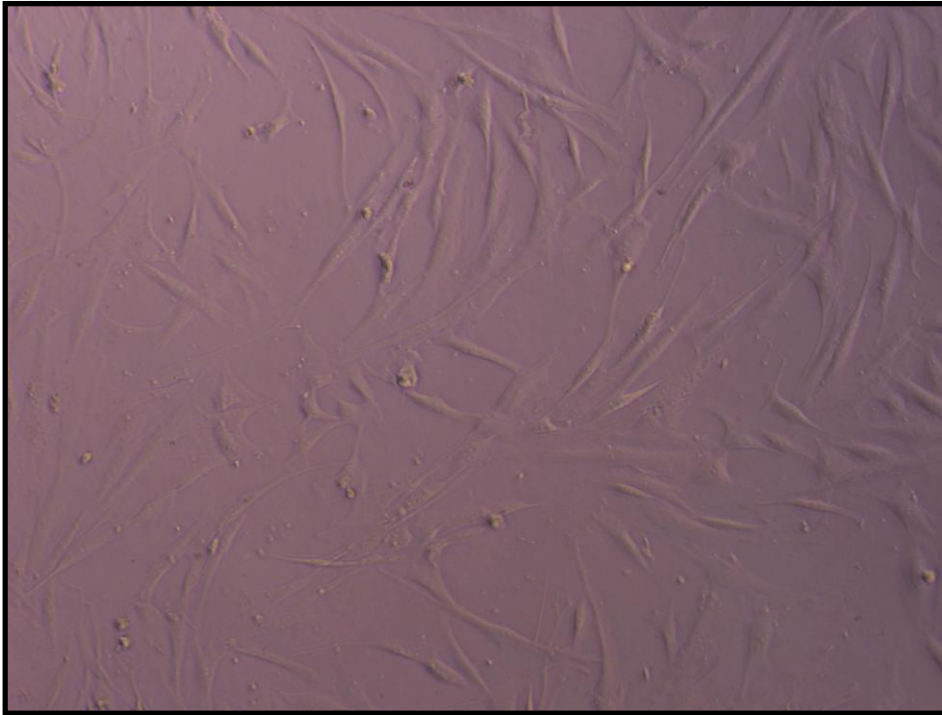


FIGURA 122: (IMATGE 1) Imatge de les subATDPCs un dia després de ser sembrades en el pouet control de les plaques de diferenciació.

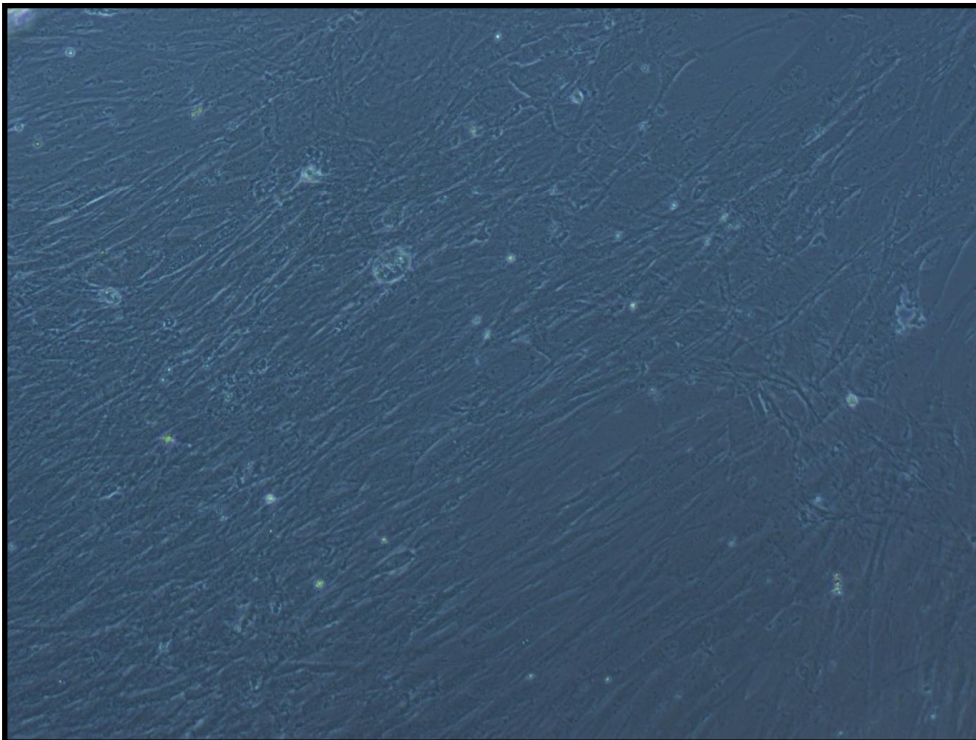
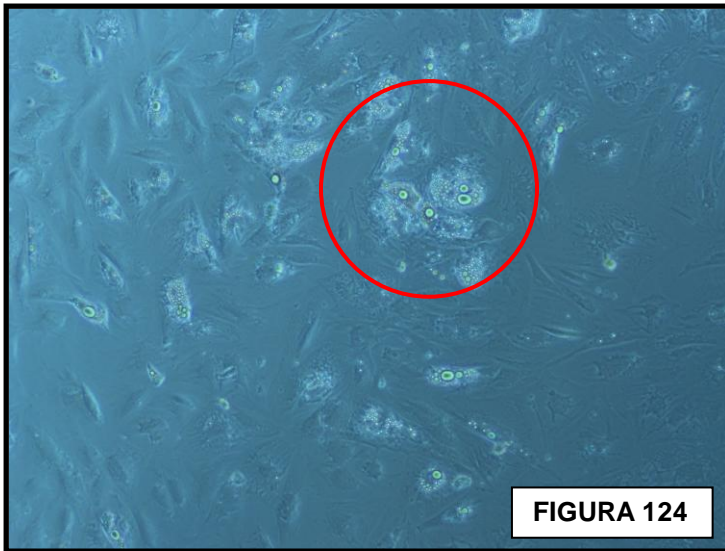
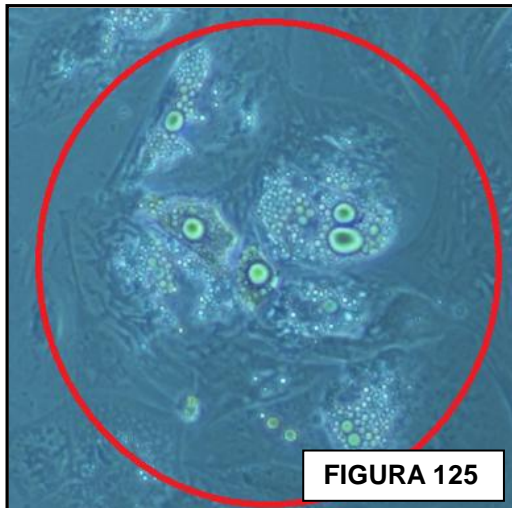


FIGURA 123: (IMATGE 2) Imatge del pouet control que conté subATDPCs dues setmanes després de la seva sembra.

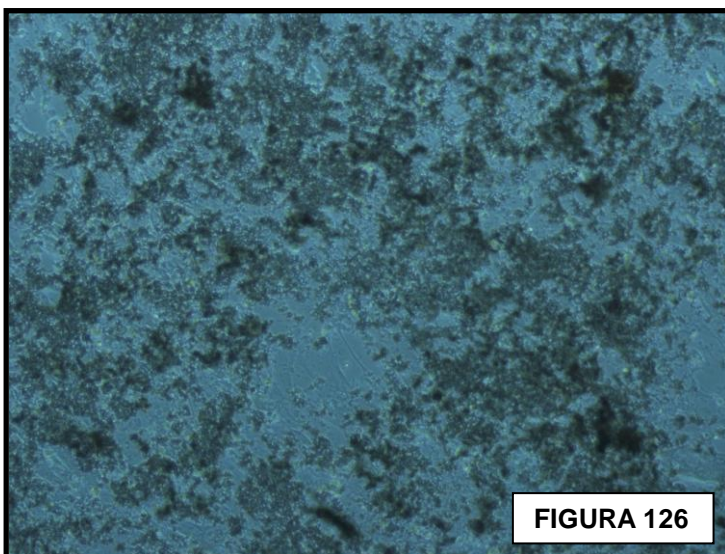


DIF. ADIPOGÈNICA:

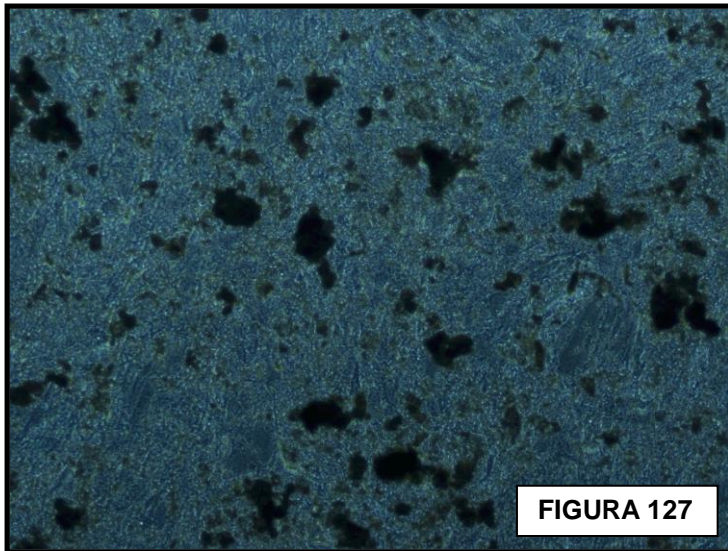
En aquest cas, sembla que les cèl·lules han començat ja el procés de diferenciació. Han perdut parcialment l'estructura allargada que tenien, i estan començant a fer-se visibles les gotes lipídiques en el seu interior (cercle vermell). (IMATGE 3)



Imatge ampliada de la zona on són més visibles les gotes lipídiques que s'han format a l'interior de les cèl·lules. De moment, podem començar a afirmar que les cèl·lules mare del tipus subATDPCs tenen la capacitat de diferenciar-se a adipòcits. Haurem de confirmar aquesta hipòtesi en les tincions que durem a terme posteriorment.



DIF. CONDRÒGÈNICA: En aquest cas, no podem observar les cèl·lules degut a la gran quantitat de matèria de rebuig que han expulsat. Per tant, haurem d'esperar a la tinció per observar-ne el resultat.



DIF. OSTEOGÈNICA: La matèria de rebuig també ens impedeix visualitzar les cèl·lules. En aquest punt, no podem saber si s'han diferenciat o no.

7.5.1.3. CMPCS P.6

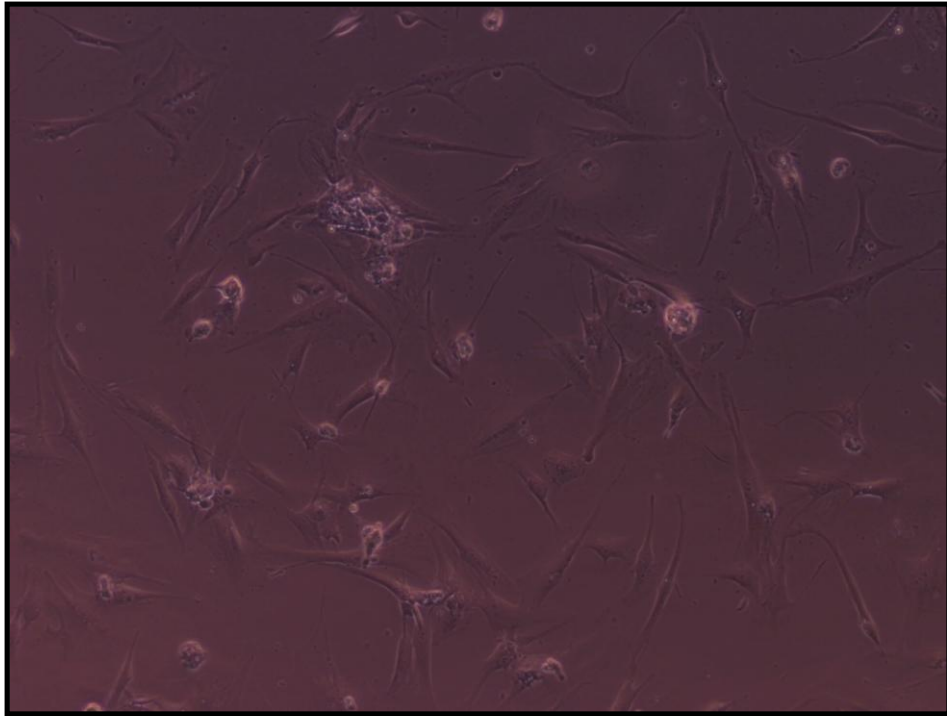


FIGURA 128: (IMATGE 1) Imatge del pouet que conté les cèl·lules control CMPCs el dia després de la seva sembra.

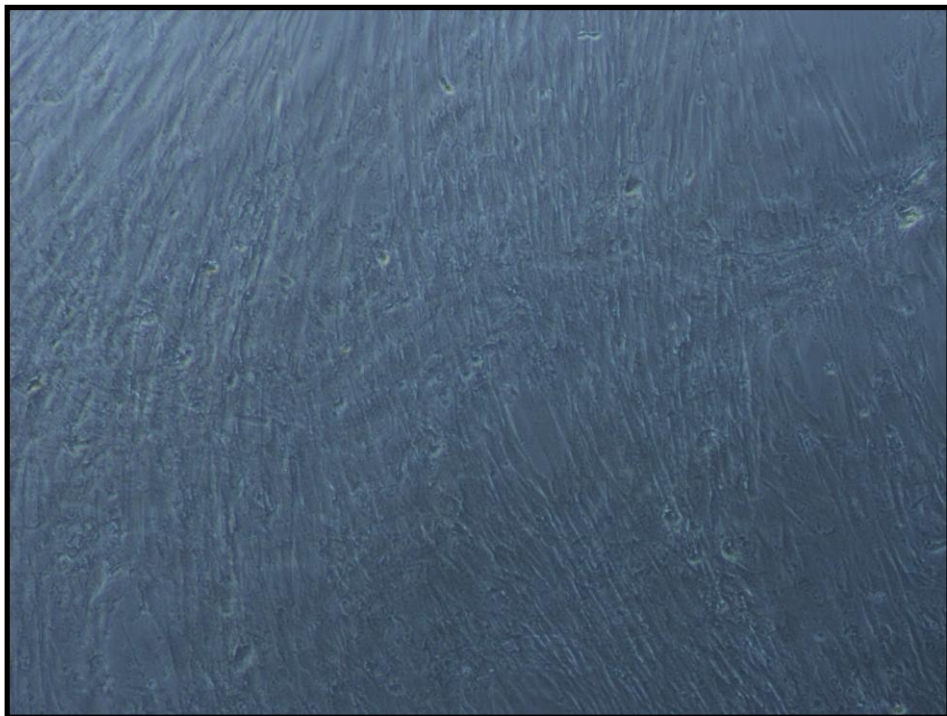
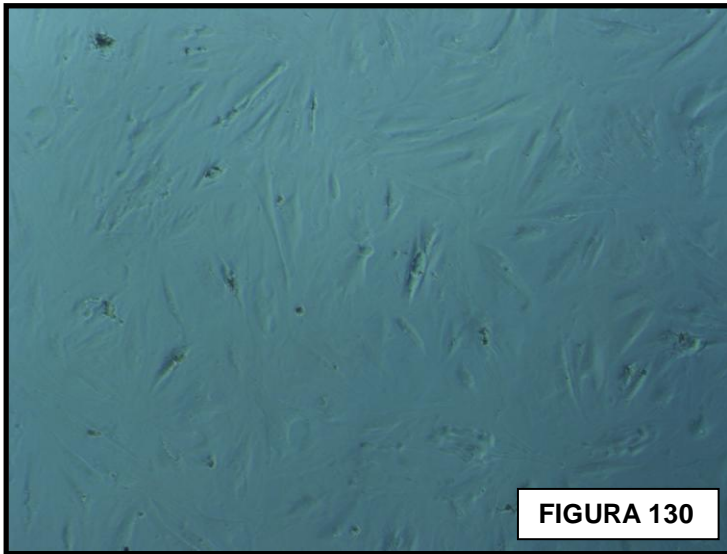
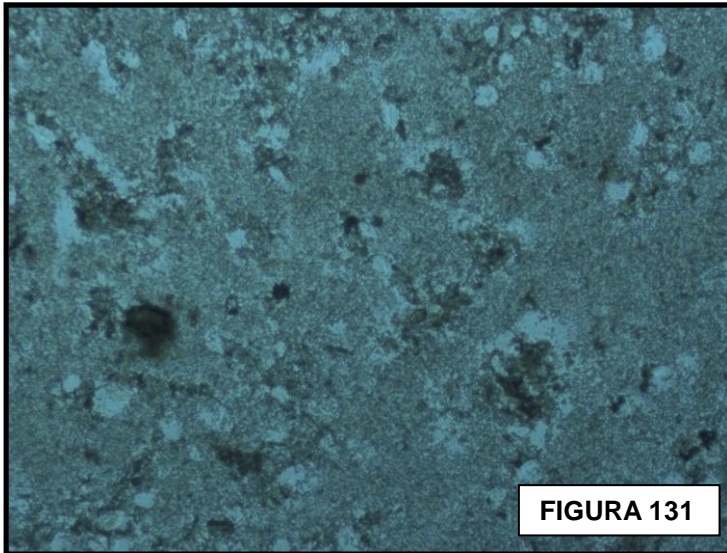


FIGURA 129: (IMATGE 2) Les cèl·lules CMPCs després de dues setmanes d'haver-les sembrat en el pouet corresponent.



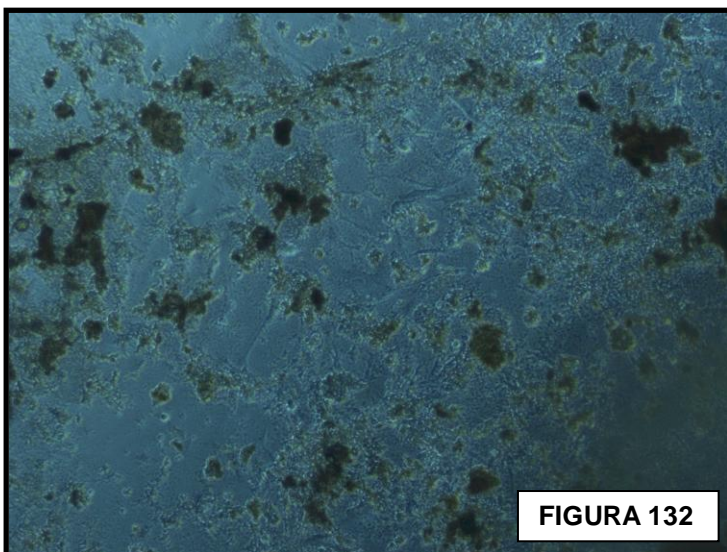
DIF. ADIPOGÈNICA:

En la imatge següent podem observar que les cèl·lules no mostren cap signe d'haver-se diferenciat cap a adipòcits. Per tan diríem que les cèl·lules CMPCs no tenen la capacitat per diferenciar-se a aquest tipus de cèl·lules.



DIF. CONDRÒGÈNICA:

No podem visualitzar les cèl·lules degut a la matèria de rebuig que hi ha en el medi de cultiu.



DIF. OSTEOGÈNICA:

En les poques cèl·lules que visualitzem de moment no podem distingir cap símbol de diferenciació. Haurem d'esperar fins a la tinció per tal de saber si el resultat és positiu o no.

7.5.2. IMATGES TINCIÓ

A continuació, mitjançant les imatges que vam prendre amb el microscopi de les tincions extraurem les conclusions de quins tipus cel·lulars són els que han assolit cada una de les diferenciacions.

7.5.2.1. DIFERENCIACIÓ ADIPOGÈNICA

En el cas de que les cèl·lules s'haguessin diferenciat cap a adipòcits, el tint hauria tenyit les gotes lipídiques que s'han format a l'interior de les cèl·lules.

SubATDPCs P.8

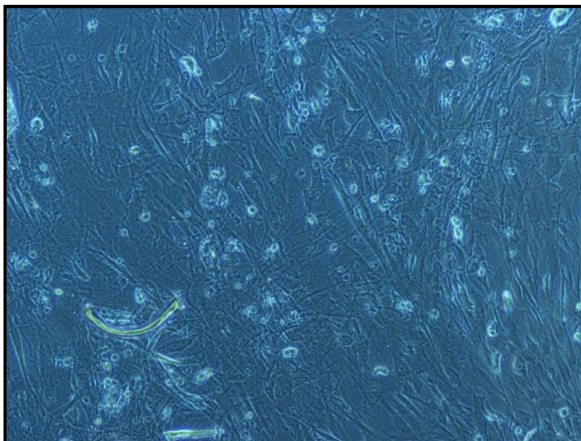


FIGURA 133: Tinció diferenciació en cultiu control.

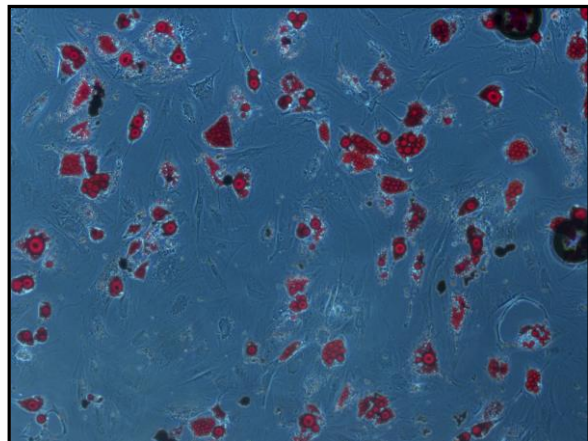


FIGURA 134: Tinció diferenciació en cultiu tractat.

En el cas de les SubATDPCs es poden observar en la imatge de la dreta una espècie de bombolles tenyides de color vermell. Aquestes són les gotes lipídiques que s'han format després de la diferenciació adipogènica. Per tant, podríem afirmar que les SubATDPCs tenen capacitat per diferenciar-se a adipòcits.

A més a més, si comparem les dues imatges podem observar que la morfologia de les cèl·lules també ha canviat. Han deixat de ser tan allargades per passar a tenir una estructura una mica més globular.

CardiacATDPCs P.6

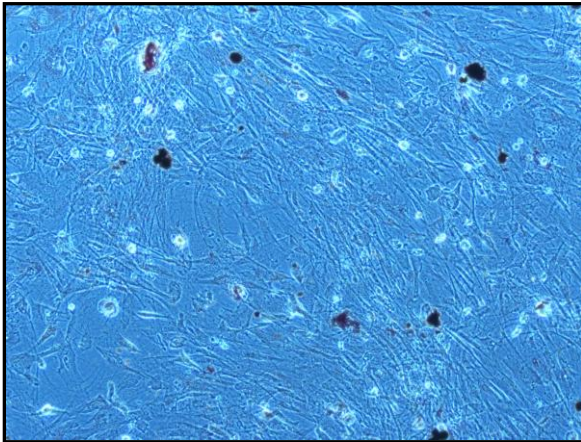


FIGURA 135: Tinció diferenciació en cultiu control.

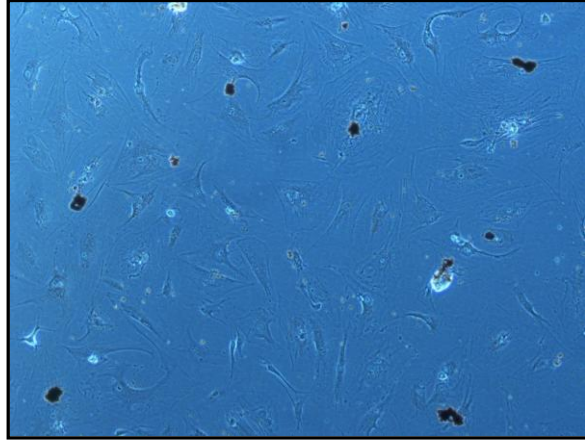


FIGURA 136: Tinció diferenciació en cultiu tractat.

En el cas de les cardiacATDPCs no hi ha cap zona tenyida, el que significa que no s'ha dut a terme la diferenciació cap a adipòcits.

Les cèl·lules mantenen la mateixa estructura i morfologia que en el pouet control.

CMPCs P.8

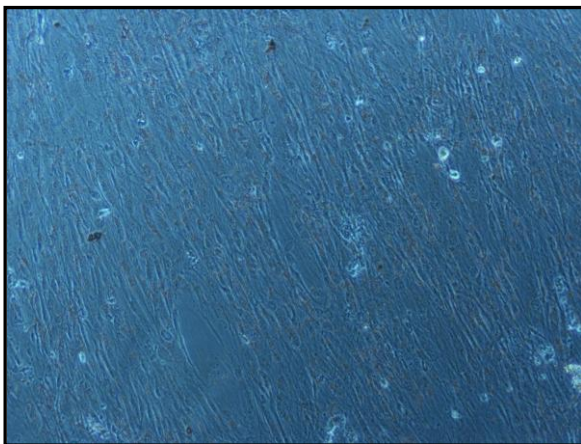


FIGURA 137: Tinció diferenciació en cultiu control.

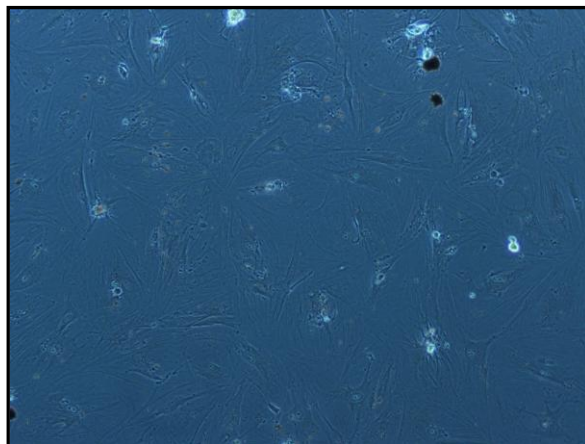


FIGURA 138: Tinció diferenciació en cultiu tractat.

En aquest cas, la diferenciació tampoc ha tingut èxit. Les cèl·lules CMPCs no s'han diferenciat cap a adipòcits tot i estar sempre amb el medi de diferenciació corresponent.

En els últims dos tipus cel·lulars que no s'han diferenciat podem observar que el nombre de cèl·lules que contenen és molt inferior al que contenen els pouets control de les mateixes. Això és degut a que per la proliferació de les cèl·lules és molt més adient el medi de cultiu normal. El medi de diferenciació, degut a la seva composició, fa alentir la duplicació de la població cel·lular.

7.5.2.2. DIFERENCIACIÓ OSTEOGÈNICA

Si les cèl·lules haguessin sofert la diferenciació, el tint hauria d'haver tenyit els dipòsits de calci que s'han format dins les cèl·lules.

SubATDPCs P.8

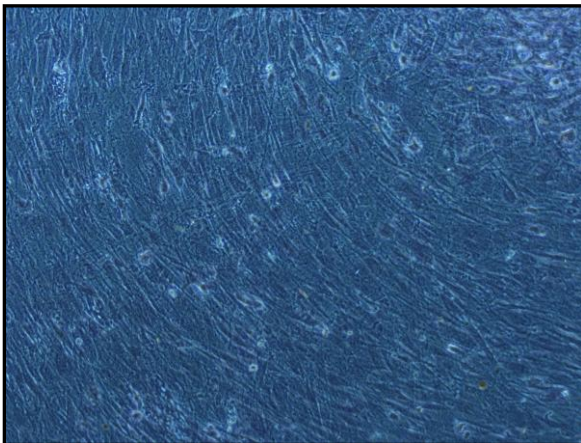


FIGURA 139: Tinció diferenciació en cultiu control.

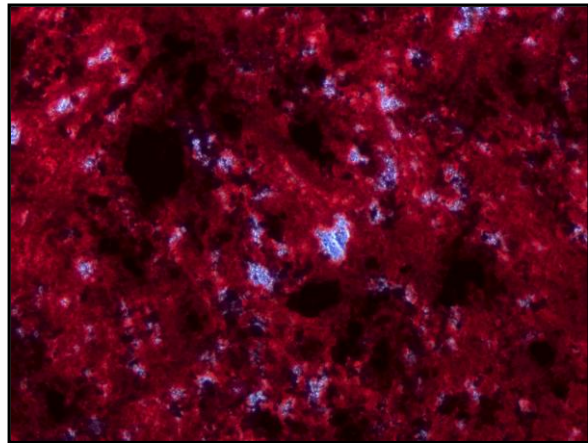


FIGURA 140: Tinció diferenciació en cultiu tractat.

Les SubATDPCs han tingut la capacitat de diferenciar-se a osteòcits ja que, com s'observa a la imatge de la dreta, el tint ha tenyit gairebé tota l'extensió de cèl·lules. Les zones més fosques representen els principals dipòsits de calci que s'han format.

CardiacATDPCs P.6

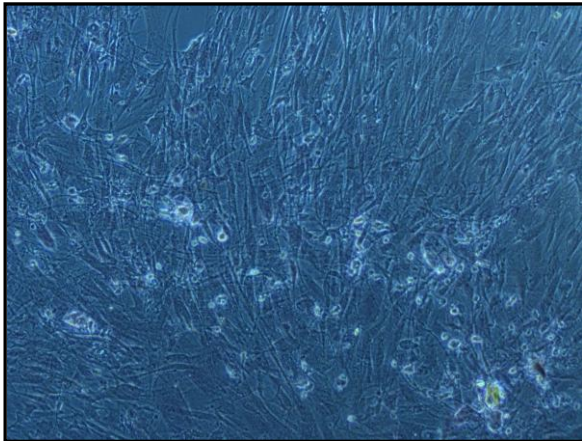


FIGURA 141: Tinció diferenciació en cultiu control.

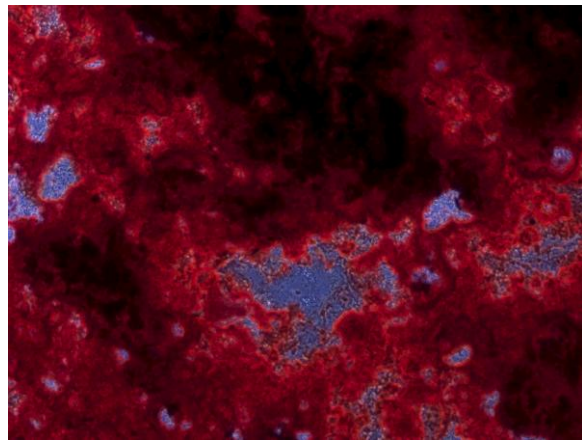


FIGURA 142: Tinció diferenciació en cultiu tractat.

En aquest cas, la diferenciació també ha estat positiva. Les cardiacATDPCs han aconseguit diferenciar-se cap a osteòcits després d'estar 21 dies en medi de diferenciació.

CMPCs

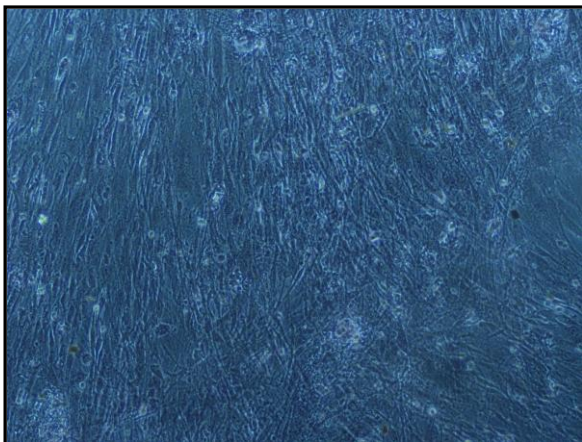


FIGURA 143: Tinció diferenciació en cultiu control.

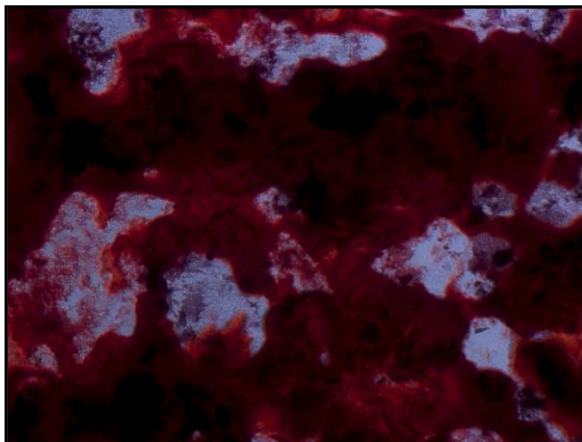


FIGURA 144: Tinció diferenciació en cultiu tractat.

Les CMPCs també s'han diferenciat. Així doncs, tenen la capacitat per diferenciar-se cap a osteòcits igual que els altres dos tipus cel·lulars.

7.5.2.3. DIFERENCIACIÓ CONDROGÈNICA

El tint hauria d'haver tenyit els cúmuls de cèl·lules que s'haurien de formar si la diferenciació s'ha realitzat de forma satisfactòria.

SubATDPCs P.8

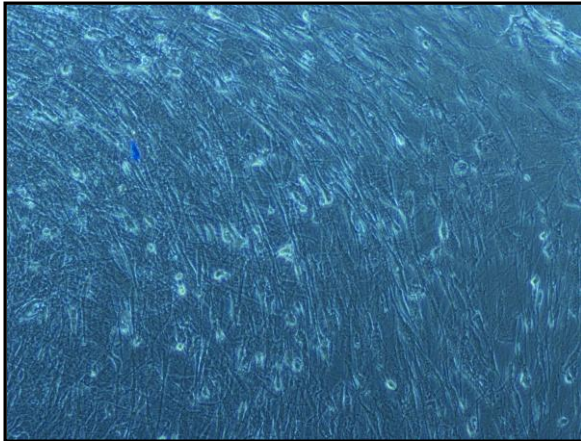


FIGURA 145: Tinció diferenciació en cultiu control.



FIGURA 146: Tinció diferenciació en cultiu tractat.

No hi ha indicis de que s'hagin diferenciat a condrocits. No hi ha cap zona amb coloració per tant deduïm que les SubATDPCs no tenen la capacitat de diferenciar-se cap a aquest tipus cel·lular. Tot i això observem que les cèl·lules no tenen la mateixa morfologia que abans o si més no, no les podem observar de manera tant clara.

cardiacATDPCs

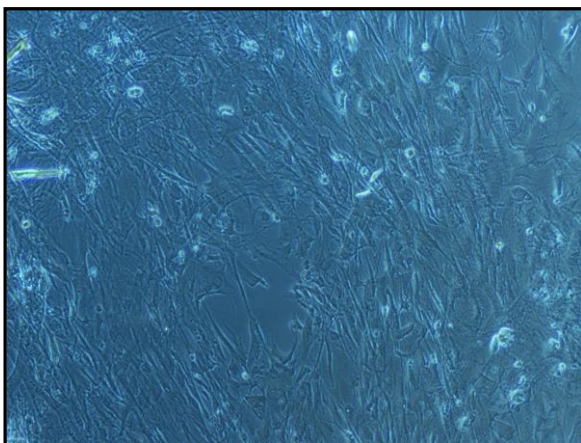


FIGURA 147: Tinció diferenciació en cultiu control.

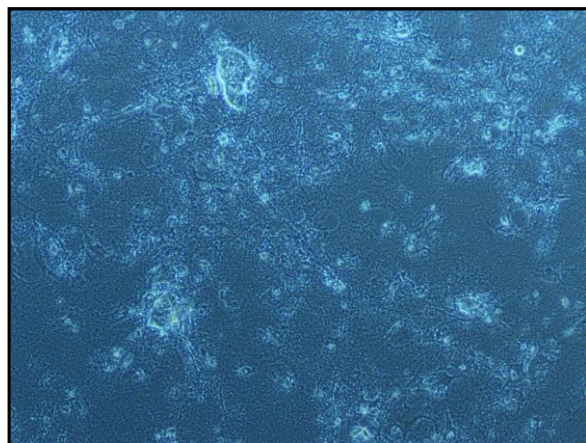


FIGURA 148: Tinció diferenciació en cultiu tractat.

El resultat de la diferenciació condrogènica en les cardiacATDPCs no ha estat satisfactori. No han aconseguit diferenciar-se cap a condrocits.

CMPCs

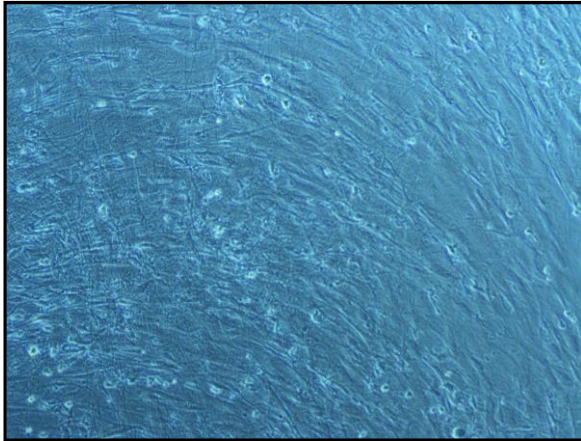


FIGURA 149: Tinció diferenciació en cultiu control.

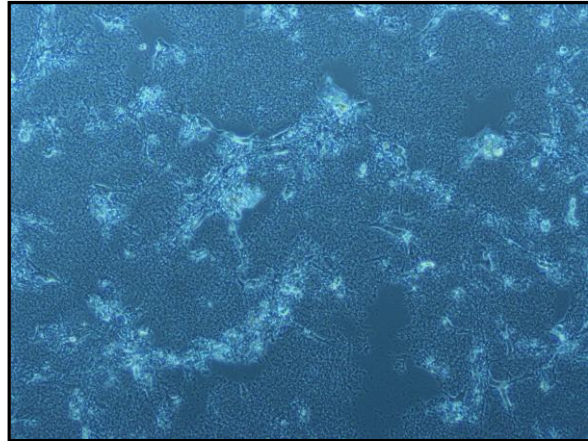


FIGURA 150: Tinció diferenciació en cultiu tractat.

Les CMPCs tampoc han assolit la diferenciació condrogènica. Tot i que la seva morfologia també ha variat respecte a les cèl·lules del pouet control.

7.6. DISCUSSIÓ

Després de dur a terme l'experiment de diferenciació, hem pogut comprovar que no tots els tipus cel·lulars tenen la capacitat de diferenciar-se cap a adipòcits, condròcits i osteòcits.

Les úniques cèl·lules que tenen la capacitat de diferenciar-se cap a adipòcits són les cèl·lules que reben el nom de subATDPCS. La resta de grups cel·lulars amb els quals s'ha dut a terme l'experiment, CMPCs i cardiacATDPCS, no han tingut la capacitat per diferenciar-se a adipòcits. Les subATDPCS, han estat les úniques cèl·lules que han canviat la seva morfologia i a l'interior de les quals han aparegut les gotes lipídiques típiques de les cèl·lules adipogèniques.

En quant a la diferenciació osteogènica, el resultat ha estat positiu amb els tres grups cel·lulars. Tant les cardiacATDPCS com les subATDPCS com les CMPCs podem afirmar que tenen capacitat per a diferenciar-se cap a osteòcits.

En els tres casos, s'han format dipòsits de calci que ens han permès poder afirmar que la diferenciació s'ha assolit satisfactòriament.

Per últim, no ha estat possible saber quines són les cèl·lules que tenen la capacitat de diferenciar-se cap a condròcits ja que els pouets on es portava a terme la diferenciació han resultat estar contaminats. La contaminació ha estat deguda a que el medi de diferenciació condrogènica estava contaminat. En les imatges preses després de la tinció com ja hem vist les cèl·lules havien canviat de morfologia però tot i així no hi havia cap zona tenyida que ens indiqués que s'havia portat a terme la diferenciació. Aquest canvi de morfologia s'explica degut a la contaminació, ja que el que observàvem a les imatges no eren les cèl·lules mare sinó els organismes que les havien contaminat.

Per tant, segons els resultats obtinguts les cèl·lules amb capacitat de diferenciació cap a més tipus cel·lulars diferents són les subATDPCS. Han assolit la diferenciació cap a adipòcits i a osteòcits.

En canvi, les CMPCs i les cardiacATDPCs només s'han pogut diferenciar cap a osteòcits.

7.7. CONCLUSIONS

D'aquest experiment n'extraïem la conclusió que les cèl·lules que tenen més capacitat de diferenciar-se cap a altres llinatges són les subATDPCs. Per aquest motiu, serien les cèl·lules més pluripotents, és a dir, amb major capacitat de diferenciar-se cap a múltiples tipus cel·lulars. Estarien en un estat més primerenc en el procés de diferenciació. Això els confereix una característica fonamental en la definició de la cèl·lula mare i per tant, tindrien el potencial de ser utilitzades per a múltiples teràpies cel·lulars de regeneració de diversos òrgans. De tota manera, seria imprescindible fer un estudi més profund per cada necessitat terapèutica en concret.

En canvi, les cardiacATDPCs i les CMPCs només s'han diferenciat cap a osteòcits, cosa que fa pensar que la seva capacitat de diferenciació és més baixa. Podríem dir doncs que no són tan pluripotents com les subATDPCs i per tant, estan més compromeses cap a un llinatge determinat. L'ambient cardiomiogènic en el que es troben ambdós tipus cel·lulars ens faria pensar en una major capacitat de diferenciar-se cap a llinatge cardíac. Això però, s'hauria de demostrar cultivant les cèl·lules amb medi de diferenciació cardiomiogènic. De fet, en un treball previ realitzat per Bayés Genís i col·laboradors, es demostra com les cardiacATDPCs presenten marcadors cardíacs de manera inherent i són capaces d'expressar-ne de nous amb els estímuls adients. Així doncs, les cardiacATDPCs tenen potencial cardiomiogènic (capacitat per diferenciar-se a cardiomiòcits) i serien doncs unes bones candidates per a ser utilitzades en la teràpia cel·lular per a la regeneració cardíaca. Pel que fa a les CMPCs, s'haurien de dissenyar nous experiments que ens mostressin si aquestes cèl·lules presenten la capacitat de diferenciar-se cap a llinatge cardíac i per tant, poden ser útils per a la regeneració del miocardi infartat.

CONCLUSIONS

8. CONCLUSIONS TREBALL

- Les malalties cardiovasculars són la primera causa de mortalitat a l'Estat Espanyol.
- Aquestes malalties, acostumen a tenir més incidència en les dones, sobretot després de la menopausa, que en els homes.
- Els principals factors de risc modificables són: el tabac, el colesterol, una dieta no equilibrada, la diabetis, l'obesitat, la hipertensió arterial, el sedentarisme, l'alcohol i l'estrès.
- Dels factors de risc no modificables destaquen: els genètics, l'edat i el sexe.
- L'infart de miocardi, té lloc en el moment en que la irrigació sanguínia, d'una determinada part del cor, no és suficient per cobrir les necessitats d'aquesta, produint la necrosi del teixit afectat.
- Els principals símptomes de l'infart cardíac són: dolor toràctic, dificultat per respirar, ganes de vomitar i mareig, fred i pell humida i pèrdua del coneixement.
- Les solucions terapèutiques a l'infart cardíac són: el trasplantament cardíac i la teràpia regenerativa amb cèl·lules mare.
- El trasplantament de cor és una tècnica molt utilitzada, però encara no del tot efectiva degut als problemes de rebuig i l'alta possibilitat d'infeccions durant i després de la intervenció.
- La teràpia regenerativa amb cèl·lules mare és una tècnica molt nova que encara es troba en vies d'investigació, tot i així, es creu que té grans probabilitats d'èxit.
- Per a dur a terme la regeneració cardíaca s'està treballant a nivell d'investigació amb cèl·lules mare adultes i cèl·lules mare embrionàries.
- Les principals poblacions de cèl·lules mare adultes presents al cor són: CMPCs (cèl·lules mare del teixit cardíac auricular), cardiacATDPCs (cèl·lules mare del greix epicàrdic) i subATDPCs (cèl·lules mare del greix subcutani).
- Les cèl·lules mare embrionàries tenen una gran capacitat de proliferació i podrien ser molt vàlides per a la regeneració cardíaca però poden ocasionar problemes, a conseqüència de la possible formació de tumors.

- Per tal que les teràpies de regeneració siguin eficaces cal disposar d'un nombre molt elevat de cèl·lules mare.
- En l'estudi experimental efectuat en aquest treball, s'ha constatat que les CMPCs (cèl·lules mare del teixit cardíac auricular) són les cèl·lules mare amb una velocitat major velocitat de creixement. D'acord amb aquest criteri podrien ser les més adequades per a la teràpia regenerativa.
- La vellesa de les cèl·lules en cultiu és un factor que modifica la seva velocitat de proliferació. Les cèl·lules més velles tindran una velocitat de creixement menor.
- Dels 3 tipus de cèl·lules mare estudiades, les cardiacATDPCs són el grup cel·lular amb una menor velocitat de creixement.
- La capacitat de diferenciació cap a adipòcits, condrocits i osteòcits ens permet intuir el potencial cardiomiogènic que tindran els diferents grups cel·lulars.
- Les subATDPCs, s'ha comprovat experimentalment, que tenen la capacitat de diferenciar-se cap a adipòcits i osteòcits, essent així, les cèl·lules amb un potencial de diferenciació més elevat i per tant, les més òptimes segons aquest criteri per a la regeneració cardíaca.
- Les CMPCs i les cardiacATDPCs tenen només la capacitat de diferenciar-se cap a osteòcits, no són tan pluripotents com les subATDPCs.
- Però, l'ambient cardiomiogènic en el que es troben les CMPCs i les cardiac ATDPCs ens faria pensar en una major capacitat de diferenciar-se cap a llinatge cardíac.
- S'ha comprovat mitjançant un treball realitzat per Bayés Genís i col·laboradors, que les cardiacATDPCs presenten marcadors cardíacs de manera inherent i són capaces d'expressar-ne de nous amb els estímuls adients.
- L'estimulació de les cèl·lules mare a través d'estímuls elèctrics i mecànics semblants als que pateixen els cardiomiòcits, fa que la seva adaptació al nou entorn on seran implantades sigui més fàcil.
- "FLAP" és un nou mètode terapèutic que consisteix en l'implant d'un fragment de teixit adipós sobre l'infart, provocant-ne una millora funcional.

BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

- CÈL·LULES MARE CARDÍAQUES I CARDIOBLASTS: Mira en el teu cor!.
<http://www.encuentros.uma.es/encuentros109/cardioblastos.htm>
(Consulta 12-5-11).
- REPARACIÓ CARDÍACA AMB CÈL·LULES MARE.
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/948/936> (Consulta 12-05-11).
- EL COR DELS GRANS PRODUEIX CÈL·LULES MARE.
http://www.gerontogeriatría.org/index.php?option=com_content&view=article&catid=81:noticias&id=667:el-corazon-de-los-mayores-produce-celulas-madre-cardiacas- (Consulta 12-05-11).
- INFART DE MIOCARDI. (Consulta 21-04-11).
<http://www20.gencat.cat/portal/site/canalsalut/menuitem.21c58aea29b124fc48af8968b0c0e1a0/?vgnnextoid=6acf8f30ac2da210VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD&vgnnextchannel=6acf8f30ac2da210VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD&vgnnextfmt=default>
- CÈL·LULA MARE. (Consulta 21-04-11).
http://ca.wikipedia.org/wiki/C%C3%A8l%C2%B7lula_mare
- LA REGNERACIÓ DEL COR I LA TERÀPIA CEL·LULAR AMB CÈL·LULES MARE. <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/trasplante/cel-madres-corazon.pdf> (Consulta: 15-06-11).
- MEDICINA REGENERATIVA. Cèl·lules mare. (Consulta 15-06-11)
<http://www.medicinaregenerativa.com/cellulesmare.htm>
- METODOLOGIES DE CULTIU CÈL·LULES EMBRIONARIES HUMANES.
(Consulta 15-06-11)http://www.cmr.b.eu/banco-lineas-celulares/ca_linies_investigacio.html
- CÈL·LULES MARE. Capítol 9. (Consulta 22-06-11)
<http://translate.google.es/translate?hl=es&sl=en&tl=ca&u=http%3A%2F%2Fstemcells.nih.gov%2Finfo%2Fscireport%2Fchapter9.asp>

- MES SALUT. Malalties cardiovasculars. (Consulta 30-06-11)
http://www.mutuaegara.es/+salud/catala/article10_1.pdf
- CARDIOPATÍA ISQUÈMICA. (Consulta 30-06-11)
<http://www.fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/cardiopatia-isquemica.html>
- MALALTIES CARDIOVASCULARS. (Consulta 30-06-11)
http://www.msps.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/equidad/07modulo_06.pdf
- CLAUDICACIÓ INTERMITENT. (Consulta 4-07-11)
<http://salud.discapnet.es/Castellano/Salud/Enfermedades/EnfermedadesDiscapitantes/C/Claudicacion/Paginas/Claudicacion.aspx>
- CÈL·LULES MARE. (Consulta 7-07-11)
<http://www.uib.es/depart/dba/cellbiology/Cultivos%20Celulares.ppt#273,25,Cu>
rva de Crecimiento (líneas estables): Fases del cultivo
- FUNDACIÓ INSTITUT GERMANS TRIAS I PUJOL. (Consulta 22-08-11)
<http://www.germanstrias.org/cat/laFundacio.php>
- RECATAVI. (Consulta 22-08-11)
http://www.recatavi.com/recatabi_concept.html
- EL COR. (Consulta 12-09-11) http://ca.wikipedia.org/wiki/Cor#El_mite_del_cor
- ARTÈRIES. (Consulta 12-09-11)
<http://ca.wikipedia.org/wiki/Art%C3%A8ries>
- CAPIL·LAR SANGUINI. (Consulta 12-09-11)
http://ca.wikipedia.org/wiki/Capil%C2%B7lar_sanguini
- ANGINA. (14-09-11)
<http://cedars-sinai.edu/International-Patients/Spanish/Condiciones-de-Salud/3.aspx>
- CARDIOPATÍA ISQUÈMICA. (Consulta 14-09-11)
<http://www.slideshare.net/cardiologia/angor-y-tratamiento>
- TRASPLANTAMENT. (Consulta 1-10-11)
http://ca.wikipedia.org/wiki/Trasplantament#Cronologia_dels_trasplantament_amb_.C3.A8xit
- TRASPLANTAMENT DE COR. (Consulta 1-10-11)
http://es.wikipedia.org/wiki/Trasplante_de_coraz%C3%B3n

- TRASPLANTAMENT DE COR. (Consulta 1-10-11)
http://www.tuotromedico.com/temas/trasplante_de_corazon.htm

ARTICLES CIENTÍFICS

- HIDALGO, J. “La regeneració del cor i la teràpia cel·lular amb cèl·lules mare”, revista Cenic. Ciències Biològiques: Volum 35. N°3 Setembre-Desembre 2004. Pag: 210-211.
- Anke M Smits, Patrick van Vliet, Corina H Metz, Tom Korfage, Joost PG Sluiter, Pieter A Doevendan & Marie-José Gouman. “Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology”, publicat online el 5 de Febrer de 2009. www.nature.com/natureprotocols
- Antoni Bayes-Genis, Carolina Soler-Botija , Jordi Farré , Pilar Sepúlveda, Angel Raya , Santiago Roura, Cristina Prat-Vidal , Carolina Gálvez-Montón , José Anastasio Montero , Dirk Büscher, Juan Carlos Izpisua Belmonte. “Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents”, Journal of Molecular and Cellular Cardiology 49 (2010) 771–780. journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjmcc
- Anke M Smits¹, Patrick van Vliet, Corina H Metz, Tom Korfage, Joost PG Sluiter, Pieter A Doevendans & Marie-José Goumans. “Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology”, publicat online el 5 de Febrer de 2009. www.nature.com/natureprotocols

ANNEXOS

10. ANNEXOS

10.1. CÀLCULS CORBA DE CREIXEMENT CEL·LULAR

10.1.1. CORBA DE CREIXEMENT DE LES SubATDPCs, CMPCs P.8 I CMPCs P.4

DIA 0 (26/08/11):

SUBPOOL 37 P.8

0	1
1	2

0	1
1	1
0	

$$\dot{x} = 1 \quad \dot{x} = 0,6 \quad \dot{x} = 0,8 \quad V_r = 470\mu\text{L}$$

Concentració cel·lular:

$$0,8 \cdot 2 \cdot 10.000 = 16000 \text{ cèl/mL}$$

$$\text{Cèl·lules totals: } 16.000 \cdot 0,47 = 7.520 \text{ cèlT}$$

1	0
1	0
2	

2	1
2	0

$$\dot{x} = 0,8 \quad \dot{x} = 1,25 \quad \dot{x} = 1,025 \quad V_r = 535\mu\text{L}$$

Concentració cel·lular:

$$1,025 \cdot 2 \cdot 10.000 = 20.500 \text{ cèl/mL}$$

$$\text{Cèl·lules totals: } 20.500 \cdot 0,535 = 10.967,5 \text{ cèlT}$$

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{7.520 + 10.967,5}{2} = 9.244cèlT$$

CMPC's P.4

0	1
0	1

0	2
1	1
1	

$\dot{x} = 0,5 \quad \dot{x} = 1 \quad \dot{x} = 0,75 \quad V_r = 490\mu\text{L}$

Concentració cel·lular:

$0,75 \cdot 2 \cdot 10.000 = 15.000 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $15.000 \cdot 0,49 = 7.350 \text{ cèlT}$

1	1
0	1
1	

2	0
1	0

$\dot{x} = 0,75 \quad \dot{x} = 0,8 \quad \dot{x} = 0,775 \quad V_r = 480\mu\text{L}$

Concentració cel·lular:

$0,775 \cdot 2 \cdot 10.000 = 15.500 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $15.500 \cdot 0,48 = 7.440 \text{ cèlT}$

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$\text{cèlT} = \frac{7.350 + 7.440}{2} = 7395 \text{ cèlT}$$

CMPC's P.8

2	1
0	1
1	

$\dot{x} = 1 \quad V_r = 500\mu\text{L}$

Concentració cel·lular:

$1 \cdot 2 \cdot 10.000 = 20.000 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $20.000 \cdot 0,5 = 10.000 \text{ cèlT}$

0	1
2	0

0	1
1	0

$\dot{x} = 0,75 \quad \dot{x} = 0,5 \quad \dot{x} = 0,625 \quad V_r = 570\mu\text{L}$

Concentració cel·lular:

$0,625 \cdot 2 \cdot 10.000 = 12.500 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $12.500 \cdot 0,57 = 7.125 \text{ cèlT}$

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$\text{cèlT} = \frac{10.000 + 7.125}{2} = 8.563 \text{ cèlT}$$

DIA 3 (29/08/11)

SUBPOOL 37 P.8

POUET 1 $\dot{x} = 4$ $\dot{x} = 5,6$ $\dot{x} = 4,8$ $V_r = 490\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $4,8 \cdot 2 \cdot 10.000 = 96.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $96.000 \cdot 0,49 = 47.040$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 6,75$ $\dot{x} = 3,5$ $\dot{x} = 5,125$ $V_r = 650\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $5,125 \cdot 2 \cdot 10.000 = 102.500$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $102.500 \cdot 0,65 = 66.625$ cèlT

$$cèlT = \frac{47.040 + 66.625}{2} = 56.833cèlT \quad \text{Quantitat de cèl·lules als dos pouets:}$$

CMPC's P.4

POUET 1 $\dot{x} = 4,6$ $\dot{x} = 3,2$ $\dot{x} = 3,9$ $V_r = 520\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $3,9 \cdot 2 \cdot 10.000 = 78.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $78.000 \cdot 0,52 = 40.560$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 5$ $\dot{x} = 9,75$ $\dot{x} = 7,375$ $V_r = 550\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $7,375 \cdot 2 \cdot 10.000 = 147.500$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $147.500 \cdot 0,55 = 81.125$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{40.560 + 81.125}{2} = 60.843cèlT$$

CMPC's P.8

POUET 1 $\dot{x} = 1,6$ $\dot{x} = 2$ $\dot{x} = 1,8$ $V_r = 610\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $1,8 \cdot 2 \cdot 10.000 = 36.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $36.000 \cdot 0,61 = 21960$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 2,2$ $\dot{x} = 2,2$ $V_r = 950\mu\text{L}$

* Un dels dos recomptes no va ser correcte per aquest motiu només hi ha una mitjana.

Concentració cel·lular: $2,2 \cdot 2 \cdot 10.000 = 44.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $44.000 \cdot 0,53 = 23.320$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{21.960 + 23.320}{2} = 22.640cèlT$$

DIA 5 (31/08/11)

SUBPOOL 37 P.8

POUET 1 $\dot{x} = 11,2$ $\dot{x} = 13,4$ $\dot{x} = 12,3$ $V_r = 470\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $12,3 \cdot 2 \cdot 10.000 = 246.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $246.000 \cdot 0,47 = 115.620$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 12,4$ $\dot{x} = 10,25$ $\dot{x} = 11,325$ $V_r = 460\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $11,325 \cdot 2 \cdot 10.000 = 226.500$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $226.500 \cdot 0,46 = 104.190$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{115.620 + 104.190}{2} = 109.905cèlT$$

CMPC's P.4

POUET 1 $\dot{x} = 23,6$ $\dot{x} = 29,2$ $\dot{x} = 26,4$ $V_r = 560\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $26,4 \cdot 2 \cdot 10.000 = 528.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $528.000 \cdot 0,56 = 295.680$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 21,4$ $\dot{x} = 21,4$ $\dot{x} = 21,4$ $V_r = 510\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $21,4 \cdot 2 \cdot 10.000 = 428.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $428.000 \cdot 0,51 = 218.280$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{295.680 + 218.280}{2} = 256.980 cèlT$$

CMPC's P.8

POUET 1 $\dot{x} = 5$ $\dot{x} = 5$ $\dot{x} = 5$ $V_r = 570\mu L$

Concentració cel·lular: $5 \cdot 2 \cdot 10.000 = 100.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $100.000 \cdot 0,57 = 57.000$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 2,8$ $\dot{x} = 2,75$ $\dot{x} = 2,775$ $V_r = 580\mu L$

Concentració cel·lular: $2,775 \cdot 2 \cdot 10.000 = 55.500$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $55.500 \cdot 0,58 = 32.190$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{57.000 + 32.190}{2} = 44.595 cèlT$$

DIA 7 (2/09/11)

SUBPOOL 37 P.8

POUET 1 $\dot{x} = 32,8$ $\dot{x} = 29,4$ $\dot{x} = 31,1$ $V_r = 560\mu L$

Concentració cel·lular: $31,1 \cdot 2 \cdot 10.000 = 622.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $622.000 \cdot 0,56 = 348.320$ cèl/mL

POUET 2 $\dot{x} = 33,4$ $\dot{x} = 42,2$ $\dot{x} = 37,8$ $V_r = 520\mu L$

Concentració cel·lular: $37,8 \cdot 2 \cdot 10.000 = 756.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $756.000 \cdot 0,52 = 393.120$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{348.320 + 393.120}{2} = 370.720 cèlT$$

CMPC's P.4

POUET 1 $\dot{x} = 66,4$ $\dot{x} = 75,4$ $\dot{x} = 70,9$ $V_r = 480\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $70,9 \cdot 2 \cdot 10.000 = 1.418.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $1.418.000 \cdot 0,48 = 680.640$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 81$ $\dot{x} = 87,4$ $\dot{x} = 84,2$ $V_r = 460\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $84,2 \cdot 2 \cdot 10.000 = 1.684.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $1.684.000 \cdot 0,46 = 774.640$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{680.640 + 774.640}{2} = 727.640 cèlT$$

CMPC's P.8

POUET 1 $\dot{x} = 11,75$ $\dot{x} = 11$ $\dot{x} = 11,375$ $V_r = 510\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $11,375 \cdot 2 \cdot 10.000 = 227.500$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $227.500 \cdot 0,51 = 116.025$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 11,4$ $\dot{x} = 16,75$ $\dot{x} = 14,075$ $V_r = 560\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $14,075 \cdot 2 \cdot 10.000 = 281.500$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $281.500 \cdot 0,56 = 157.640$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{116.025 + 157.640}{2} = 136833 cèlT$$

DIA 10 (5/09/11)**SUBPOOL 37 P.8**

POUET 1 $\dot{x} = 22,8$ $\dot{x} = 20,2$ $\dot{x} = 21,5$ $V_r = 1,2\text{mL}$

Concentració cel·lular: $21,5 \cdot 2 \cdot 10.000 = 430.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $430.000 \cdot 1,2 = 516.000$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 10,5$ $\dot{x} = 12,8$ $\dot{x} = 11,65$ $V_r = 1\text{mL}$

Concentració cel·lular: $11,65 \cdot 2 \cdot 10.000 = 233.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $233.000 \cdot 1 = 233.000$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{516.000 + 233.000}{2} = 374.500 cèlT$$

CMPC's P.4

POUET 1 $\dot{x} = 24,4$ $\dot{x} = 27,75$ $\dot{x} = 26,075$ $V_r = 1,4\text{mL}$

Concentració cel·lular: $26,075 \cdot 2 \cdot 10.000 = 521.500$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $521.500 \cdot 1,4 = 730.100$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 32$ $\dot{x} = 36$ $\dot{x} = 34$ $V_r = 1,2\text{mL}$

Concentració cel·lular: $34 \cdot 2 \cdot 10.000 = 680.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $680.000 \cdot 1,2 = 816.000$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{730.100 + 816.000}{2} = 773.050 cèlT$$

CMPC's P.8

POUET 1 $\dot{x} = 20$ $\dot{x} = 15,75$ $\dot{x} = 17,875$ $V_r = 1,3\text{mL}$

Concentració cel·lular: $17,875 \cdot 2 \cdot 10.000 = 357.500$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $357.500 \cdot 1,3 = 464.750$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 9,6$ $\dot{x} = 12,2$ $\dot{x} = 10,9$ $V_r = 1,3\text{mL}$

Concentració cel·lular: $10,9 \cdot 2 \cdot 10.000 = 218.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $218.000 \cdot 1,3 = 283.400$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{464.750 + 283.400}{2} = 374.075cèlT$$

DIA 12 (7/09/11)

SUBPOOL 37 P.8

POUET 1 $\dot{x} = 16,9$ $\dot{x} = 17,3$ $\dot{x} = 17,1$ $V_r = 1,1\text{mL}$

Concentració cel·lular: $17,1 \cdot 2 \cdot 10.000 = 342.000 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $342.000 \cdot 1,1 = 376.200 \text{ cèlT}$

POUET 2 $\dot{x} = 23,2$ $\dot{x} = 21,4$ $\dot{x} = 22,3$ $V_r = 1\text{mL}$

Concentració cel·lular: $22,3 \cdot 2 \cdot 10.000 = 446.000 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $446.000 \cdot 1 = 446.000 \text{ cèlT}$

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{376.200 + 446.000}{2} = 411.100cèlT$$

CMPC's P.4

POUET 1 $\dot{x} = 29,75$ $\dot{x} = 26,5$ $\dot{x} = 28,13$ $V_r = 1,6\text{mL}$

Concentració cel·lular: $28,13 \cdot 2 \cdot 10.000 = 562.500 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $562.500 \cdot 1,6 = 900.000 \text{ cèlT}$

POUET 2 $\dot{x} = 22,5$ $\dot{x} = 23,5$ $\dot{x} = 23$ $V_r = 1,5\text{mL}$

Concentració cel·lular: $23 \cdot 2 \cdot 10.000 = 460.000 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $460.000 \cdot 1,5 = 690.000 \text{ cèlT}$

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{900.000 + 690.000}{2} = 795.000cèlT$$

CMPC's P.8

POUET 1 $\dot{x} = 18,75$ $\dot{x} = 28,5$ $\dot{x} = 23,625$ $V_r = 1,1\text{mL}$

Concentració cel·lular: $23,625 \cdot 2 \cdot 10.000 = 472.500\text{cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $472.500 \cdot 1,1 = 519.750 \text{ cèlT}$

POUET 2 $\dot{x} = 26,25$ $\dot{x} = 31$ $\dot{x} = 28,625$ $V_r = 1,2\text{mL}$

Concentració cel·lular: $28,625 \cdot 2 \cdot 10.000 = 572.500 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $572.500 \cdot 1,2 = 687.000 \text{ cèlT}$

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{519.750 + 687.000}{2} = 603.375 cèlT$$

10.1.2. CORBA DE CREIXEMENT DE LES cardiacATDPCs

DIA 0

POUET 1 $\dot{x} = 2,2$ $\dot{x} = 2$ $\dot{x} = 2,1$ $V_r = 230\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $2,1 \cdot 2 \cdot 10.000 = 42.000 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $42.000 \cdot 0,23 = 9.660 \text{ cèlT}$

POUET 2 $\dot{x} = 0,6$ $\dot{x} = 1,6$ $\dot{x} = 1,1$ $V_r = 300\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $1,1 \cdot 2 \cdot 10.000 = 22.000 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $22.000 \cdot 0,3 = 6.600 \text{ cèlT}$

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{9.660 + 6.600}{2} = 8.130 cèlT$$

DIA 2

POUET 1 $\dot{x} = 3,4$ $\dot{x} = 3,2$ $\dot{x} = 3,3$ $V_r = 380\mu\text{L}$

Concentració cel·lular: $3,3 \cdot 2 \cdot 10.000 = 66.000 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $66.000 \cdot 0,38 = 25.080 \text{ cèlT}$

POUET 2

* El resultat del recompte del pouet 2 va ser molt més elevat del què tocava per tan el vam descartar. Aquest fet pot ser degut a que durant la sembra en aquest pouet hi va anar a parar més quantitat de solució cel·lular de la que tocava i per tant, des d'un principi ja hi havia més quantitat de cèl·lules.

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = 25.080$$

DIA 5

OUET 1 $\dot{x} = 2,2$ $\dot{x} = 1,4$ $\dot{x} = 1,8$ $Vr = 520\mu L$

Concentració cel·lular: $1,8 \cdot 2 \cdot 10.000 = 36.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $36.000 \cdot 0,52 = 18.720$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 1,8$ $\dot{x} = 2,4$ $\dot{x} = 2,1$ $Vr = 480\mu L$

Concentració cel·lular: $2,1 \cdot 2 \cdot 10.000 = 42.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $42.000 \cdot 0,48 = 20.160$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{18.720 + 20.160}{2} = 19.440 \text{ cèlT}$$

DIA 7

POUET 1 $\dot{x} = 5,6$ $\dot{x} = 7$ $\dot{x} = 6,3$ $Vr = 480\mu L$

Concentració cel·lular: $6,3 \cdot 2 \cdot 10.000 = 126.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $126.000 \cdot 0,48 = 60.480$ cèlT

POUET 2 $\dot{x} = 5,4$ $\dot{x} = 4$ $\dot{x} = 4,7$ $Vr = 470\mu L$

Concentració cel·lular: $4,7 \cdot 2 \cdot 10.000 = 94.000$ cèl/mL

Cèl·lules totals: $94.000 \cdot 0,47 = 44.180$ cèlT

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{60.480 + 44.180}{2} = 52.330cèlT$$

DIA 9

POUET 1 $\dot{x} = 5$ $\dot{x} = 4,4$ $\dot{x} = 4,67$ $Vr = 950\mu L$

Concentració cel·lular: $4,67 \cdot 2 \cdot 10.000 = 93.333,33 \text{ cèl/mL}$

Cèl·lules totals: $93.333,33 \cdot 0,95 = 88.666,67 \text{ cèlT}$

POUET 2 $\dot{x} = 14,8$ $\dot{x} = 15,8$ $\dot{x} = 15,3$ $Vr = 940\mu L$

Concentració cel·lular: $15,3 \cdot 2 \cdot 10.000 = 306.000 \text{ cèl}$

Cèl·lules totals: $306.000 \cdot 0,94 = 287.640 \text{ cèlT}$

Quantitat de cèl·lules als dos pouets:

$$cèlT = \frac{88.666,67 + 287.640}{2} = 188.153cèlT$$

10.2. ENTREVISTES GRUP DE RECERCA ICREC

A continuació, es mostraran les conclusions extretes de les entrevistes fetes a tots els membres del grup de recerca ICREC. Per consultar les entrevistes cal anar a l'apartat d'annexos.

10.3. OBJECTIUS

- Conèixer més detalladament el projecte en el qual està treballant el grup de recerca ICREC.

- Saber quins són els principals objectius de la recerca.

- Conèixer els avenços que han realitzat des de l'inici de la recerca i quins fets els han portat cap a ells.

- Descobrir les dificultats que els sorgeixen durant el desenvolupament del projecte.

- Acotar el temps aproximat que els queda per tal de poder arribar a assolir tots els objectius del projecte i poder extreure'n una conclusió.

10.4. INTRODUCCIÓ

El grup de recerca ICREC és un grup d'investigació cardiovascular nascut la primera dècada del 2000. El seu nom, es deu al seu objecte d'estudi: Insuficiència Cardíaca i Regeneració Cardíaca. Tot el seu treball està relacionat amb la investigació cardíaca, tant a nivell de recerca bàsica com de recerca clínica.



FIGURA 151: Institut d'investigació en ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

Tenen la seva seu en els centres d'investigació situats a l'hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona concretament, en l'Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol.

Aquest grup de recerca està liderat per el doctor Toni Bayés i consta de vuit membres més: l'Aida Llucià, la Carol Galvez, la Cristina Prat, la Carolina Soler, la Laura, la Paloma Gastelurrutia, en Santi Roura i en Josep-Maria Pujal.



FIGURA 152: Fotografia de tots els membres integrants del grup de recerca ICREC.

El grup de recerca ICREC forma part d'un projecte europeu anomenat RECATAVI. On hi participen en col·laboració diferents centres de la Unió europea, i cada centre s'ocupa d'un aspecte diferent de la investigació. Entre aquests grups, trobem experts en enginyeria de teixits, tecnologies de cèl·lules mare, experts en materials, enginyers biomecànics i experts en la investigació clínica cardiològica.

L'objectiu d'aquest projecte és acabar creant una espècie de "tirit" (composta per cèl·lules mare immerses en un hidrogel i envoltades per una matriu), que al col·locar-la sobre la zona afectada provoqui una millora del teixit infartat. A més a més, volen aconseguir aportar nous vasos i revascularitzar el teixit afectat per tal de recuperar al màxim la seva funcionalitat.

Per tal d'assolir aquest objectiu, és necessari determinar el potencial cardiomiogènic de cada tipus cel·lular. Per fer això, es porten a terme tan experiments "ex vivo" als laboratoris, com "in vivo" en models amb animals petits, ratolins i més grans, com els porcs. D'aquesta manera, aconseguen saber quin tipus cel·lular és el més adient, i quin donarà més bons resultats per dur a terme aquest tipus de teràpies regeneratives.

10.5. CONCLUSIONS

Les conclusions, ens han ajudat a entendre i saber quin camí segueix la línia d'investigació del grup de recerca ICREC i quins són els seus pròxims objectius en la recerca.

- En primer lloc, és important destacar que aquest **és un projecte de creació bastant recent**, creat a la primera dècada del 2000. Els integrants més veterans van començar a formar part del grup més o menys l'any 2002 i a partir d'aquí s'hi van anar afegint la resta de components.

La majoria van ser atrets pel tema del projecte, que en aquell moment era un "boom" en el sector de la medicina. La causa, era que es creia que les cèl·lules mare revolucionarien totalment el sector de la investigació mèdica que té com a objecte d'estudi la regeneració de teixits i òrgans del cos.

Actualment, les expectatives per a la capacitat d'aquestes cèl·lules de regenerar completament certs òrgans o teixits malmesos del nostre organisme ha disminuït relativament. Tot i això, aquesta línia d'investigació continua essent molt viable i cal continuar tenint-la oberta.

- En segon lloc, un aspecte important a destacar és la **gran varietat d'especialistes que formen part d'aquest grup de recerca**. Concretament hi trobem: una biotecnòloga, un metge, un bioquímic, tres biòlogues, una veterinària i una especialista en nutrició humana, dietètica i farmàcia.

És important adonar-se que dins un grup de recerca, és necessària la presència d'experts en diferents àrees i àmbits, per tal de poder complementar-se al màxim i poder extreure els millors resultats possibles del projecte.

Cadascú s'ocupa de la part del projecte més relacionada amb la seva especialitat, fent així més fàcil assolir un resultat satisfactori degut al previ coneixement que ja tenen del sector en el qual treballen.

És doncs de vital importància, la diversitat d'especialistes dins un grup de recerca ja que permet poder portar a terme un projecte més ambiciós i que englobi més àmbits diferents dins seu.

- Per altre banda, dins el projecte principal del RECATAVI, trobem **diversos subprojectes, que segueixen diferents línies d'investigació**. Tots, però, tenen el mateix objectiu final, poder aconseguir regenerar totalment o si més no parcialment el cor després de patir un infart cardíac.

Entre aquests subprojectes trobem els següents:

- o **L'Aida Llucià i la Carolina Soler**, porten a terme un projecte que consisteix en un model "in vivo" amb ratolins.

El què fan, és introduir cèl·lules mare envoltades per una matriu directament al cor dels ratolins, als quals prèviament s'ha provocat un infart cardíac. Utilitzen cèl·lules mare extretes del greix epicàrdic, subcutani i del teixit cardíac auricular.

Les cèl·lules utilitzades han estat prèviament estimulades, tant elèctricament com mecànicament, per tal de fer-les acostumar als estímuls que pateixen els cardiomiòcits al cor. Per tant, l'adaptació al nou entorn els serà menys costosa.

L'Aida, al ser llicenciada en biotecnologia, s'ocupa de la part "ex vivo" del projecte que consisteix en l'estimulació de les cèl·lules mare per tal de que comencin a diferenciar-se a cardiomiòcits.

Per altre banda la Carol, biòloga, s'ocupa de la part "in vivo" del projecte. És coneixedora d'una tècnica que va aprendre als Estats Units que li permet implantar les cèl·lules, juntament amb les matrius que les contenen, sobre la cicatriu produïda per l'infart en el cor dels ratolins.

- **La Cristina Prat i la Carol Gàlvez**, treballen en un altre projecte que rep el nom de "FLAP". La part "in vivo" del projecte es porta a terme amb porcs i consisteix en retallar un fragment del teixit adipós que recobreix l'estèrnum del porc i col·locar-lo sobre l'infart de cor. Fins al moment, s'ha demostrat que aquest procés dona lloc a una millora de la funcionalitat del teixit infartat.

El què pretenen és poder introduir aquest mètode en pacients humans, com a tècnica quirúrgica complementària a altres intervencions.

La Carol, al ser veterinària, és la responsable de la part "in vivo" del projecte. Col·loca el fragment de teixit adipós sobre la zona infartada del cor dels porcs.

Després, la Cristina s'ocupa de l'anàlisi dels resultats obtinguts en els experiments "in vivo".

- **En Josep Maria Pujal i en Santi Roura** en el seu projecte treballen amb cèl·lules mare d'un altre origen: obtingudes del cordó umbilical. El seu objectiu és caracteritzar aquestes cèl·lules, i veure quin és el seu potencial cardiomiogènic per tal de poder-se diferenciar tant a cardiomiòcits com a cèl·lules endotelials (constitueixen els vasos sanguinis). Per fer-ho porten a terme diversos experiments "ex vivo".

A més a més, estan intentant trobar en els teixits extraembrionaris, altres fonts de cèl·lules mare per després caracteritzar-les i augmentar el nombre de poblacions cel·lulars conegudes.

- **La Paloma Gastelurrutia**, participa en un subprojecte anomenat “PLICA”. Consisteix en fer un estudi pilot per tal de comprovar l'estat nutricional d'un grup de persones i veure, si la desnutrició és realment un factor que està relacionat amb que les persones tinguin més risc de patir malalties cardiovasculars.
 - Per últim **la Laura**, està implicada en la coordinació dels assajos clínics de cardiologia. On es proven nous medicaments per tal de veure si realment són eficaços per millorar el nivell de vida i l'estat de les persones que pateixen malalties cardiovasculars.
- Des del seu inici, **aquest grup de recerca ha dut a terme diferents descobriments**. Tot i no ser grans avenços, han contribuït a fer un pas endavant en el camp de la regeneració cardíaca i el tractament de les malalties cardiovasculars.

Un dels descobriments més importants que han assolit fins al moment és la caracterització, per primer cop, d'un nou tipus cel·lular. Aquest, es troba en el teixit adipós epicàrdic (greix que recobreix el cor) i no havia estat caracteritzat anteriorment. A més a més va determinar-se el seu potencial cardiomiogènic. També han aprofundit en la caracterització dels altres tipus cel·lulars i el seu comportament davant de diversos estímuls.

Altres descobriments importants a nivell de cada subprojecte són:

- S'ha comprovat que els estímuls (mecànics i elèctrics) aplicats a les cèl·lules fan que aquestes canviïn, és a dir, que pateixin una certa diferenciació cap a cardiomiòcits. Els estímuls provoquen un efecte positiu a les cèl·lules i fan que estiguin més acostumades i preparades per ser implantades al nou entorn.
- També s'ha confirmat la hipòtesi del projecte “PLICA”, que les persones amb desnutrició tenen més risc de patir malalties cardiovasculars.

I s'ha aconseguit identificar un paràmetre que permet determinar, més ràpidament, les persones que pateixen malalties cardiovasculars o bé que tenen un cert risc de patir-ne.

- En quan a les tècniques de regeneració del teixit infartat s'ha constatat que la més efectiva és la tècnica del "FLAP". No és gens invasiva i provoca una millora notable en la cicatriu de l'infart al cap de poc temps de la seva execució. La tècnica alternativa, consisteix en injectar cèl·lules directament al cor, també provoca una millora però és molt invasiva . Això fa que el seu resultat en global no sigui tant satisfactori.
- Referents al sector d'embriologia, un dels descobriments més importants ha estat la captura d'unes imatges en les quals s'han observat cèl·lules de la mare i del fill convivint juntes, sense que existeixi rebuig entre elles.
Per tant si s'aconsegueix esbrinar el motiu pel qual no es rebutgen, serà un gran avenç en el camp dels transplants d'òrgans ja que es podria saber com evitar el rebuig d'aquests.

- El projecte no té la intenció de revolucionar el camp de la medicina. El què pretén és poder ampliar el coneixement de la comunitat científica a partir de petits descobriments i avenços.

Tot i que de moment no sigui possible trobar una cura total per a aquest tipus de malalties, tenen l'objectiu de millorar la qualitat de vida de les persones que les pateixen. Si el resultat van essent els esperats com fins ara, s'espera un gran avenç en el camí cap a la cura d'aquestes malalties.

- Durant la realització del projecte els han sorgit diverses dificultats que han fet que s'hagi alentit una mica la realització dels projectes. Per tant, per poder avançar han tingut que buscar solucions als diferents problemes que els anaven sorgint.

El principal problema és el finançament, el qual moltes vegades al ser escàs condiciona molts altres aspectes. Moltes vegades no és possible tenir totes les

màquines necessàries per dur a terme un experiment determinat, això fa que s'hagin de buscar alternatives per poder realitzar l'experiment igualment.

Altres vegades, els problemes venen donats per la poca experiència en un tema determinat i el fet de no dominar de forma totalment exhaustiva una tècnica.

Les millors solucions a aquests inconvenients són intentar crear nous projectes el màxim d'atractius i originals possibles. Amb l'objectiu d'aconseguir un bon finançament.

A més a més, és necessari estar molt ben informat i documentat de les tècniques amb les quals treballaràs. Ja sigui amb l'ajuda d'altres experts o bé recorrent a la bibliografia.

La solució més eficaç és el que es coneix com a "prova i error", que els permet poc a poc anar solucionant els inconvenients amb què es troben durant el camí per assolir el seu objectiu.

- **Aquest projecte té finançament fins l'any 2012. Es preveu però, que tindrà una continuació** ja que caldrà investigar més per tal de continuar avançant en aquest camp.

Hi ha oberta la possibilitat que es creï un altre projecte un cop aquest s'acabi, tindrà com a objectiu investigar tot allò que ha pogut quedar penjat o bé poc estudiat en el primer projecte.

És molt important marcar-se sempre objectius petits i que tinguin una certa lògica. S'ha de veure clar que es poden arribar a assolir satisfactòriament. No serveix de res plantejar-se un objectiu molt gran i difícil d'assolir, ja que les probabilitats d'èxit són molt més petites i per tant, és una pèrdua de temps innecessària.

- **El grup de recerca ICREC treballa en col·laboració amb altres grups de recerca ja que d'aquesta manera es complementen i és més fàcil aconseguir l'objectiu comú que tenen.**

Cap d'ells treballa en el mateix sector, això no seria factible degut a la gran competència que existeix en el sector de la investigació en aquest moment.

Així doncs, cada grup s'ocupa d'un aspecte diferent del projecte.

Les principals col·laboracions que tenen en aquest moment són:

Amb l'UPC (Universitat Politècnica de Catalunya), que s'ocupa de la part tecnològica de la investigació (preparació dels mecanismes per a l'estimulació mecànica i elèctrica de les cèl·lules) i l'IQS (Institut químic de Sarrià), el qual s'ocupa de la part química, com serien l'elaboració de matrius a partir de diversos polímers o bé de substàncies biològiques.

També existeixen col·laboracions més petites amb altres entitats ja siguin del mateix país o de la resta d'Europa. Estan en col·laboració amb l'hospital Sant Pau, amb l'ICCC, l'UPVLC, Cardio-Monde association, CREA i Fraunhoferinstitute.

Aquestes col·laboracions fan possible crear projectes més grans i ambiciosos i per tant, el descobriment de coses més noves i que aporten un avenç més gran al projecte en qüestió.

- **Per últim, hem observat que tots els membres del grup creuen que realment estan seguint una bona línia d'investigació.** Fins al moment els resultats preliminars han estat molt satisfactoris i això els anima a seguir endavant. Han dut a terme petites descobertes que fan que ja hagin establert unes bones bases del projecte i que per tant, els animi a seguir endavant.

Tot i això, creuen que encara hi ha molts aspectes que cal anar millorant poc a poc per tal de poder continuar avançant.

El seu, és un grup encara molt petit i creuen que s'haurà d'anar expandint de mica en mica si de veritat volen fer front a les nombroses línies d'investigació que se'ls estan obrint a mesura que avança el projecte.

La seva opinió és que val la pena tirar endavant aquest projecte, ja que actualment cada cop hi ha més persones que pateixen aquest tipus de malalties. Per tant, trobar-hi una solució ajudaria a millorar la qualitat de vida d'una gran quantitat de persones.

10.5.1. ENTREVISTES DEL GRUP DE RECERCA ICREC

Aida LLucià, llicenciada en biotecnologia (UAB) i master en biomedicina (UB).

- **Quan temps fa que vas començar a formar part d'aquest projecte? Què et va portar a implicar-t'hi?**

Estic implicada en aquest projecte des del setembre de l'any 2009, fa dos anys que hi estic treballant.

Vaig implicar-me en aquest projecte perquè mentre realitzava el doctorat, m'exigien que participés en algun projecte. Després de consultar-los tots, aquest va ser el que més em va cridar l'atenció.

- **Quins estudis has dut a terme per arribar a fer recerca?**

Vaig realitzar la carrera de biotecnologia a la Universitat Autònoma de Barcelona i més tard, vaig fer un màster de biomedicina a la UB. Des del principi, ja tenia clar que quan acabés volia dedicar-me a la recerca.

- **En què consisteix la part del projecte en la que tu treballes específicament?**

La meua part del projecte té com a objectiu aconseguir que les cèl·lules del teixit adipós d'origen subcutani o epicàrdic puguin ser condicionades mitjançant estímuls ocasionant que s'assemblin més a les cèl·lules del cor (cardiomiòcits).

Hem observat, que les cèl·lules del cor tenen activitat tant elèctrica com mecànica. És necessari doncs, sotmetre les cèl·lules mare a estímuls elèctrics i mecànics per tal que s'hi vagin adaptant. Quan introduïm les cèl·lules amb la "tirit" sobre l'infart, ja estan més adaptades al nou ambient.

D'aquesta manera, s'aconsegueix una adaptació més ràpida de les cèl·lules.

- **Quins són els avenços i els descobriments assolits fins al moment?**

Alguns dels avenços assolits són encara confidencials, en el món de la recerca el primer que publica un descobriment és el que s'emporta tot el mèrit. Una de les coses que si que et puc dir, és que els estímuls tant mecànics com elèctrics als quals estem sotmetent les cèl·lules fan que comencin a diferenciar-se. Els estímuls, les afecten positivament i les preparen per quan siguin introduïdes al cor.

- **Creus que aquest projecte acabarà tenint algun resultat, que signifiqui un gran en el camp de la medicina?**

Un petit descobriment et pot semblar una tonteria però pot acabar sent un gran avenç. Si els resultats són els que esperem i són positius, si que acabarà sent un avenç ja que podria ser una possible solució a les malalties cardiovasculars.

- **Amb quines dificultats, principalment de caire tècnic, us trobeu a l'hora d'assolir el vostre objectiu i de poder dur a terme tots els experiments de la recerca? Quines són les principals estratègies que són aconsellables de seguir per superar les dificultats?**

El principal problema és que els experiment depenen de molts factors i mai no surt tot quadrat. També pot haver-hi algun error durant l'anàlisi dels resultats, no té perquè ser en la part del procediment.

Nosaltres treballem amb màquines i les màquines fallen moltíssim. A més a més, les cèl·lules no creixen sempre al ritme que un vol i t'alenteixen els experiments.

De solucions n'hi ha poques, la millor és tenir paciència. Si és algun error que fas tu ho pots canviar però moltes coses no hi pots fer res.

El que jo faig és actuar amb previsió i paciència. Si una cosa ja t'ha sortit malament diverses vegades, a la següent prens precaucions per tal de que no et torni a passar el mateix.

- **Quan temps preveus que queda per tal d'arribar al punt final d'aquest projecte?**

Aquest projecte té finançament fins l'any 2012 però sempre es pot allargar. Al 2012 però, tots els objectius que es van marcar en presentar el projecte han d'estar complerts. És possible que, si quan el projecte s'acaba, es veu que pot tenir continuïtat, es creï un altre projecte que segueixi la mateixa línia d'investigació.

El què fas quan presentes un projecte és descriure tot el que faràs cada any d'una manera molt concreta. Després, s'ha de fer un seguiment cada any o any i mig, entregant memòries que expliquen tot el què s'ha dut a terme durant un període de temps determinat.

- **Treballeu (de forma coordinada o conjunta) amb l'ajuda d'altres centres que estan investigant el mateix que vosaltres? Quin tipus d'investigacions fan aquests altres centres són molt semblants a la vostra?**

Sí, però no portem a terme les mateixes investigacions, ens complementem per tal de poder assolir un objectiu comú. És normal que no col·laboris amb grups d'investigació que estan investigant el mateix que tu, degut a la forta competència que existeix entre els diferents grups de recerca.

Treballeu en col·laboració amb la UPC i l'IQS. L'UPC, Universitat Politècnica de Catalunya s'ocupa de les investigacions tecnològiques del projecte. Ens proporciona els aparells necessaris per tal de poder estimular les cèl·lules. I l'IQS, Institut Químic de Sarrià, s'ocupa de les investigacions de l'àmbit químic com serien la creació de l'hidrogel i de les matrius en les quals introduïrem les cèl·lules per crear la "tirit" que s'aplicarà a l'infart.

- **Creus que de moment esteu seguint una bona línia d'investigació o creus que hauríeu d'investigar seguint algun altre camí diferent?**

Crec que anem per bon camí. Només es qüestió de provar coses noves, variant una mica el procediment. Això sí, sempre coses que vegis que des del principi tenen un cert sentit.

Si veus que els resultats preliminars són satisfactoris, com passa en el nostre cas, endavant amb la continuació del projecte.

Paloma Gastelurrutia, va estudiar nutrició humana, dietètica i farmàcia.

- **Quan temps fa que vas començar a formar part d'aquest projecte? Què et va portar a implicar-t'hi?**

L'any 2007 vaig començar la primera part del projecte amb la qual vam obrir una nova línia d'investigació.

- **Quins estudis has dut a terme per arribar a fer recerca?**

Vaig estudiar nutrició humana, dietètica i farmàcia. Després em vaig treure un màster i vaig entrar en la investigació. Va ser llavors quan vaig realitzar la tesis doctoral.

- **En què consisteix la part del projecte en la que tu treballes específicament?**

Treballo en diversos projectes, però el més important és el que duu el nom de "PLICA". Consisteix en un estudi pilot de l'estat nutricional dels pacients. L'objectiu és veure si el factor que les persones estiguin desnodrides té alguna cosa a veure amb el fet de patir insuficiència cardíaca.

Dins d'aquest projecte, estem buscant marcadors que ens serveixin per poder detectar a temps aquesta desnutrició i per tant, la insuficiència cardíaca.

Pretenem confirmar aquests resultats ja obtinguts en una població més gran i amb característiques més àmplies.

Jo, m'ocupo de fer les mesures, seleccionar els pacients i fer les bases de dades. Un cop les tinc fetes, n'extrec conclusions juntament amb el metges.

- **Quins són els avenços i els descobriments assolits fins al moment?**

Fins ara, s'ha confirmat la hipòtesi de que les persones desnodrides tenen més risc de patir malalties cardiovasculars i morir per culpa d'aquestes.

També hem identificat un paràmetre de desnutrició que permet identificar ràpidament els pacients que es troben en pitjors condicions.

- **Creus que aquest projecte acabarà tenint algun resultat, que signifiqui un avenç en el camp de la medicina?**

Si al final s'acaba confirmant la hipòtesi en l'estudi a més gran escala hi haurà algun canvi a nivell de clínica ja que aquest paràmetre s'incorporarà en les avaluacions nutricionals.

- **Amb quines dificultats, principalment de caire tècnic, us trobeu a l'hora d'assolir el vostre objectiu i de poder dur a terme tots els experiments de la recerca? Quines són les principals estratègies que són aconsellables de seguir per superar les dificultats?**

En el meu projecte ens trobem amb poques dificultats ja que és molt pràctic i utilitzem tècniques molt senzilles.

- **Quan temps preveus que queda per tal d'arribar al punt final d'aquest projecte?**

Com a mínim falten dos anys que són els que es necessiten per tal de fer un seguiment dels pacients i per poder avaluar el pronòstic del nou estudi.

- **Treballeu (de forma coordinada o conjunta) amb l'ajuda d'altres centres que estan investigant el mateix que vosaltres? Quin tipus d'investigacions fan aquests altres centres són molt semblants a la vostra?**

De moment no, però sabem que hi ha un altre centre que fa un estudi semblant i estem en contacte amb ells.

- **Creus que de moment esteu seguint una bona línia d'investigació o creus que hauríeu d'investigar seguint algun altre camí diferent?**

Sí, crec que de moment estem anant per bon camí.

Carolina Soler, doctora i llicenciada en biologia.

- **Quan temps fa que vas començar a estar en aquest projecte? Què et va portar a implicar-t'hi?**

Des de l'any 2007 que formo part d'aquest projecte. M'hi vaig implicar perquè abans havia estat als Estats Units aprenent la tècnica necessària per tal de tractar l'infart de miocardi en ratolins. Al incorporar-me en aquest projecte combinàvem dues eines que varem creure que podien tenir molt bon resultat i de moment així ha estat.

- **Quins estudis has dut a terme per arribar a fer recerca?**

Vaig treure'm la carrera de biòloga i més tard, vaig fer la tesis doctoral.

- **En què consisteix la part del projecte en la que tu treballes específicament?**

Treball en la part del projecte que es porta a terme "in vivo". És a dir, amb ratolins. El que faig, és intentar regenerar la cicatriu del cor del ratolins que queda després que hagin patit un infart de miocardi. El mètode utilitzat és la implantació d'una mena de "tirites" sobre la zona afectada del cor dels ratolins.

Porto a terme diferents projectes en els quals només varien el tipus de cèl·lules mare, segons el seu origen, que s'utilitzen. Constitueixen diferents aproximacions a un mateix projecte.

De moment, treballem amb cèl·lules que no han estat estimulades prèviament, però tenim la intenció de més endavant poder implantar cèl·lules ja estimulades i que per tant, en un principi s'han d'adaptar més fàcilment al funcionament del cor.

- **Quins són els avenços i els descobriments que heu aconseguit fins ara?**

Hem descobert que injectant cèl·lules mare procedents del greix hi ha una certa regeneració del teixit infartat. Tot i el benefici que aporta, es tracta d'una tècnica molt agressiva ja que consisteix en punxar el miocardi i de moment no és molt viable.

Com a solució, estem intentant trobar un medi adient per tal de poder submergir-hi les cèl·lules i després, poder-les introduir més fàcilment sobre la zona afectada a mode d'una espècie de "tirita" (tècnica ja no tant agressiva).

- **Creus que aquest projecte acabarà tenint algun resultat, que signifiqui un avenç en el camp de la medicina?**

Si, aquesta és la intenció i tenim esperances de que així sigui.

- **Amb quines dificultats, principalment de caire tècnic, us trobeu a l'hora d'assolir el vostre objectiu i de poder dur a terme tots els experiments de**

la recerca? Quines són les principals estratègies que són aconsellables de seguir per superar les dificultats?

Un dels problemes que tenim és que les membranes on col·loquem les cèl·lules, són molt hidrofòbiques i per tant, el procés es complica una mica.

A vegades les membranes són massa gruixudes, i això és un problema al haver-les d'introduir per exemple, dins un cor molt petit com seria el d'un ratolí.

Com a possibles solucions, el més important és consultar molta bibliografia per tal d'estar perfectament informat de tot. També és necessari fer saber les teves necessitats a l'altre gent que està col·laborant amb tu i així facilitar més el procediment.

I per últim, molt important també, la prova i error que t'ajuda de mica en mica a anar buscant estratègies per solucionar els diferents problemes.

- **Quan temps preveus que queda per tal d'arribar al punt final d'aquest projecte?**

És difícil de preveure quan temps queda per arribar al final d'aquest projecte, tot i que tots els projectes tenen un punt final que ve marcat pel seu finançament.

- **Treballeu (de forma coordinada o conjunta) amb l'ajuda d'altres centres que estan investigant el mateix que vosaltres? Quin tipus d'investigacions fan aquests altres centres són molt semblants a la vostra?**

Sí, tenim diversos centres en col·laboració amb nosaltres. Les col·laboracions més importants són:

Sant Pau, que ens proporciona els "parxes" de fibrina.

L'ICCC, que és un centre químic.

l'IQS (institut químic de sarrià).

Fraunhoferinstitutue, fa el mateix que nosaltres però no treballa amb mostres de pacients humans.

UPVLC, que també és un centre químic.

Cardio-Monde Association (París), fa experiments amb ovelles.

CREA, és una empresa que s'encarrega dels temes de patents i comerç.

Cadascú fa la seva part, i ajudant-nos entre tots facilita que puguem arribar a assolir el nostre objectiu comú.

- **Creus que de moment esteu seguint una bona línia d'investigació o creus que hauríeu d'investigar seguint algun altre camí diferent?**

Sí que estem seguint un bon camí. Crec que tot això té molt futur ja que les malalties cardiovasculars ocupen un àmbit molt important dins la medicina degut a l'elevada incidència que tenen en aquest moment.

Però és necessari millorar molts aspectes. Per exemple, aconseguir que les cèl·lules migrin cap a la cicatriu afegint factors de migració que actualment encara no s'han descobert.

Josep-Maria Pujal, doctor i llicenciat en medicina.

- **Quan temps fa que vas començar a formar part d'aquest projecte? Què et va portar a implicar-t'hi?**

Fa un any, concretament des de l'Abril. Em va atraure molt aquest projecte i m'hi vaig implicar perquè realment m'agradava el què feien, ho trobava molt interessant.

- **Quins estudis has dut a terme per arribar a fer recerca?**

Vaig fer la carrera de medicina i després el doctorat.

- **En què consisteix la part del projecte en la que tu treballes específicament?**

La meua part del projecte consisteix en cultivar les cèl·lules del cordó umbilical, caracteritzar-les i mirar si realment tenen potencial cardiomiogènic. És a dir, si les cèl·lules són capaces de diferenciar-se cap a cèl·lules del cor per poder reparar-lo després d'un infart.

Un cop ho haguem descobert, estudiarem si hi ha altres fonts d'obtenció de cèl·lules dins dels teixits extraembrionaris (placenta), les extraurem i en caracteritzarem el seu potencial cardiomiogènic.

- **Quins són els avenços i els descobriments assolits fins al moment?**

D'avenços n'hi ha cada dia, sempre apareixen tècniques i maneres noves de fer les coses.

Una dels descobriments més importants en embriologies és l'excussió de fotos noves, no vistes abans, de cèl·lules de la mare i el fill convivint juntes. No es rebutgen tot i ser d'individus diferents, aquest fet podria representar un gran avenç si s'arribés a descobrir perquè no hi ha rebutg. Podríem solucionar tots els problemes que comporten els transplants d'òrgans.

El nostre proper objectiu, és veure si les cèl·lules embrionàries són igual de rebutjades que els altres tipus de cèl·lules i, quin potencial tenen per a la regeneració cardíaca.

- **Creus que aquest projecte acabarà tenint algun resultat, que signifiqui un avenç en el camp de la medicina?**

Espero que sí, però tampoc canviarà molt les coses. No busquem un canvi radical sinó poc a poc, fer coses per tal d'ampliar el coneixement de la comunitat científica. Treballant en el mateix camp que altres investigadors i mitjançant petits descobriments pots aprendre moltes coses.

- **Amb quines dificultats, principalment de caire tècnic, us trobeu a l'hora d'assolir el vostre objectiu i de poder dur a terme tots els experiments de la recerca? Quines són les principals estratègies que són aconsellables de seguir per superar les dificultats?**

Sovint les dificultats són bàsicament econòmiques, no tens màquines per fer el què realment voldries. Si no hi haguessin aquestes limitacions, només estaries restringit per la teva imaginació.

A vegades, el problema és que no domines la tècnica que necessites per dur a terme un experiment. La solució, és dedicació i pràctica, i tard o d'hora l'acabes aprenent. És molt important informar-te del funcionament de les coses i saber-ho tot sobre com has de dur a terme el procediment. La millor solució és la documentació sobre el tema en concret.

- **Quan temps preveus que queda per tal d'arribar al punt final d'aquest projecte?**

És molt difícil posar-hi un punt final. Hi ha petits objectius, alguns que ja s'han assolit i altres que es van assolint de mica en mica.

No surt a compte plantejar-te un objectiu molt gran que sigui difícil d'aconseguir, sinó que has d'anar buscant diferents estratègies i fent proves per tal d'anar resolent petits objectius. A més a més, cal estar sempre molt segur de les coses que estàs fent, totes han de tenir un sentit.

Bàsicament, el període dels projectes depèn de quan s'acaba el finançament, quan més diners et donen més anys pot durar el projecte.

- **Treballeu (de forma coordinada o conjunta) amb l'ajuda d'altres centres que estan investigant el mateix que vosaltres? Quin tipus d'investigacions fan aquests altres centres són molt semblants a la vostra?**

En el meu cas, actualment no tinc cap col·laboració gran dins el projecte principal.

On hi ha sobretot col·laboracions és a l'hora de publicar articles, si algun centre o persona t'ha ajudat a l'hora d'arribar a la conclusió del teu article normalment l'acostumes a citar quan el publiques. Això, és una cosa que va molt buscada, que el teu nom aparegui en un article científic augmenta el teu prestigi com a investigador.

- **Creus que de moment esteu seguint una bona línia d'investigació o creus que hauríeu d'investigar seguint algun altre camí diferent?**

Espero que sí, el fet d'estar amb un grup et restringeix a vegades ja que és necessari que tots estiguem d'acord en les coses, però t'aporta moltes més avantatges que inconvenients. Pots compartir i aplicar coneixements conjunts.

Santi Roura, carrera i doctorat en bioquímica.

- **Quan temps fa que vas començar a formar part d'aquest projecte? Què et va portar a implicar-t'hi?**

Vaig començar a estar en aquest projecte l'any 2002. El què em va atreure va ser poder treballar amb cèl·lules mare, que en aquell moment era un "boom" ja que es creia que podrien curar qualsevol malaltia.

Actualment, les expectatives han baixat i es creu que no tindran tants beneficis com es creia si més no a tant curt termini.

- **Quins estudis has dut a terme per arribar a fer recerca?**

Vaig fer la carrera de bioquímica i també sóc doctor en bioquímica. Després, vaig treballar un any en el camp de la farmacèutica però no em va acabar de convèncer i vaig començar en el grup de recerca ICREC.

- **En què consisteix la part del projecte en la que tu treballes específicament?**

La meua part del projecte consisteix en provar diferents mecanismes de diferenciació per aconseguir que les cèl·lules mare del cordó umbilical es diferenciïn cap a cardiomiòcits i, cap a cèl·lules endotelials que són les que formaran els vasos. Tots dos grups cel·lulars són necessaris per regenerar el cor en cas de que hagi patit un infart de miocardi.

Una altre de les línies on estic implicat, és en l'estudi de les alteracions que afecten als malalts de cardiopatia dilatada, una malaltia molt freqüent entre la població. El cor d'aquestes persones, va perdent progressivament la seva funció i al final l'única solució és el transplantament.

Per aquest motiu, estem investigant la teràpia regenerativa amb cèl·lules mare com a possible via de regeneració del cor.

- **Quins són els avenços i els descobriments assolits fins al moment?**

Alguns dels avenços que hem aconseguit, és conèixer amb molt més detall com es comporten les cèl·lules mare i les hem caracteritzat més bé. També hem posat a punt models de ratolí i de porc, per tal de poder dur a terme els experiments "in vivo" amb cèl·lules mare cardíques.

Una de les troballes més grans, va ser el descobriment de les cèl·lules de greix epicàrdic. Ningú n'havia parlat abans i vam ser els primers en caracteritzar-les.

- **Creus que aquest projecte acabarà tenint algun resultat, que signifiqui un avenç en el camp de la medicina?**

Perseguiu això, i crec que sí que ho aconseguirem però es difícil parlar de períodes de temps. Pot ser que no aconseguim una cura completa, però si

que aconseguirem una millora notable de la qualitat de vida de les persones que pateixen malalties cardiovasculars.

A més a més, després de fer tots els experiments es descartaran molts grups cel·lulars i ens quedarem amb els més adients. Un cop les tinguem, s'hauran d'entrenar per tal que siguin més eficaces a l'hora de regenerar el cor.

- **Amb quines dificultats, principalment de caire tècnic, us trobeu a l'hora d'assolir el vostre objectiu i de poder dur a terme tots els experiments de la recerca? Quines són les principals estratègies que són aconsellables de seguir per superar les dificultats?**

El principal problema amb el que ens trobem, és no disposar de tots els aparells necessaris. Indirectament, tot acaba amb el finançament, el qual et limita la resta de coses.

La solució, és pensar idees originals i escriure projectes atractius per així superar la forta competència i aconseguir el màxim finançament possible. No serveix de res presentar projectes que altres grups també puguin fer, han de ser al màxim d'atractius possible.

- **Quan temps preveus que queda per tal d'arribar al punt final d'aquest projecte?**

És molt difícil de dir, ja que hi intervé l'esforç de tota la comunitat científica. Tots sumem a l'hora d'aportar dades .

Però els projectes sí que tenen una durada, normalment de 3 a 4 anys. Després, presentes una memòria final i, la majoria de vegades, si el projecte ha aconseguit bons resultats acostuma a tenir continuacions.

- **Treballeu (de forma coordinada o conjunta) amb l'ajuda d'altres centres que estan investigant el mateix que vosaltres? Quin tipus d'investigacions fan aquests altres centres són molt semblants a la vostre?**

Sí, treballem amb l'ajuda d'enginyers electrònics (UPC) que es fan càrrec de l'estimulació elèctrica i mecànica de les cèl·lules i també amb l'IQS que es cuida de subministrar-nos les matrius i els polímers.

Materials necessaris per col·locar les cèl·lules sobre el teixit infartat, les protegeixen ja que sinó acabarien morint. A més a més, han d'estar entrenades tant mecànicament com elèctricament, perquè estiguin més acostumades al funcionament real del cor.

Tenim altres col·laboracions més petites degut a que estem ficats en projectes europeus com és el RECATAVI. Col·laborem també amb grups alemanys i francesos.

No estem tancats, sinó que estem totalment oberts a l'aportació de noves dades ja que sols, és impossible que arribem a assolir el nostre objectiu.

- **Creus que de moment esteu seguint una bona línia d'investigació o creus que hauríeu d'investigar seguint algun altre camí diferent?**

Segurament sí. Amb el temps que portem ja hem avançat i descobert petites coses.

Crec que la línia que estem seguint és bastant lògica i raonable, no anem saltant sinó que seguim un camí lògic i sobretot tenim clar quin és el nostre objectiu final i on volem arribar. Coses a millorar sempre n'hi ha i moltes, mai et pots conformar.

Cristina Prat, llicenciada i doctora en biologia. Té un màster en biologia experiencial.

- **Quan temps fa que vas començar a formar part d'aquest projecte? Què et va portar a implicar-t'hi?**

Des de l'any 2005 que formo part d'aquest grup. Abans ja col·laborava amb ells degut a que on estava volíem recollir mostres de teixit cardíac i per aquest

motiu ja estàvem en contacte. Ja coneixia el grup i sabia quin projecte volien engegar i el vaig trobar realment interessant.

A més a més, el tema de la meva tesi era sobre uns receptors d'adenosina estudiats a nivell de sistema cardiovascular. Per tant, ja coneixia diverses coses sobre aquest tema i em va interessar continuar en aquesta branca.

- **Quins estudis has dut a terme per arribar a fer recerca?**

Sóc llicenciada en biologia i després em vaig treure també el màster en biologia experiencial. Més tard vaig fer la tesis doctoral i per tant, sóc doctora en biologia.

- **En què consisteix la part del projecte en la que tu treballes específicament?**

Formo part de dos projectes de manera bastant activa:

El primer de tots està finançat per la marató de TV3, es tracta d'un estudi de les matrius biològiques per veure quina és la més adient per poder posar-hi les cèl·lules mare i aplicar-ho tot sobre l'infart.

Aquest projecte el fem amb porquets, i ens obliga a anar a Càceres ja que allà és on tenim tots els porcs i tota la maquinària necessària.

Un avantatge, és que podem fer el seguiment de tot el procés de regeneració del cor infartat des de Barcelona ja que hem monitoritzat als porcs.

De moment, hem observat que si que hi ha una certa millora però no sabem si aconseguirem regenerar el cor per complet.

Fins ara hem fet només els animals control, els hem introduït la matriu sense cèl·lules. D'aquí poc començarem la segona part del projecte, que consisteix en aplicar a un grup d'animals cèl·lules mare a l'interior de matrius, ja sigui biològiques o sintètiques.

El segon projecte també es fa amb porquets i és un nou mètode quirúrgic com a teràpia per aplicar a pacients que hagin patit un infart de miocardi. Aquest nou mètode rep el nom de "FLAP".

El què fem és retallar teixit adipós del cor i canviar-lo de lloc per tal de posar-lo amb contacte amb el teixit infartat. Aproximadament un mes després, el porc millora funcionalment, realment hi ha un benefici funcional en la zona on s'ha aplicat el mètode. Aquest procés per tant, té molt bones perspectives a nivell clínic ja que podria ser una tècnica quirúrgica complementària per les persones que patissin aquest tipus de malalties. Quan operessin als pacients per algun altre motiu cardíac aprofitarien i transposarien el greix i l'enganxarien amb cola quirúrgica sobre la zona infartada.

El resultat que hem obtingut és que la cicatriu no té tanta densitat i hi ha menys presència de col·lagen.

Jo d'aquests dos projectes porto a terme la part més d'anàlisi "in vitro" dels resultats, és a dir, la part més de laboratori.

- **Quins són els avenços i els descobriments assolits fins al moment?**

N'hi ha dos que són els més importants que hem fet:

En primer lloc hem fet la descripció d'un nou grup de cèl·lules mare que són les que reben el nom de cardiacATDPCs. És un llinatge que varem descobrir i patentar nosaltres ja que varem veure que tenien potencial per regenerar el cor. L'article en el qual les descrivíem i l'explicàvem el seu descobriment va ser publicat a: *Journal of molecular and cell cardiology*.

En segon lloc, un descobriment molt important va ser el mètode quirúrgic que rep el nom de "FLAP". Procés que ja he explicat en la pregunta anterior.

- **Creus que aquest projecte acabarà tenint algun resultat, que signifiqui un avenç en el camp de la medicina?**

En el cas del projecte de la marató, ens pot acabar donant una idea de si els materials de suport de les cèl·lules realment funciona a l'hora de buscar una millora en el teixit infartat. A més a més, aquest projecte és molt ambiciós i combina moltes coses per tant, podríem aconseguir descobrir alguna cosa que també ens servís d'ajuda per avançar en algun altre aspecte.

En quan al projecte del "FLAP", s'espera que es pugui ensenyar la tècnica als cirurgians i per tan poder acabar aplicant la tècnica a la clínica.

De moment, el què sabem és que aquesta tècnica no és invasiva sinó que és del tot segura per als pacients. La intenció és aplicar-la com a teràpia addicional a altres operacions de problemes cardiovasculars.

Actualment s'està portant a terme l'estudi clínic per tal de veure si funciona igual amb els humans que en porcs.

- **Amb quines dificultats, principalment de caire tècnic, us trobeu a l'hora d'assolir el vostre objectiu i de poder dur a terme tots els experiments de la recerca? Quines són les principals estratègies que són aconsellables de seguir per superar les dificultats?**

Al ser el primer cop que combinem sistemes electrònics, sistemes biològics (ésser viu) i el teixit artificial que conté les cèl·lules progenitores, ens hem trobat amb una sèrie de problemes a nivell d'higiene i manteniment.

El principal, ha estat el fet que és molt difícil de garantir que tot el material estigui esterilitzat i en bon funcionament. Degut a que alguns elements electrònics són impossibles d'esterilitzar ja que sinó es farien malbé.

Hi ha hagut infeccions, produïdes per els aparells electrònics que hem introduït a l'interior del cos de l'animal per tal de poder-ne fer el seguiment a distància.

Poc a poc hem d'anar buscant solucions i fent millores per tal d'aconseguir que el segon grup d'animals surti el millor possible.

- **Quan temps preveus que queda per tal d'arribar al punt final d'aquest projecte?**

El projecte de la Marató té data final a finals d'any i va començar l'any 2008. Després hi ha la feina d'analitzar totes les mostres i els resultats que pot durar entre 7 i 8 mesos.

En quan al projecte del "FLAP", actualment la Carol ha acabat la primera fase i ara començarem la segona, que és l'aplicació d'aquesta teràpia en humans. No sabem quant temps tardarà en engegar-se però el seguiment dels pacients ha de ser de com a mínim 5 anys.

- **Treballeu (de forma coordinada o conjunta) amb l'ajuda d'altres centres que estan investigant el mateix que vosaltres? Quin tipus d'investigacions fan aquests altres centres són molt semblants a la vostra?**

En el projecte de la marató treballem coordinadament amb el grup del Doctor Carlos Semino de l'IQS, que es dediquen a l'enginyeria tissular i per tant, a la fabricació de matrius. A més a més, també treballem amb el grup del Doctor Ramón Bravós de l'UPC, que es fan càrrec de la part electrònica del projecte.

Gràcies a les col·laboracions podem dur a terme projectes més ambiciosos, entre tots ens complementem. Recorrem a gent que té més experiència en un determinat tema i combinem les diferents tècniques que cada un utilitza.

- **Creus que de moment esteu seguint una bona línia d'investigació o creus que hauríeu d'investigar seguint algun altre camí diferent?**

Sí, hem sentat bones bases, tot i que ens costa perquè som un grup petit i no massa antic però hem aconseguit petites fites molt prometedores. Si anem millorant en recursos, tècniques i finançament les coses milloraran encara més.

En el futur, haurem de tenir més línies de recerca o bé encara més especialitzades que ara i haurem de treballar amb gent més especialitzada, encarregada d'una cosa en concret.

Se'ns obren moltes noves possibilitats, per això necessitem ampliar el grup. El camí és llarg i costós però de mica en mica anem aconseguint el nostre objectiu.

Carolina Galvez Monton, veterinària.

- **Quan temps fa que vas començar a formar part d'aquest projecte? Què et va portar a implicar-t'hi?**

Des que vaig començar aquest projecte han passat 6 anys. El motiu pel que em dediqui a la recerca cardiovascular principalment és perquè el meu pare va morir a conseqüència d'un infart de miocardi. Tot i així, m'hi dedico perquè la recerca és la part de la sanitat que més m'agrada i crec que és la base per a que es puguin salvar més vides.

- **Quins estudis has dut a terme per arribar a fer recerca?**

Vaig estudiar Veterinària i després he fet diversos màsters i cursos per a formar-me com a investigadora.

- **En què consisteix la part del projecte en la que tu treballes específicament?**

El projecte en el qual estic treballant es realitza en porcs i la meva tasca resideix en crear un model d'infart de miocardi, aplicar la nova tècnica quirúrgica (implantar el pegat de greix) i posteriorment analitzar les mostres per obtenir els resultats de l'estudi.

- **Quins són els avenços i els descobriments assolits fins al moment?**

Fins ara, hem pogut demostrar que la nova cirurgia fa que es creïn nous vasos des del pegat fins al miocardi aportant sang a la zona infartada. També hem pogut comprovar que amb això hi ha menys mort cel·lular i es recupera parcialment la funció cardíaca.

- **Creus que aquest projecte acabarà tenint algun resultat, que signifiqui un avenç en el camp de la medicina?**

Aquesta és la meva esperança. Per aconseguir-ho, en un futur no molt llunyà es podrà començar a aplicar aquesta nova tècnica a persones que hagin patit un infart de miocardi per veure si es pot millorar la seva qualitat de vida.

- **Amb quines dificultats, principalment de caire tècnic, us trobeu a l'hora d'assolir el vostre objectiu i de poder dur a terme tots els experiments de la recerca? Quines són les principals estratègies que són aconsellables de seguir per superar les dificultats?**

De vegades, voldríem aplicar noves tècniques que no estan a l'abast per qüestions econòmiques. Davant d'aquests inconvenients el millor és utilitzar el propi ingeni i substituir-les per d'altres que ens puguin donar uns resultats molt similars i que no impliquin despeses molt grans.

- **Quan temps preveus que queda per tal d'arribar al punt final d'aquest projecte?**

Aquest projecte ja està gairebé finalitzat tot i que fa relativament poc s'ha engegat un de nou que, en certa manera, és una continuïtat de l'anterior.

- **Treballeu (de forma coordinada o conjunta) amb l'ajuda d'altres centres que estan investigant el mateix que vosaltres? Quin tipus d'investigacions fan aquests altres centres són molt semblants a la vostra?**

Hi ha projectes que són exclusius del nostre grup on hi estan implicats varis investigadors interns. Hi ha d'altres que es tracten de projectes coordinats on hi estan adscrits diferents grups de recerca on cada grup té les seves tasques assignades depenent del seu camp d'exercici. En el nostre cas, els projectes coordinats estan fent-se amb grups diferents al nostres. Hi ha un grup d'enginyers electrònics i n'hi ha un altre on predominen els químics. Evidentment, les seves tasques no tenen res a veure amb les nostres però són complementàries per a poder tirar endavant els projectes.

- **Creus que de moment esteu seguint una bona línia d'investigació o creus que hauríeu d'investigar seguint algun altre camí diferent?**

No, el nostre grup està ben definit i cada membre segueix una línia molt concreta. Alhora totes aquestes línies tenen un denominador comú, millorar els tractaments actuals de l'infart de miocardi i la insuficiència cardíaca.

Laura Astier, llicenciada en biologia (UPF).

La meva feina està basada més aviat en la coordinació dels projectes de recerca que porten a terme els meus companys.

En primer lloc, per a fer investigació es necessiten recursos econòmics que s'aconsegueixen demanant beques per a finançar projectes tan públics com privats. A més a més, s'han de fer informes dels projectes que estan en marxa explicant els objectius assolits, els diners gastats, les revistes publicades, els congressos als

quals s'ha assistit. És necessari explicar tot això a la gent que t'ha subministrat els diners per tal de que estiguin al corrent de en què els inverteixes.

Per altre banda, m'encarrego de la coordinació dels assaigs clínics de cardiologia. Són assajos clínics en els quals provem medicaments per a pacients amb alguna patologia cardíaca, per fer-ho estem en col·laboració amb la indústria farmacèutica. Per tal de fer un assaig clínic hi ha unes normes que s'han de seguir: cal buscar pacients per tal de que estiguin disposats a provar l'eficàcia del medicament, cal controlar la medicació i recollir les dades generades en les diferents analítiques o proves.

Una de les meves feines en aquest aspecte també és donar suport als metges i infermeres que duen a terme aquest assaig i supervisar que tot sigui correcte.

En aquests moment, tenim quatre estudis entre mans i tots segueixen el mateix esquema bàsic: primer de tot cal fer l'experimentació "in vitro", després passem al model "in vivo" amb animals i per últim ho provem amb pacients sans. Així, comprovem si el medicament és tòxic o no. Si els resultat és bo i el producte no és tòxic podem començar a aplicar el medicament a persones malaltes per veure'n el seu efecte.

11.3. Glossari

ARRÍTMIES: Activitat elèctrica anormal en el cor, per alteracions de la freqüència i el ritme.

CARDIOMIOPATIA: Malaltia de la musculatura del cor de causa, habitualment no vascular. Redueix la seva capacitat de bombejar la sang a resta del organisme.

CARDIOMIOPATIA: Malaltia de la musculatura del cor de causa, habitualment no vascular. Redueix la seva capacitat de bombejar la sang a resta del organisme.

COLESTEROL: Substància cerosa, de tipus greixosa, present a totes les parts del cos. El qual necessita una determinada quantitat de colesterol per funcionar adequadament. Però l'excés de colesterol a la sang pot adherir-se a les parets arterials. Això s'anomena placa. Les plaques poden estrènyer les artèries o fins i tot obstruir-lo.

COL.LAGENASA: Enzím que catalitza la hidròlisi del col·lagen (proteïna estructural que forma part del teixit connectiu, ossos, pell, etc. subjectant les cèl·lules).

DIABETIS: Elevació del nivell de sucre a la sang, sigui per falta de producció d'insulina o per resistència a la seva acció, cosa que comporta diferents conseqüències per a l'organisme.

DIABETIS MELLITUS: Conjunt de trastorns metabòlics, que afecten a diferents òrgans i teixits, dura tota la vida i es caracteritza per un augment dels nivells de glucosa a la sang: hiperglucèmia.

ECOGRAFIA ABDOMINAL: Procediment imagenològic utilitzat per examinar els òrgans interns de l'abdomen, incloent el fetge, la vesícula biliar, la melsa, el pàncrees i els ronyons.

EDEMA PULMONAR: Acumulació anormal de líquid en els pulmons, especialment als espais entre els capil·lars sanguinis i l'alvèol, provoca inflamació.

ÈMBOL: Té lloc quan un objecte estrany és capaç de viatjar pel torrent sanguini, d'una part del cos a una altra, provocant l'oclusió o bloqueig d'un vas sanguini de menor diàmetre al de l'èmbol.

ERITRÒCITS O GLÒBULS VERMELLS: Cèl·lules més comunes a la sang, són el principal mitjà d'aportació d'oxigen als teixits corporals dels vertebrats. També interfereixen en la digestió i en l'absorció dels lípids a l'intestí.

GRANULÒCIT: Tipus de cèl·lula de la sang, més concretament un tipus de leucòcit (glòbul blanc). Es caracteritza per contenir grànuls en el citoplasma i un nucli cel·lular irregular o segmentat.

HEMITÒRAX: Terme mèdic per a designar cada un dels costats del tòrax.

HIPERTENSIÓ ARTERIAL: Malaltia crònica caracteritzada per un increment continuat de les xifres de pressió sanguínia en les arteries.

MENOPAUSA: Desaparició de les ovulacions en la dona.

MONÒCIT: Una varietat de leucòcit, de vida molt curta en el torrent sanguini (8 hores) i moderadament llarga en els teixits (de mesos a 2 anys). Es generen en la medul·la òssia i després viatgen per la sang, per emigrar a diferents teixits com: el fetge, la melsa, els pulmons, els gangli limfàtics, els ossos, les cavitats seroses.

PARÀLISI: Pèrdua de la mobilitat d'un múscul o d'un grup de músculs, produïda generalment per una lesió o alteració patològica del còrtex cerebral motor.

PERICARDI: Membrana serosa que envolta el cor i l'arrel dels grans vasos sanguinis.

TEIXIT ADIPÓS: Teixit format per l'associació de cèl·lules que acumulen lípids en el seu citoplasma: els adipòcits. Fa funcions mecàniques: una d'elles és servir com amortidor, protegint i mantenint en el seu lloc els òrgans interns així com a altres

estructures més externes del cos, també té funcions metabòliques, és l'encarregat d'emmagatzemar greixos en l'organisme.

TEIXIT CONNECTIU: Teixit més abundant i més amplament distribuït de l'organisme. Està constituït per: les fibres extracel·lulars (responsables de la força i resistència) i les cèl·lules, que estan immerses en una substància fonamental. En contrast amb els epitelis, els teixits conjuntius no es troben sobre superfícies lliures i, en general, estan molt vascularitzats.

TEIXIT MUSCULAR ESTRIAT: N'hi ha de dos tipus, el múscul cardíac i el múscul esquelètic. El múscul estriat es contreu i es relaxa en ràfegues curtes i intenses. El múscul cardíac és un múscul estriat involuntari que només es troba en el cor, té una estructura semblant a la dels músculs esquelètics i el seu moviment involuntari és automàtic perquè té un sistema de *marcapassos* que provoca la seva contracció rítmica.

VAS SANGUINI ENCEFÀLIC: Part del sistema circulatori que té la funció de transportar la sang cap a l'encèfal (zona del sistema nerviós constituïda per el cervell, el cerebel i el bulb raquidi).

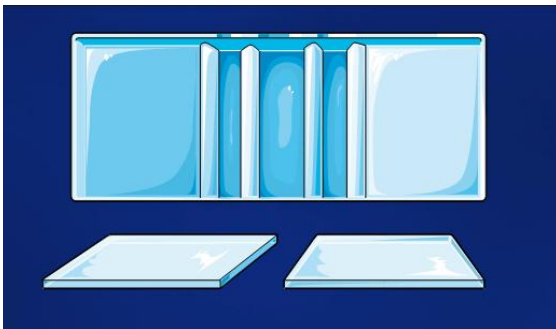
11.4) Glossari Vocabulari



BALANÇA: Aparell digital de mesura utilitzat per avaluar, en aquest cas, pesos relativament petits.



BANY: Aparell utilitzat per a escalfar substàncies del laboratori que per ser utilitzades necessiten estar a una determinada temperatura.

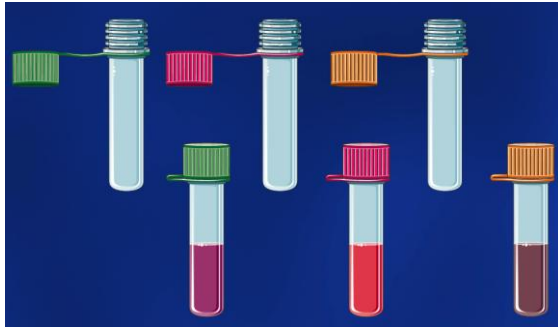


CAMBRA DE NEUBAUER:

Instrument utilitzat per a dur a terme el recompte de cèl·lules en un medi líquid (sang, cultiu cel·lular, orina, etc.)



CENTRIFUGADORA: Aparell que s'utilitza per a centrifugar els recipients que contenen cèl·lules i medi de cultiu. Mitjançant la centrifugació aconseguim que les cèl·lules sedimentin al fons del tub i per tant, podem extreure el medi sobrant d'aquestes.



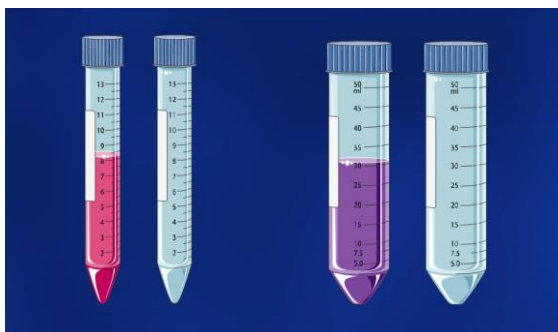
CRITOTUBS: Tubs d'una capacitat de 1,5mL que són utilitzats per a guardar les cèl·lules durant la seva congelació.



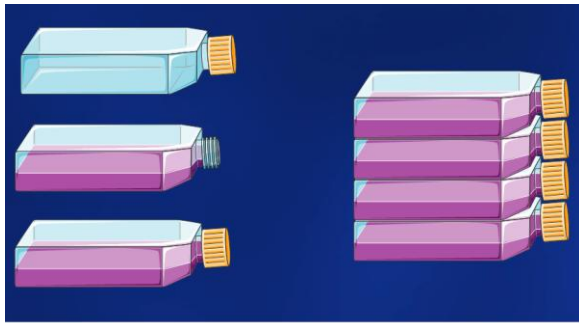
EMBUT FILTRACIÓ: Aparell que s'utilitza per a filtrar la solució cel·lular i extreure'n les restes de greix o brutícia que hi puguin haver.



EPPENDORS: Recipients d'1,5mL de capacitat que s'utilitzen per barrejar el blau de tripà amb la solució cel·lular.



FALCONS: Recipients de capacitats variables utilitzats per guardar la suspensió cel·lular durant el període que l'estem utilitzant i no la sembrem en un flascó.



FLASCONS: Recipients de mides també variables a l'interior dels quals es cultiven les cèl·lules. Aquestes s'adhereixen al fons i allà proliferen i es reproduïxen.



INCUBADOR: Aparell que manté els cultius cel·lulars a una temperatura de 37°C (temperatura del cos humà) per tal de que les cèl·lules es trobin més còmodes i proliferin més ràpidament.



MEDIS DE CULTIU: Contenen tots els nutrients i substàncies essencials per a l'òptim creixement i desenvolupament de les cèl·lules.



MICROPIPETES: Pipetes que s'utilitzen per a mesurar volums molt petits, poden oscil·lar entre els 10 i 1000µm.

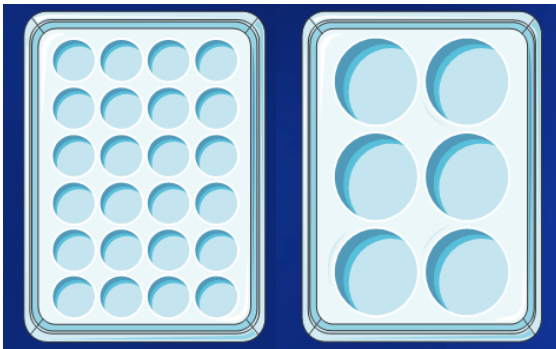


MICROSCOPI ÒPTIC: Instrument que permet visualitzar les cèl·lules ja que a simple vista són massa petites. Si el connectem a una càmera podem obtenir imatges de les cèl·lules en cultiu.

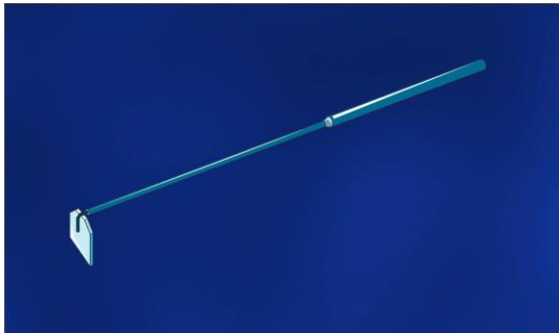


PIPETEJADOR I PIPETES: Les pipetes s'utilitzen per mesurar determinades quantitats d'una solució, n'hi ha de moltes mesures diferents (5, 10, 25 mL, etc.)

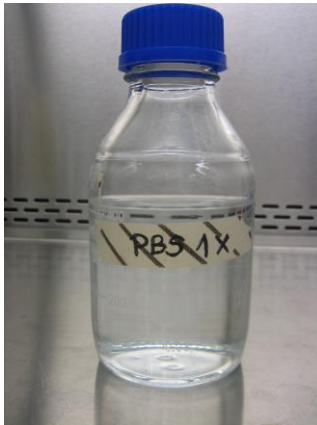
Per recollir la solució mitjançant la pipeta ens ajudem d'un pipetejador, aparell que té la funció de xuclar la substància i per tant, fer que aquesta entri dins la pipeta.



PLAQUES: Recipients amb diferents compartiments anomenats pouets, on es sembren les cèl·lules quan només en necessitem una quantitat determinada per a dur a terme un experiment.



RASCADOR: Eina que s'utilitza per a acabar de desenganxar les cèl·lules del fons d'un recipient en el qual estan adherides.



SOLUCIÓ SALINA (Phosphate buffered saline, PBS): És una solució tampó aquosa en l'investigació biològica. Conté clorur de sodi, fosfat de sodi, clorur de potassi i fosfat de potassi. S'utilitza per a netejar els cultius cel·lulars, extraient-ne les restes de medi, tint, greix, etc.



TRIPSINA: Solució composta per l'enzim tripsina, el qual té la capacitat de trencar els enzims peptídics de les proteïnes. S'utilitza per a desenganxar les cèl·lules del flascons i així poder-les canviar de recipient de cultiu.