

**CARDIOMIÒCITS HUMANS A
PARTIR DE CÈL·LULES MARE
IPS**

INSTITUT REGUISSOL
TREBALL DE RECERCA
2n BATXILLERAT
2013-2014



La esperanza de vida máxima tiene que ser con la ayuda de la medicina regenerativa. De la posibilidad de fabricar órganos propios de nuestro propio tejido, de nuestras propias células, sin miedo al rechazo.

Dr. Jesús Tres Guerras



PÀGINA D'AGRAÏMENTS I DEDICATÒRIES

M'agradaria agrair a tot l'equip d'investigació de l'IBEC (Institut de Bioenginyeria de Catalunya) tot el que han fet per tal de poder-me ajudar en tot el que han pogut, per oferir-se en ajudar-me amb qualsevol cosa i per donar-me l'oportunitat de poder saber com és el dia a dia la investigació dins d'un laboratori. En especial donar les gràcies al Sr. Àngel Raya que és el cap d'investigació en cèl·lules mare i a la Laia Gregori que ha estat l'estudiant de màster que m'ha guiat durant els meus dies al laboratori.

D'altra banda també m'agradaria agrair a en Carlos Semino, a la Caterina i a la Patricia, professor i alumnes de màster a l'IQS (Institut Químic de Sarrià), la possibilitat de poder seguir i participar en dos investigacions, una de les quals es realitza amb els diners guanyats a la Marató de TV3 de l'any 2012.

També m'agradaria donar les gràcies al meu tutor de l' institut a l' Albert Arcas per guiar-me a l'hora de realitzar el meu treball i a la Muntsa Estrada per oferir-se i ajudar-me a entendre tot allò que m'era nou en el món de la biologia.

Finalment, m'agradaria donar les gràcies a la meva mare ja que ha estat la que m'ha portat als laboratoris per poder realitzar la part pràctica del treball i també la que em va acabar de convèncer per fer el treball sobre aquest tema. També donar-li gràcies perquè molts laboratoris em deien que el que volia fer era impossible per la edat que tenia i ella em va convèncer per continuar enviant correus i concertar entrevistes a varis laboratoris per aconseguir fer el que realment m'agradés.

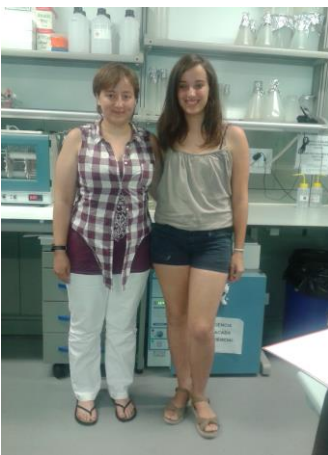


Figura 1 la Laia i jo



Figura 2 Àngel Raya

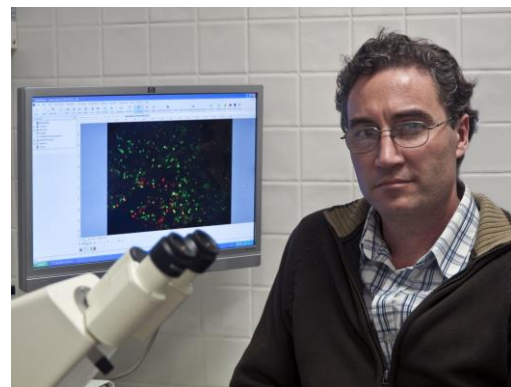


Figura 3 Carlos Semino



ÍNDEX

Pròleg.....	pàg 5
1. Introducció.....	pàg 7
1.1. Origen de l'estudi les cèl·lules mare.....	pàg 8
1.2. Què són les cèl·lules mare? Com es formen?.....	pàg 10
1.3. Tipus de cèl·lules mare.....	pàg 11
1.4. Mètodes d'obtenció de cèl·lules mare.....	pàg 19
1.5. Usos de les cèl·lules mare.....	pàg 20
1.6. Aspectes legals, ètics i morals de les cèl·lules mare....	pàg 20
2. EXPERIMENTACIÓ.....	pàg 22
2.1 Metodologia.....	pàg 22
2.2 Pràctica IBEC.....	pàg 26
3. "Redacció" de l'estància a l'IQS i de l'experiment realitzat allà.....	pàg 104
4. Articles sobre notícies importants de cèl·lules mare.....	pàg 105
5. Conclusions generals del treball.....	pàg 117
6. Vocabulari Científic.....	pàg 119
7. Bibliografia.....	pàg 123
8. Annex: Material de la part experimental.....	pàg 126

PRÒLEG

El tema que he escollit pel meu treball de recerca ha estat el món de les cèl·lules mare. El motiu que m'ha portat a triar-lo és tot el que es pot arribar a fer amb elles. D'altra banda, el món de la ciència, en especial el de la biotecnologia sanitària, m'apassiona. El fet de poder curar o si més no descobrir alguna cosa per en un futur o en l'actualitat acabar definitivament amb alguna malaltia em dóna molta motivació i competitivitat per aconseguir allò que molts desitgem. També, un dels motius que em porta a fer aquest treball és l'avenç científic i la importància de les cèl·lules mare actualment junt amb algun dels seus descobriments.

L'objectiu del meu treball és saber si els cardiomiòcits són bons marcadors de l'estat de progenitor cardíac (en teoria quan estan en estadi de progenitors cardíacs, expressen Nkx2.5 i GFP però es vol confirmar). En el mateix experiment averiguarem si quan els cardiomiòcits expressen GFP vol dir que estan en estat de progenitor cardíac. Tot això formarà part de la meva part pràctica. Aquest experiment el podré acabar però també participaré a una recerca d'un altre projecte amb cèl·lules mare en el qual hi col·labora la Marató de TV3. Aquest últim és massa llarg i no em donarà temps d'acabar-lo, per tant, amb les tècniques que hagi après en el primer projecte em podré fer una idea de com acabarà. A més a més el projecte de l'IQS també em servirà per agafar més pràctica i experiència dins d'un laboratori.

Per tal d'aconseguir tot el que he plantejat he organitzat el treball de la següent manera:

Primer de tot introduiré el tema explicant l'origen de l'estudi de les cèl·lules mare. D'altra banda també explicaré com actuen, com es diferencien, etc. Tot seguit anomenaré els diversos tipus de cèl·lules mare que hi ha, les fonts d'obtenció, el nom que reben... Seguidament ve el que és el cos central del meu treball, les cèl·lules IPS (cèl·lules mare pluripotents induïdes), ja que igual que els cardiomiòcits ocupen un paper important a la meua recerca. A partir d' aquesta informació, em centraré en els usos de les cèl·lules mare, els avenços i descobriments actuals relacionats amb aquestes. Finalment explicaré els aspectes



legals, ètics i morals que comporta treballar amb cèl·lules mare a Catalunya, perquè així pugueu entendre totes les dificultats amb les que ens trobem a l'hora de fer investigacions o simplement manipular cèl·lules mare. Tot això formaria part de la teòrica. Però el meu treball es divideix en dues parts, i la segona és la pràctica que consisteix en anotar tot el procediment de l'experiment realitzat a l'IBEC i al final explicar per sobre el de l'IQS ja que no el podré acabar. La part pràctica, com qualsevol experiment, constarà d'uns objectius, el material, la metodologia, el procediment, els resultats o problemes i les conclusions. D'altra banda també adjuntaré alguna fotografia per visualitzar una mica més els experiments. Una de les altres raons de comparar les dues investigacions és veure com es du a terme un projecte començat i acabat i un altre que gràcies a una col·laboració econòmica (en aquest cas de la Marató de TV3), podré veure en què s'inverteixen els diners aconseguits i explicar la investigació més recent que porten a terme. Una de les coses que m'ha ajudat més a introduir-me en aquest tema ha estat la oportunitat que he tingut de realitzar la meva part pràctica a l'IBEC (Institut de Bioenginyeria de Catalunya) i a l'IQS (Institut Químic de Sarrià). A l'IBEC vaig tenir la sort que tot l'equip em va acceptar com un més del seu equip d'investigació i em van facilitar moltes coses que no m'hagués imaginat, com podria ser manipular part de l'experiment, fer alguna pràctica a part, ensenyar-me totes les instal·lacions, com funcionava tot, etc. D'altra banda a l'IQS també m'han ajudat molt i igual que l'IBEC em van ensenyar tots els laboratoris de la universitat, i em van deixar manipular i participar en els dos projectes que seguia. Per facilitar la lectura de tot el treball, he fet un mini recull de vocabulari científic que he anat anomenant.



INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules mare en concret és un tema del qual tot i existir fa anys, se'n parla públicament des de fa pocs anys. Això és degut a que és una part de la ciència que a molts països ja sigui per raons ètiques, morals o religioses encara no es pot manipular i per tant limita molt l'avenç en curació de malalties, etc.

Amb aquest treball pretenc fer conèixer una mica més aquest món que ens envolta i que per a la majoria de les persones és desconegut. Crec que hauríem de saber el màxim sobre aquest tema ja que es parla que podria ser la solució per a la curació de moltes malalties en un futur.

Crec que de la manera en què he estructurat el treball puc fer entendre la gran importància que tenen les cèl·lules mare en l'actualitat i la importància que poden tenir en un futur molt proper.



1.1 ORIGEN DE L'ESTUDI DE LES CÈL·LULES MARE

El món de les cèl·lules mare va sorgir per primera vegada fa molts anys. Tot seguit faré una breu descripció dels avenços més importants que hi ha hagut a la història de les cèl·lules mare fins ara a l'actualitat.

- ❖ 1850 - Descobriments d'unes cèl·lules que podien generar cèl·lules d'altres tipus.
- ❖ 1900 – Van ser descobertes les primeres cèl·lules mare quan es va observar que unes cèl·lules generaven cèl·lules mare sanguínies.
- ❖ 1958 – Jean Dausset (científic francès) va descobrir la causa del rebuig en molts transplantaments. Va descobrir que a la superfície de la membrana cel·lular hi havia unes proteïnes especialitzades, les quals rebien el nom d'**antígens** leucocitaris humans (HLA). Els antígens s'encarreguen que el sistema immunitari determini el que accepta i el que no en el cos. Quan el sistema immunològic troba antígens a una cèl·lula, el sistema immune genera **anticossos** i altres substàncies per destruir el que percep com a desconegut.
- ❖ 1960 – Es diu que les cèl·lules mare dels mamífers són de dos tipus: embrionàries i adultes.
- ❖ 1960 - Les cèl·lules mare embrionàries i adultes van ser descobertes per uns científics canadencs (Ernest A. McCulloch i James E.).
- ❖ 1973 – Uns metges de l'Hospital de Nova York Memorial Sloan-Kettering Cancer Center van realitzar el primer transplantament de medul·la òssia d'un donador no relacionat amb el parentesc. Les cèl·lules mare de la medul·la òssia van actuar treballant en els ossos del receptor creant una medul·la sana la qual era necessària per la producció de glòbuls blancs i vermells.



- ❖ 1973 - Les cèl·lules mare de la medul·la òssia mostren antígens de l' HLA que requereixen proves per minimitzar la possibilitat de rebuig.
- ❖ 1973 – Les cèl·lules de la sang del cordó presenta menys risc de rebuig.
- ❖ 1992 – Les cèl·lules mare de les neurones es cultiven **in vitro** per primera vegada.
- ❖ 1994 - Primera vegada que s'obtenen cèl·lules mare embrionàries. Es van aïllar a partir d'un **blastocist** procedent de fecundació in vitro.
- ❖ 1998 – Un grup de científics de la Universitat de Wisconsin van aconseguir el primer cultiu de cèl·lules mare embrionàries humanes a partir de blastocists.
- ❖ 1999 – Es va descobrir el procés de diferenciació.
- ❖ 2006 – A partir de cèl·lules del fetge i del cordó umbilical obtenen cèl·lules mare sanguínies.
- ❖ 2008 – Formació de les cèl·lules mare IPS a partir del fetge i estómac d'un ratolí adult.
- ❖ 2013 – Per primera vegada amb el mètode de transferència nuclear es clonen cèl·lules mare humanes.
- ❖ 2013 – Es crea una vacuna amb dosis de cèl·lules mare contra la diabetis.
- ❖ 2013 – Creació d'un fetge artificial mitjançant les cèl·lules mare.
- ❖ 2013 – Formació d'una hamburguesa feta de cèl·lules mare.
- ❖ 2013 – Un cor de ratolí reconstruït amb cèl·lules mare torna a bategar.

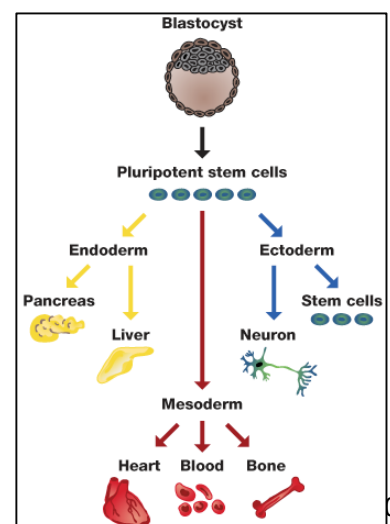


- ❖ 2013 – Microcervells creats a partir de cèl·lules mare.
- ❖ 2013 – Científics aconseguen re-programar cèl·lules mare dins del cos.
- ❖ 2013 – Es dona via lliure per provar en pacients, cèl·lules mare contra el pàrkinson.
- ❖ 2013 - Científics obtenen pell artificial a partir de cèl·lules mare del cordó umbilical.
- ❖ 2013 - Es creen mini-ronyons humans a partir de cèl·lules mare.
- ❖ 2013 – Transformen cèl·lules mare en cèl·lules pulmonars funcionals.

1.2 QUÈ SÓN LES CÈL·LULES MARE? COM ES FORMEN?

El concepte de cèl·lules mare (*stem cell* en anglès) es refereix a totes aquelles cèl·lules que són indiferenciades i tenen la capacitat d' autorenovar-se i reproduir-se indefinidament. Podríem dir que són especials ja que a partir d'una cèl·lula mare, mitjançant el procés de diferenciació podem obtenir altres cèl·lules especialitzades en diferents funcions ja sigui en cèl·lules cardíaques, musculars, nervioses, etc. Un cop hagin acabat el procés de diferenciació, aquestes cèl·lules perden la capacitat de dividir-se (*Fig.4*).

Figura 4 Procés de diferenciació d'una stem cell fins a no poder-se diferenciar més. <http://mcolille.over-blog.es/article-cafe-cientific-cel-lules-mare-embrionaries-i-cel-lules-ips-113607814.html>





D'altra banda, també identifiquem a les cèl·lules mare, com a cèl·lules biològiques que es poden trobar a tots els organismes multicel·lulars i que es divideixen per **mitosi**. Per tant, sempre d'una, n'obtidrem dues d'identiques. Generalment les solem trobar en el cordó umbilical, a la medul·la òssia, als teixits i a alguns òrgans.

Un exemple de la formació de les cèl·lules mare és el desenvolupament humà a partir de la fecundació (Fig.5). Amb la fecundació d'un òvul i un espermatozoide es forma la cèl·lula mare per excel·lència, el zigot, que en aquest cas té la capacitat de totipotència. Tot seguit, mitjançant la mitosi, el zigot es divideix en cèl·lules totipotents idèntiques. Al llarg dels següents dies, com qualsevol cèl·lula mare, aquesta anirà especialitzant-se fins a tal punt de formar el blastocist el qual servirà com a una altra font d'obtenció de cèl·lules mare encara sense especialitzar, que al llarg del temps podran arribar a formar o regenerar òrgans, teixits, etc. Per tant, estariem parlant de cèl·lules mare amb pluripotència.

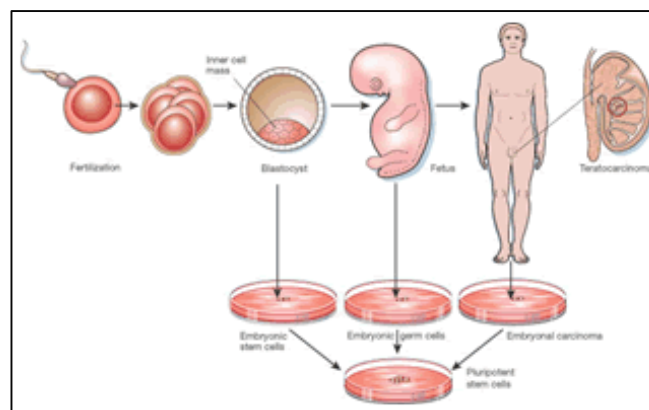


Figura 5 Origen de les cèl·lules mare d'origen embrionari. Esquema reproduït de la publicació. *The end of the beginning for pluripotent Stem Cells. Nature 414: 92-97.*

1.3 TIPUS DE CÈL·LULES MARE

Dins el camp de les cèl·lules mare, si ens referim a les diferents fonts d'obtenció, les podem distingir en dos grans grups (Fig.6):

- ❖ Cèl·lules mare embrionàries (CME).



❖ Cèl·lules mare adultes (CMA).

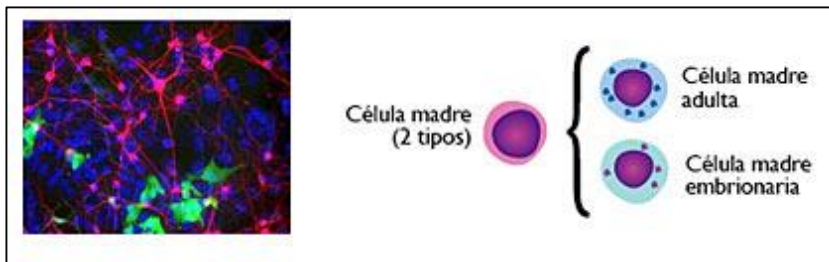


Figura 6. Esquema dels dos tipus de cèl·lules mare segons la font d'obtenció.

<http://www.tocogyn.com/umbilical-tipos-celulas-madre.asp>

- Cèl·lules Mare Embrionàries

Aquest tipus de cèl·lula mare procedeix de la massa cel·lular interna d'embrions en estat de blastocist. A partir del qual es pot formar qualsevol dels tres estadis embrionaris (**endoderma**, **ectoderma** i **mesoderma**).

Les cèl·lules mare embrionàries es caracteritzen per tenir multipotència i pluripotència a la vegada, per això, les CME poden donar lloc a noves cèl·lules mare o a teixits cel·lulars del nostre cos. D'altra banda les CME tenen bastants avantatges de cara a l'ús clínic i científic. Per exemple, el cultiu d'un fetus originat per cultiu in vitro i en condicions **in vivo** donaria lloc al creixement de noves cèl·lules mare embrionàries. D'altra banda, es poden obtenir a clíniques de fertilitat de manera fàcil mitjançant el cultiu in vitro i in vivo. Aquestes cèl·lules també es caracteritzen per un fet molt important que és que a partir d'una **línia cel·lular** es poden obtenir milers de cèl·lules, cada una amb diferents qualitats.

Tot i això, les cèl·lules mare embrionàries, com qualsevol mecanisme del nostre organisme, té els seus inconvenients. Un d'ells és que les CME són difícils de controlar tant en el seu creixement com en el procés de diferenciació. Per tant, és molt important que es dugui un control durant els primers dies de cultiu. Un altre problema que pot originar l'ús de CME és que poden afectar en el sistema immunològic del pacient, ja que pot ser que es produeixi rebuig. Això seria degut per el canvi de condicions que hi ha en el medi de cultiu a on s'han format i a l'organisme del pacient. D'altra banda les CME que encara no s'han diferenciat poden produir tumors benignes o teratomes quan són trasplantades a organismes adults. Per això actualment per evitar aquest problema intenten que a l'hora del



transplantament, totes les cèl·lules ja s'hagin diferenciat. Un altre dels inconvenients que té la utilització de cèl·lules mare embrionàries és que es poden produir infeccions ja que molts cops el material utilitzat pel creixement de les CME és d'origen animal. Per tant, podrien contenir alguns agents infecciosos, tant virus com bacteris, els quals el sistema immunològic humà no en produeix anticossos i per tant no hi podria combatre. També, un dels problemes més comuns és que hi ha la possibilitat de que hi hagi algun defecte genètic en el procediment de **clonatge terapèutic**. Aquest problema es presenta quan les cèl·lules de les quals obtenim les CME tenen algun problema genètic. Llavors, aquest problema també apareixeria a les cèl·lules mare embrionàries. Finalment un dels problemes que pot causar la seva utilització és l'aparició de tumors malignes.

- Obtenció de cèl·lules mare embrionàries

Primer de tot mitjançant la fecundació in vitro es fertilitza un ovòcit ja sigui posant-lo amb contacte amb un espermatozoide o injectant varis gàmetes masculins a l'ovòcit (injecció intracitoplasmàtica, *Fig.7*). Un cop fecundat, obtindrem la primera cèl·lula mare embrionària, el zigot.

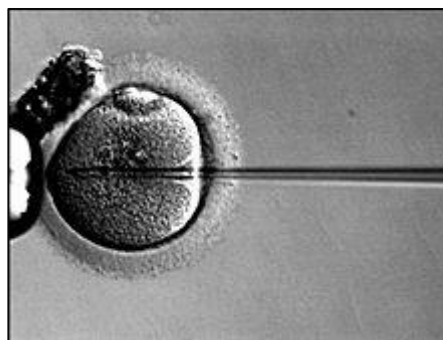


Figura7 Procés d'injecció intracitoplasmàtica.

http://es.wikipedia.org/wiki/Inyecci%C3%B3n_intracitoplasm%C3%A1tica_de_espermatozoides

Tot seguit el zigot es divideix per **meiosi**, per tant estaríem parlant d'un cicle diploide. La seva divisió dona lloc a la **mòrula** i finalment al blastocist que és una etapa del desenvolupament embrionari dels mamífers. Tot seguit, el blastocist, que



és un conjunt de cèl·lules idèntiques a les del zigot, s'implanta a l'úter i a partir d'aquell moment comença la formació del futur embrió. Les cèl·lules del blastocist reben un nom peculiar (*Fig.8*):

ES (Embryonic Stem Cells) = Cèl·lules mare embrionàries

Durant aquest procés les cèl·lules són totipotents ja que l'embrió encara no ha format les tres capes germinals i està envoltat d'unes cèl·lules que el protegeixen.



Figura 8 Procés de formació de cèl·lules mare embrionàries (CME).

<http://www.uciencia.uma.es/Revista-Uciencia/Ellas-investigan/Investigacion/Celulas-madre-la-panacea-de-la-medicina-del-siglo-XXI>

Seguidament s'extreuen les cèl·lules interiors del blastocist i a partir d'aquí poden tenir dues aplicacions diferents.

- A) Es fa un cultiu de cèl·lules mare embrionàries reproduint les mateixes o semblants condicions del teixit que es vol formar, per dur a terme el procés de diferenciació. Durant la diferenciació, les cèl·lules mare passen per molts estats diferents els quals faran que es transformin en cèl·lules mare del mesoderma, l'ectoderma i l'endoderma. Un cop diferenciades totalment ja no



tenen la capacitat de diferenciar-se per segon cop. Per tant, cada cèl·lula mare només té activada la informació del teixit al qual pertany.

- B) Una altra possibilitat seria utilitzar cèl·lules mare encara sense diferenciar. Ja que durant molt temps molts científics han demostrat que les cèl·lules mare indiferenciades actuen a la zona afectada i allà comencen el procés de diferenciació. Per tant podrien ser la solució a moltes malalties.

- Cèl·lules Mare Adultes

Les cèl·lules mare adultes també es coneixen com a cèl·lules mare específiques de teixit. Es troben en els organismes de fetus en desenvolupament, en recent nascuts, en nens i adults.

Comparades amb les cèl·lules mare embrionàries, aquestes, solen ser més limitades en nombre i també més especialitzades ja que només poden formar un o dos tipus de teixit com pot ser cèl·lules de la sang, musculars, etc. Les cèl·lules mare adultes es divideixen en tres grans blocs:

- ❖ Cèl·lules mare de la medul·la òssia.
- ❖ Cèl·lules mare nervioses.
- ❖ Altres tipus de cèl·lules mare (sanguínies, musculars, etc).

· De les cèl·lules mare extrems de la medul·la en podem distingir varis tipus ja que és la principal font d'obtenció de cèl·lules mare adultes. En podríem destacar:

- Cèl·lules mare hematopoètiques (cèl·lules sanguínies).
- Cèl·lules mare mesenquimals.
- Cèl·lules mare de la " Side Population ".
- Cèl·lules mare MAPC (multipotent adult stem cells).

· D'altra banda les cèl·lules mare nervioses, mitjançant la diferenciació podrien acabar donant lloc a neurones o a qualsevol teixit nerviós.

· Finalment quan parlem d'altres tipus de cèl·lules mare adultes, ens trobaríem amb les cèl·lules satèl·lit o mioblast.



L'ús de cèl·lules mare adultes té els seus avantatges i inconvenients. Els avantatges que tenen és que poden ser utilitzades per crear gairebé qualsevol teixit humà (molta flexibilitat). D'altra banda comparades amb les cèl·lules mare embrionàries, aquestes són més especialitzades i també són més fàcils d'induir. Finalment, un dels avantatges més profitosos que té l'ús de CMA és que no provoquen problemes en el sistema immunològic del pacient.

Si ens centrem en els seus inconvenients podem veure que si estan en cultiu tenen una vida " limitada " ja que no es poden arribar a reproduir les característiques necessàries. També és més difícil treballar amb elles a gran quantitat perquè comparat amb les CME, d'aquestes només en podem obtenir petites quantitats. D'altra banda, les CMA que hagin estat en cultiu poden ser l'origen o el focus de noves malalties, o tenen la possibilitat de " morir " durant la seva experimentació.

Les cèl·lules mare adultes es diferencien de les embrionàries ja que poden dur a terme la **transdiferenciació**. Durant tots aquests anys d'investigació en el camp de les cèl·lules mare s'ha comprovat que les cèl·lules mare adultes no només es diferencien un cop sinó que tenen la capacitat de diferenciar-se per segon cop i així obtenir una segona cèl·lula especialitzada en una altra funció (Ex: cèl·lules neuronals → cèl·lules sanguínies).

- **Obtenció de cèl·lules mare adultes**

Quan parlem de l'obtenció de cèl·lules mare adultes, podem distingir dos mètodes:

- ❖ Utilitzant una màquina d'afèresis terapèutica.
- ❖ Punció de medul·la òssia.

El mètode de la màquina d'afèresis terapèutica consisteix en separar les cèl·lules mare adultes de la sang del pacient amb la màquina. Tot seguit s'aïllen per mitjà d'un separador cel·lular. La sang arriba a aquest separador mitjançant una vena. A més a més d'aïllar les cèl·lules, el separador, enfondeix la sang de nou al pacient. Aquest procediment es du a terme en petites fraccions de temps anomenades cicles.



D'altra banda el mètode de punció de la medul·la òssia es pot dur a terme de dues maneres diferents. Per punció a l'esternon o a la cresta ilíaca.

La punció (*Fig.9*) és un procediment invasiu utilitzat habitualment en el camp de la medicina en els estudis bàsics de la medul·la òssia. Aquest procediment consisteix en aspirar el material líquid que conté el teixit ossi, i també s'utilitza per l'obtenció de cèl·lules mare adultes. El mètode de punció segueix els següents passos: Es pinça la zona de punció amb un **antisèptic**. Tot seguit s'introdueix un camp quirúrgic estèril i el metge, amb guants estèrils localitza la zona de punció i lentament injecta una agulla estèril (comprovant que no estigui en vena) i tot seguit col·loca l'anestèsia local fins la part més externa de l'os. Seguidament es col·loca la xeringa a la zona de punció i s'aspira la quantitat de sang de la medul·la òssia necessària.

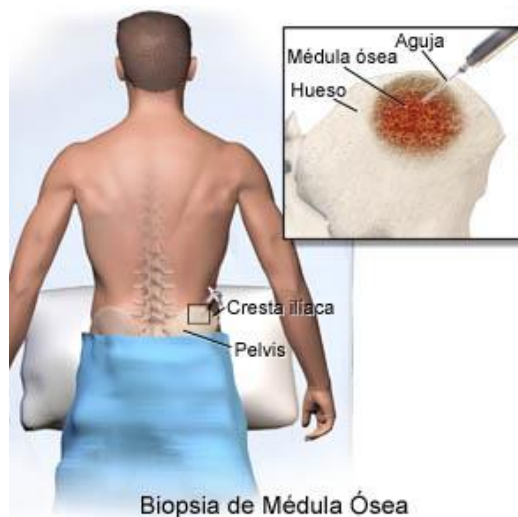


Figura 9 Procés de punció de medul·la òssia. <http://unimedsc.wordpress.com/celulas-madre/%C2%BFcomo-se-obtienen-las-celulas-madre-adultas/>

· D'altra banda si ens referim a tipus de cèl·lules mare segons la seva funció trobem que poden ser:

- ❖ Totipotents.
- ❖ Pluripotents.
- ❖ Multipotents.
- ❖ Unipotents.
- ❖ IPS (induced pluripotent stem cells).



- Cèl·lules mare totipotents

La totipotència de qualsevol cèl·lula mare és la capacitat d'originar ja sigui per divisió o diferenciació la major part de cèl·lules que constitueixen el nostre organisme incloent els teixits extraembrionaris (són cèl·lules pluripotents). Les cèl·lules totipotents es poden formar tant per reproducció sexual com asexual. A la reproducció sexual es du a terme per la fertilització d'un òvul i un espermatozoide. D'aquesta manera es forma el zigot que durant les primeres hores es divideix en cèl·lules totipotents idèntiques mitjançant el procés de mitosi. Al cap d'uns dies, aquestes cèl·lules començaran el procés de diferenciació. Per tant, veient tot el que presenten les cèl·lules totipotents podem veure que són cèl·lules que tenen la capacitat de crear i formar un organisme sencer.

- Cèl·lules mare pluripotents

Ens referim a cèl·lules mare pluripotents, a totes aquelles cèl·lules que mitjançant el procés de diferenciació poden donar lloc a alguna de les tres capes germinals. Aquestes cèl·lules poden donar lloc tant a cèl·lules fetals com d'adults. A diferència de les cèl·lules mare totipotents, les pluripotents no poden originar un ésser sencer ja que no tenen la capacitat de formar part del teixit embrionari.

- Cèl·lules mare multipotents

Les cèl·lules mare multipotents es caracteritzen pel fet de que poden donar lloc a cèl·lules de diversos tipus però en un nombre limitat de **llinatges**. Un exemple de multipotència serien les cèl·lules sanguínies. D'altra banda les cèl·lules mare pluripotents vénen a ser el mateix que les multipotents ja que les pluripotents hi ha un moment en el qual duen a terme una especialització addicional i és en aquest moment que es converteixen en cèl·lules mare multipotents.

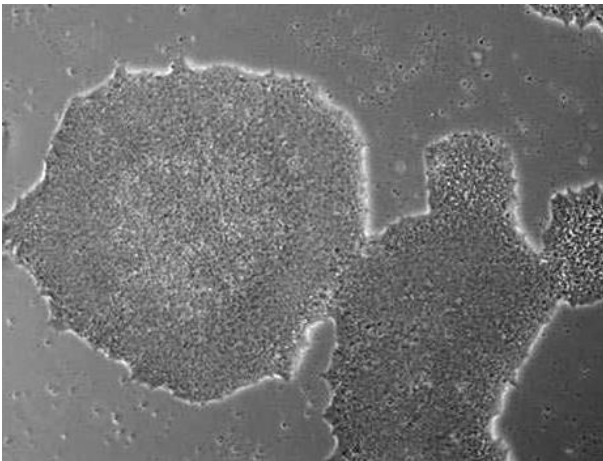
- Cèl·lules mare unipotents

Quan parlem de cèl·lules mare unipotents, ens referim a aquelles cèl·lules que només es poden diferenciar en un únic tipus cel·lular. Un exemple d'aquest tipus de cèl·lula serien les cèl·lules del teixit epitelial.

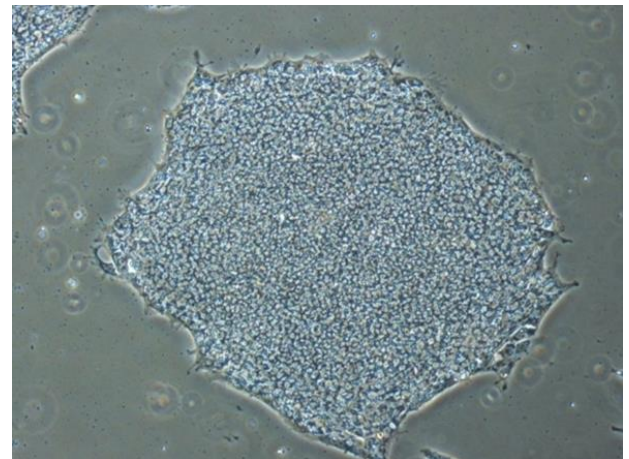


- Cèl·lules IPS (Induced Pluripotent Stem Cells)

Les cèl·lules IPS (*Fig.10 i 11*) són un tipus de cèl·lula mare que es genera al laboratori a partir de qualsevol tipus de cèl·lula humana adulta. Tenen la capacitat de donar origen a tots els teixits del nostre organisme. Les cèl·lules IPS es formen mitjançant el procés de reprogramació cel·lular que consisteix en introduir un còctel específic de gens en qualsevol cèl·lula adulta a través de la transfecció o infecció amb virus. El que fa la **transfecció** i la infecció és que com que contenen gens relacionats amb les cèl·lules mare, fan que aquestes tornin a tenir la capacitat de pluripotència. Les cèl·lules IPS són una bona alternativa ja que amplia les oportunitats de recerca. S'utilitzen tant a nivell cel·lular com molecular.



* **Figura 10** cèl·lula mare IPS



* **Figura 11** cèl·lula mare IPS

**Autora de les fotografies: Laia Gregori.*

1.4 MÈTODES D'OBTENCIÓ DE CÈL·LULES MARE

Les cèl·lules mare les podem obtenir mitjançant varis mètodes els quals són:

- ❖ **Embrions crio conservats:** Consisteix en congelar embrions a -196°C per conservar perfectament totes les qualitats de les seves cèl·lules.
- ❖ **Blastòmers individuals:** Consisteix en deixar créixer l'òvul fins que arribi a l'estat de mòrula i extreure-li una cèl·lula per cultivar-la posteriorment.



- ❖ Induint cèl·lules adultes unipotents en cèl·lules IPS.
- ❖ Extracció de cèl·lules mare adultes especialitzades dels seus propis teixits o òrgans.

1.5 USOS DE LES CÈL·LULES MARE

Actualment, tant la ciència, la recerca i la investigació han avançat molt. El valor terapèutic més important de les cèl·lules mare és el seu ús en teràpies cel·lulars a on es substitueixen els teixits que no funcionen o que ho fan de manera incorrecta. Una altra utilitat de les cèl·lules mare és en el camp de la medicina regenerativa. Utilitzant-les, hi ha la possibilitat que hi hagi menys rebuigs que amb un transplantament. També s'usen en proves de medicaments abans de sortir al mercat. Un avantatge de fer servir aquest mètode és que es pot saber com actua el sistema immunològic humà davant d'aquest fàrmac. Finalment, un ús de les stem cells molt actual és la transferència nuclear per tal de clonar-les i així obtenir-ne major quantitat per la recerca i la investigació.

1.6 ASPECTES LEGALS, ÈTICS I MORALS DE LES CÈL·LULES MARE

La recerca amb cèl·lules mare embrionàries té una ample controvèrsia. Això és degut a què l'actual estat de la ciència i la tecnologia, fa que per iniciar una investigació amb una nova línia cel·lular s'ha de destruir un embrió humà o bé fer ús de la clonació terapèutica.

Les persones que estan en desacord amb la recerca de cèl·lules mare, diuen que investigar amb cèl·lules humanes és tractar als humans com si fossin objectes de laboratori i no pas com a humans. A més a més creuen que la investigació amb aquest tipus de cèl·lules, fomenta la clonació reproductiva. D'altra banda els que estan a favor d'aquesta investigació argumenten que s'ha d'apostar per les cèl·lules mare ja que faran que les tecnologies d'un futur molt proper tinguin un potencial mèdic molt important. Aquestes dues opinions han fet que s'implantessin lleis de



més o menys importància als països tenint en compte l'entorn que els envolta, la cultura establerta, la religió... Tornant als arguments dels que estan a favor i els que estan en contra, el que hi estan en desacord diuen que la investigació amb cèl·lules mare viola la religió i per tal de tenir la raó també critiquen la distinció que es fa entre un blastocist i un fetus.

El món de les cèl·lules mare per a molts científics els hi és fàcil saber els avenços i resultats que se n'obtidran en un futur. Això ha estat un punt a favor dels que hi estan en contra ja que acusen als científics d'enganyar i donar falses expectatives a la gent i també per demostrar que el futur de la investigació ja està per dir-ho d'alguna manera, determinat.

A continuació hi ha una taula (*Taula 1*) a on es representen els països a on està permesa la investigació amb cèl·lules mare, a on està prohibit, a on segons què es pot fer però amb moderació i a on per exemple Estats units hi ha alguns estats en què està prohibit i altres estats en els quals reben alguna ajuda financera per poder-hi investigar.

Taula 1 Graella a on es mostren els països que són permissius, no permissius, restrictius... en l'ús de CM

PERMISSIUS	NO PERMISSIUS	RESTRICTIUS	PERMISSIUS I NO PERMISSIUS
Unió Europea	Alemanya	Nova Zelanda	Estats Units
Suècia	Àustria	Països Africans	
Finlàndia	Irlanda	Països Sud-americans	
Grècia	Itàlia	Espanya	
Gran Bretanya	Portugal		
Països Baixos			
Xina			
Corea del Sud			
Japó			
Índia			
Austràlia			



2. EXPERIMENTACIÓ

2.1 METODOLOGIA DE TREBALL

- **CITOMETRIA DE FLUX I CELL SORTER (FACS)**

La citometria de flux és una tècnica en la qual les cèl·lules en suspensió del fluid travessen un tub transparent que és molt fi, en el qual hi incideix un raig de llum làser. La llum absorbida i dispersa per les cèl·lules, a través del tub, es recull per mitjà d'un dels dispositius de detecció, permetent fer inferències en la mida i la complexitat de les cèl·lules. A més a més, la citometria de flux permet l'estudi de tant de característiques a nivell físic com químic de les cèl·lules. Això és un indicatiu que ens permet saber que aquest tipus de tècnica permet la separació de partícules, segons les seves propietats. Els objectius principals de la citometria de flux són: identificar i enumerar subpoblacions cel·lulars úniques indefinides, mesurar la capacitat funcional de les subpoblacions cel·lulars, etc. A la part experimental del meu treball he fet servir a la citometria de flux, la fluorescència. En aquest cas es tracta d'un fluoròfor que el que fa és absorbir la llum a una determinada longitud d'ona i emetre una longitud superior. Aquest fluoròfor es troba unit a un anticòs específic per antígens de la cèl·lula. La fluorescència de les cèl·lules serà proporcional a la quantitat de llocs d'unió. La fluorescència es pot aconseguir quan el fluoròfor absorbeix energia del làser, per la unió de llocs específics amb anticossos marcats amb fluoròfors i quan el fluoròfor allibera energia. Hi ha diversos tipus de marcadors o reactius fluorescents, en el cas del meu experiment, utilitzaré el DAPI (blau). La citometria de flux es basa en tres fases principalment:

- Fase pre-citometria: Es preparen els reactius, les cèl·lules, i es fa el disseny de la coloració de les cèl·lules amb els reactius fluorescents i del protocol establert.
- Citometria: Desenvolupament de les cèl·lules marcades i de la recollida de dades per cada un dels paràmetres.
- Anàlisi i resultats: Anàlisi dels resultats obtinguts.



A partir d'aquestes tres fases, la citometria de flux té un procediment establert si és que es vol dur a terme. En un principi, les cèl·lules tenyides amb un fluoròfor, totes barrejades entre elles, passen a través d'una agulla creant una fila de líquid que contenen les cèl·lules. A mesura que la cèl·lula passa per davant del làser, aquesta, desvia el raig incident i les molècules tenyides unides a la cèl·lula, són excitades i emeten llum fluorescent. Els resultats s'expressen amb histogrames o dot-plots.

A més a més quan parlem de citometria de flux, també ens podem referir al nom de FACS. Quan parlem d'aquest concepte, ens referim al conjunt de citometria de flux i cell sorter (*Fig.13*). El cell sorter es troba una mica abans del citòmetre. El que fa, en el cas del meu experiment, és separar les cèl·lules vives (fluorescents) de les mortes i així, amb les que estan vives es podrà aconseguir uns resultats finals mitjançant gràfics que com he esmentat anteriorment són dot-plots (*Fig.12*).

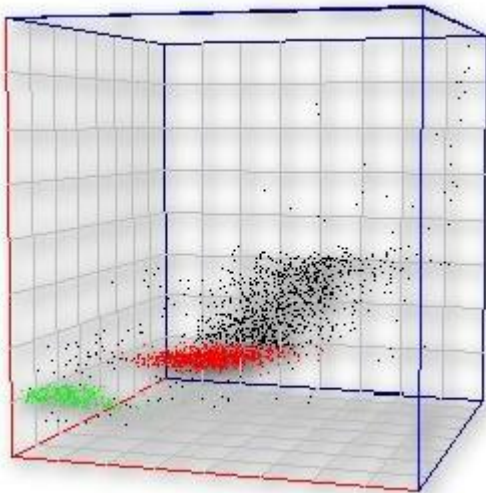
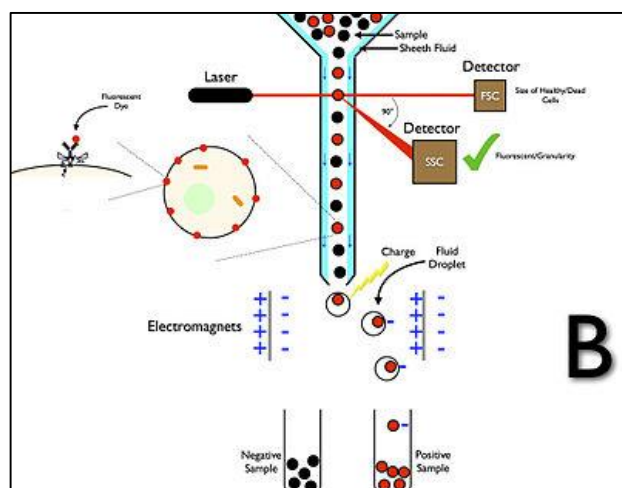


Figura 12 dot-plot amb resultats de citometria
<https://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/citometria.htm>

Figura13 procés de citometria i cell sorter
http://es.wikipedia.org/wiki/Citometr%C3%ADa_de_flujo





- **PCR:**

Tècnica que permet duplicar de forma il·limitada qualsevol fragment de DNA que es trobi dins d'un tub d'assaig. El que permet la PCR és generar milions de molècules iguals a partir d'una molècula d'ADN. Es sol utilitzar l'ADN-polimerasa de la bactèria aquàtica Thermus aquaticus ja que així, l'enzim pot treballar a temperatures altes. Per tal de dur a terme aquesta tècnica es necessiten petites quantitats de DNA, un tub d'assaig, reactius, una font de calor i cadenes de nucleòtids que actuen com a "primers". Quan parlem de PCR, parlem d'un procés cíclic. Per fer una PCR es segueixen els següents passos:

1. La molècula de DNA, que es troba dins del tub d'assaig, que es vol replicar, s'escalfa. Això fa que es desnaturalitzi i es separi en dos brins.
2. Tot seguit, cada un d'aquests brins és copiat per l'ADN-polimerasa.
3. Per acabar, les cadenes formades es separen novament per la calor i comença altre cop un nou cicle.
4. Aquest cicle es pot repetir fins a aconseguir el nombre de rèpliques desitjades (Fig.14).

La tècnica de la PCR té varies aplicacions. Una, per exemple, és la seqüenciació de l'ADN, d'altra banda una altra aplicació possible seria l'estudi de l'evolució. A més a més, la PCR identifica el tipus de cèl·lula o sigui, si és una cèl·lula hematopoètica, epitelial, etc.

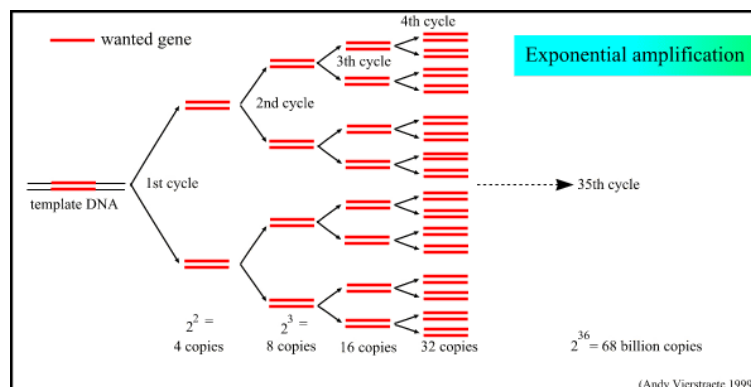


Figura 14 Procés de replicació d'ADN (PCR) <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>



- **Rt-qPCR:**

La PCR a temps real és una tècnica que permet fer mesures qualitatives i quantitatives de gens específics a una mostra d'àcid nucleic. La Rt-qPCR es sol utilitzar en anàlisis biològics, en expressions gèniques quantitatives, per elaborar genotips... Dit d'altra manera, la Rt-qPCR és utilitzada per amplificar i simultàniament quantificar de forma absoluta el producte de l'amplificació de l'ADN.

- **IMMUNOFLUORESCÈNCIA:**

La immunofluorescència és una tècnica que permet identificar microorganismes en mostres clíniques i detectar la presència d'un anticòs específic al sèrum. Aquesta tècnica es basa principalment en el marcatge dels anticossos primaris o anti-immunoglobulines específiques amb molècules fluorescents anomenades fluoròfors (Fig.15). Aquets, són unes substàncies que quan s'exciten per una font d'energia, emeten llum. Alguns fluoròfors més utilitzats són: el FITC (verd), Alexa 488 (vermell) i el DAPI (blau). Hi ha dos tipus d'immunofluorescència: la directa, i la indirecta. Per poder apreciar els resultats de la immunofluorescència es necessita un microscopi de fluorescència o un microscopi làser confocal.

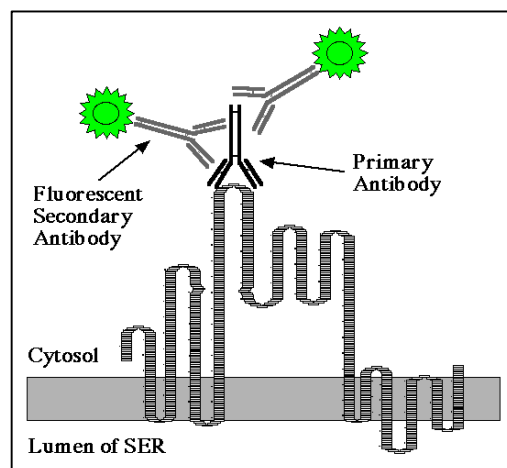


Figura 15 Anticossos amb fluoròfor enganxats al citosol
<http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/IMF.html>



2.2 PART EXPERIMENTAL : IBEC (generar cardiomiòcits humans a partir de cèl·lules IPS transgèniques que hauran d'expressar una proteïna fluorescent en el llinatge cardíac)

- Objectius i Hipòtesis:

L'objectiu principal d'aquesta investigació és saber si els **cardiomiòcits** són bons marcadors de l'estat de **progenitor cardíac** per això comprovarem que en aquest estat (el de progenitors cardíacs) expressin GFP (en teoria quan estan en estadi de progenitors cardíacs, expressen Nkx2.5 i GFP però es vol confirmar). Per comprovar si el resultat obtingut és el correcte, si els cardiomiòcits han expressat GFP, voldrà dir que aquests, es troben en estat de progenitor cardíac. Reflexionant sobre l'objectiu establert, ens plantejem les següents preguntes per tal que al final de l'experiment acabem obtenint uns resultats i unes conclusions: Quan els cardiomiòcits estan en estat de progenitor cardíac expressen GFP? En cas de que sigui cert, en aquest cas serien bons marcadors d'aquest estat? Tenint els objectius i les preguntes com a referència em plantejaré dues hipòtesis. La primera seria: Potser quan els cardiomiòcits estan en estat de progenitor cardíac no expressen GFP (Green Fluorescent Protein) i per tant no serien bons marcadors cardíacs d'aquest estat. D'altra banda, la segona hipòtesi, seria: Potser si els cardiomiòcits expressen GFP no és indicador de que estiguin en estat de progenitors cardíacs. Ara bé, tot això es podrà dur a terme sempre i quan es tinguin en compte les variables que hi influeixen, entre elles, la dependent (cèl·lules amb pluripotència –línia cèl·lular transgènica i no transgènica- i els progenitors cardíacs) i la independent (GFP). A més a més d'aquests dos tipus de variables, també hi ha les que es poden controlar que en aquest cas inclourien: la temperatura, la llum, l'aire en el qual estan envoltades les cèl·lules i finalment de l'esterilització del material que s'utilitza.

- Disseny Experimental:

- Cèl·lules en cultiu en placa amb coating de matrigel que necessito:



*(Mirar *Annex* per saber el material necessari en general)

- Procediment:

Dia 2 AGGREWELL (3 pouets / 2 Transgènics + 1 No Transgènic - 1h 30min, dies 26/05/2013, 01/06/2013 i 05/06/2013)

Material utilitzat:

- 2 plaques de 10 de KiPS 3F.7 Nkx2.5 GFP Neo #2 sobre Matrigel.
- 1 placa de 10 de KiPS 3F.7 (control no transgènic) sobre Matrigel.
- 1 placa AGGREWELL (3 pouets).
- Centrífuga.
- 4 tubs de 50 ml.
- 2 Cell Strainer 37-40µm.
- Cambra de Neubauer.
- p1000 i puntes p1000.
- p200 i puntes p200.
- p20 i puntes p20.
- 40 ml KO-DMEM.
- 28 ml cHES + ROCK Inhibitor (10µM).
- 5 ml ACCUTASE.
- 4 ml H₂O estèril.

Protocol:

Dia 2 (Aggrewell 3 pouets – 1:30h)

Primer de tot, abans d'iniciar el protocol, es canvia el medi de les cèl·lules (10 ml de cHES + ROCK Inhibitor per placa de 10 sobre Matrigel).

1. Tot seguit es prepara la placa d' AGGREWELL de 4 pouets. Per aquest procediment es tardarà aproximadament uns 15 min.

1.1 Com que els pouets que s'utilitzaran en un altre moment ja han estat utilitzats, per assegurar que estan nets afegim 0'5ml d'H₂O estèril, i es centrifuga a 2000 xg durant 5 minuts i finalment s' aspira.

1.2 Seguidament s'afegeix 2ml de KO-DMEM per cada pouet.



- 1.3 S'aspira el medi.
- 1.4 S'afegeix 0'5ml cHES + ROCK Inhibitor per pouet.
- 1.5 Es centrifuga a 2000xg durant 5 minuts.
- 1.6 Finalment es mira amb el microscopi que no quedin bombolles.

2. Seguidament es preparen les cèl·lules en dos plaques de 10, pel que es tardarà aproximadament una hora.

- 2.1 S'aspira el medi.
- 2.2 Es renta cada placa de 10 amb 2ml de KO-DMEM.
- 2.3 S'aspira.
- 2.4 S'afegeix 2'5ml d'ACCUTASE per cada placa de 10 i es deixa incubar a 37°C entre 5 i 10 minuts.
- 2.5 Resuspendre 2 o 3 vegades amb p1000 perquè les cèl·lules, entre elles, es desenganxin.
- 2.6 Es recullen les cèl·lules amb ACCUTASE en un tub de 50ml (un tub per les Nkx2.5 i un altre per a les KiPS 3F.7).
- 2.7 Es renta cada placa de 10 amb 15ml de KO-DMEM i es recull tot en el mateix tub (un tub per les Nkx2.5 i un altre per a les KiPS 3F.7).
- 2.8 Es passa la suspensió per Cell Strainer en un altre tub nou de 50ml (un tub per les Nkx2.5 i un altre per a les KiPS 3F.7).
- 2.9 Centrifugar a 300xg durant 5 minuts RT.
- 2.10 Aspirar sobrenedant.
- 2.11 Afegir 1ml de cHES + ROCK Inhibitor per resuspendre.
- 2.12 Contar les cèl·lules de cada una de les dues mostres diferents, a partir d'una dilució 1:10 (10µm mostra + 90µm medi) utilitzant la següent fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ cells per ml} = \text{Fact. Dil. (10)} \times \text{mitja de 4 quadradets } [(x1+x2+x3+x4)/4] \times \text{fact dil. Neubauer (10000)}$$

Nkx2.5=> 3.941x10⁶ cells/ml

KiPS3F.7=> 1.612x10⁶ cells/ml

- 2.13 Afegir 1'4 – 1'4x10⁶ cèl·lules per pouet AGGREWELL.

$$? \text{ ul per pouet AGGREWELL} = (1000\text{ul} \times 1,3 \times 10^6 \text{ cells}) / \text{resultat de contar cells en cells/ml}$$



Nkx2.5=> 355ul

KiPS3F.7=> 875ul

Nkx2.5

1r contactge: $3'625 \cdot 10^6$ cèl·lules / ml.

2n contactge: $4'262 \cdot 10^6$ cèl·lules / ml.

Mitja: $3'941 \cdot 10^6$ cèl·lules / ml.

Control no transgènic

1r contactge: $1'3 \cdot 10^6$ cèl·lules / ml.

2n contactge: $1'925 \cdot 10^6$ cèl·lules / ml.

Mitja: $1'612 \cdot 10^6$ cèl·lules / ml.

Es necessiten 875 µl per pouet d' AGGREWELL.

3. A continuació es durà a terme l' agregació forçada que durarà aproximadament uns 10 minuts.

- 3.1 Afegir 2000µl – (875µl de suspensió cel·lular per pouet d' AGGREWELL) de cHES + ROCK Inhibitor.
- 3.2 Afegir 875µl de suspensió cel·lular per cada pouet d' AGGREWELL.
- 3.3 Resuspendre suaument per repartir les cèl·lules uniformement.
- 3.4 Centrifugar 100xg durant 5 minuts.
- 3.5 Mirar amb el microscopi que s'hagin distribuït homogèniament.
- 3.6 Incubar 24h a 37°C, 5% CO₂ i 95% humitat.

Dia 2 (Preparació del coatings per la sembra – 10 min.)

Material utilitzat:

- 36 ml de gelatina.
- 2 ml de matrigel.
- 6 plaques de 12 WP.
- 2 cubres.



Protocol:

Per a la preparació dels Coatings es posarà un cubre a dos dels pouets i tot seguit s'hi afegirà 0'5ml de Matrigel per cada pouet de les 5 plaques de Nkx2.5 més 4 pouets de les no transgèniques. Seguidament es deixarà Over Night (ON) a la nevera a 4°C. D'altra banda en el coating restant s'hi posarà 1ml de Gelatina per cada pouet i es deixarà a 37°C durant 3 o 4 hores.

Dia 1 (AGGREWELL – 2h / els dies 27/05/2013, 02/06/2013 i 06/06/2013)

Material utilitzat:

- 4 plaques de 6 cm de diàmetre per suspensió.
- p1000 i puntes p1000.
- Lupa.
- 2 tubs de 50ml.
- 60 – 70 ml de KO-DMEM.

Protocol:

- ◆ Primer de tot mirar amb el microscopi que s'hagin format EBs.
- ◆ Tot seguit recollir els EBs sota la lupa aspirant amb la p1000.
- ◆ Recuperar tots els EBs possibles rentant cada pouet amb ≈10 ml KO-DMEM.
- ◆ Recollir tot en un tub de 50 ml i deixar que els EBs baixin al fons.
- ◆ Passar els EBs a una placa de 6 cm NOT TREATED per suspensió amb 5 ml de KO-DMEM per cada pouet d' AGGREWELL.

Dia 1 (Sembra – 2h)

Material utilitzat:

- 6 plaques de 12 WP amb el coating fet d'ahir reservades a la nevera.
- Lupa.
- p1000 i puntes p1000.
- 64 ml EBm.

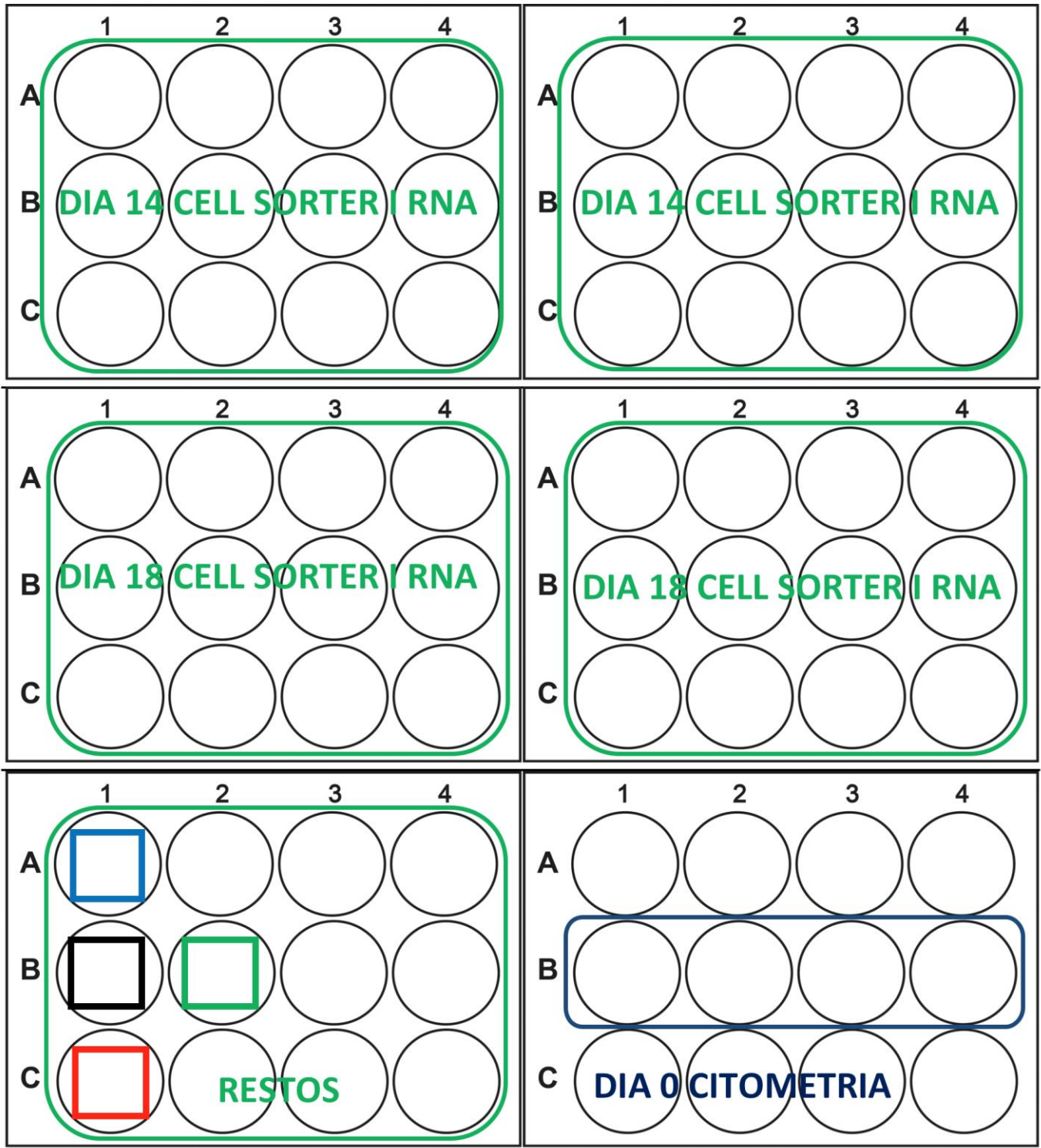


Protocol:

- ◆ Un cop el medi estigui temperat aspirar el matrigel de cada pouet i hi afegir 1ml de medi EBm + AA.
- ◆ Tot seguit, deixar les plaques a la incubadora de normòxia mentre no s'utilitzin.
- ◆ Sota la lupa i amb la p1000 anar comptant 60 EBs per sembrar a cada pouet de les 5 plaques de 12 WP (≈3600 EBs) + 4 pouets de les KiPS no transgèniques a la 6a placa.
- ◆ Tot seguit fer un moviment circular per centrar els EBs de la placa abans i després de deixar a la incubadora.
- ◆ Finalment posar-ho a incubar 24 hores a 37°C, 5% CO₂ i 95% d'humitat.

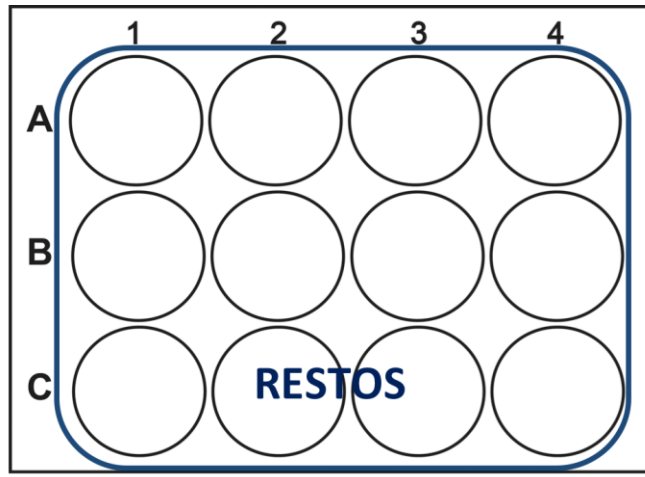


<p>1 2 3 4</p> <p>A </p> <p>B DIA 0 CITÒMETRE I RNA</p> <p>C </p>	<p>1 2 3 4</p> <p>A </p> <p>B DIA 6 CITÒMETRE I RNA</p> <p>C </p>
<p>1 2 3 4</p> <p>A </p> <p>B DIA 8 CITÒMETRE I RNA</p> <p>C </p>	<p>1 2 3 4</p> <p>A </p> <p>B DIA 10 CITÒMETRE I RNA</p> <p>C </p>
<p>1 2 3 4</p> <p>A </p> <p>B </p> <p>C DIA 23 CITÒMETRE PER SIRPA I RNA</p>	<p>1 2 3 4</p> <p>A </p> <p>B DIA 13 CITÒMETRE I RNA</p> <p>C </p>





<table border="1"><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td></tr><tr><td>A</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>B</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>C</td><td colspan="4">DIA 6 CITOMETRIA</td></tr></table>		1	2	3	4	A	○	○	○	○	B	○	○	○	○	C	DIA 6 CITOMETRIA				<table border="1"><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td></tr><tr><td>A</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>B</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>C</td><td colspan="4">DIA 8 CITOMETRIA</td></tr></table>		1	2	3	4	A	○	○	○	○	B	○	○	○	○	C	DIA 8 CITOMETRIA			
	1	2	3	4																																					
A	○	○	○	○																																					
B	○	○	○	○																																					
C	DIA 6 CITOMETRIA																																								
	1	2	3	4																																					
A	○	○	○	○																																					
B	○	○	○	○																																					
C	DIA 8 CITOMETRIA																																								
<table border="1"><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td></tr><tr><td>A</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>B</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>C</td><td colspan="4">DIA 10 CITOMETRIA</td></tr></table>		1	2	3	4	A	○	○	○	○	B	○	○	○	○	C	DIA 10 CITOMETRIA				<table border="1"><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td></tr><tr><td>A</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>B</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>C</td><td colspan="4">DIA 13 CITOMETRIA</td></tr></table>		1	2	3	4	A	○	○	○	○	B	○	○	○	○	C	DIA 13 CITOMETRIA			
	1	2	3	4																																					
A	○	○	○	○																																					
B	○	○	○	○																																					
C	DIA 10 CITOMETRIA																																								
	1	2	3	4																																					
A	○	○	○	○																																					
B	○	○	○	○																																					
C	DIA 13 CITOMETRIA																																								
<table border="1"><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td></tr><tr><td>A</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>B</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>C</td><td colspan="4">DIA 14 CELL SORTER</td></tr></table>		1	2	3	4	A	○	○	○	○	B	○	○	○	○	C	DIA 14 CELL SORTER				<table border="1"><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td></tr><tr><td>A</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>B</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr><tr><td>C</td><td colspan="4">DIA 18 CELL SORTER</td></tr></table>		1	2	3	4	A	○	○	○	○	B	○	○	○	○	C	DIA 18 CELL SORTER			
	1	2	3	4																																					
A	○	○	○	○																																					
B	○	○	○	○																																					
C	DIA 14 CELL SORTER																																								
	1	2	3	4																																					
A	○	○	○	○																																					
B	○	○	○	○																																					
C	DIA 18 CELL SORTER																																								



Dia 0 (inici diferenciació amb EBm+AA - 15 min. / dies 28/05/2013, 03/06/2013 i 07/06/2013)

Material utilitzat:

- 64 ml EBm + AA.

Protocol:

- ◆ Aspirar el medi del dia anterior EBm amb compte i afegir 1 ml d' EBm + AA per a cada pouet.
- ◆ S'haurà de canviar el medi cada dimarts i divendres.

Dia 6 i Dia 0 (pellet per extracció RNA i citòmetre ≈ 30 – 45min. / Dia 03/06/2013)

Material utilitzat:

- p1000 i puntes p1000.
- 1ml de TRIzol (500µl per pellet).
- 1ml de PBS (1ml x pouet + 0'5ml per tubet).
- 21ml PBS + 10% FBS (1'5ml x pouet).
- 0'5ml de TRIPSINA (0'25 x pouet).
- Tubets.
- 0'1ml de Iodur de propidi.
- Nkx2.5 #2 EBs sembrats i a dia 0.



- KiPS 3F.7 no transgèniques EBs sembrats i a dia 0 de diferenciació (control - GFP).
- Nkx2.5 #2 EBs sembrats i a dia 6 de diferenciació.
- KiPS 3F.7 no transgèniques EBs sembrats i a dia 0 de diferenciació (control – GFP).

Protocol:

- ◆ Primer de tot fer dos rentats amb PBS.
- ◆ Tot seguit deixar-ho entre 5 i 10 minuts amb tripsina al 0'25% a 37°C.
- ◆ Seguidament es passa a un eppendorf.
- ◆ A continuació : inhibir la tripsina i acabar de rentar el pouet amb PBS + FBS (10%) i omplir fins a 1500 µl, passar-ho al tubet:
 - Nkx2.5
 - Dia 6: 1 tub per RNA i un altre per el citòmetre.
 - Dia 0: 1 tub per RNA i un altre per el citòmetre.
 - No transgèniques
 - Dia 4: un tub per a citòmetre.
 - Dia 0: 1 tub per a citòmetre.
- ◆ Pipetejar amb la p1000 fins aconseguir desfer tot el gromullet.
- ◆ Centrifugar 5 minuts a 1200 – 2000rpm.
- ◆ Tot seguit aspirar sobrenedant (amb p200 o p1000 posant-lo en un tub de 15 50ml (un tub de waste per a cada mostra).
 - Mostres per citòmetre: Afegim 500µl PBS + 10% FBS.
 - Mostra per RNA: Afegir 1ml de TRIzol, resuspendre i congelar a -80°C.
- ◆ Anar al citòmetre.

Dia 6 (inici de diferenciació del segon aggrewell)

Dia 8 (pellet per extracció d'RNA i citòmetre del dia 8 ≈ 30 – 45 min / Dia 05/06/2013)

Material utilitzat:

- p1000 i puntes p1000.
- 1ml de TRIzol.



- 1ml de PBS (1ml x pouet).
- 2ml PBS + 10% FBS (x cada pouet).
- 0'5ml Tripsina (0'25ml x pouet).
- Tubets.
- 0'1ml de Iodur de propidi.
- KiPS 3F.7 no transgèniques EBs sembrats i a dia 8 de diferenciació (control – GFP).
- Nkx2.5 EBs sembrats i a dia 8 de diferenciació.

Protocol:

- ◆ Primer de tot fer 2 rentats amb PBS.
- ◆ Seguidament deixar la mostra entre 5 i 10 minuts amb tripsina 0'25% a 37°C.
- ◆ A continuació passar-ho a un eppendorf.
- ◆ Inhibir la tripsina i acabar de rentar el pouet amb PBS + FBS (10%). Omplir fins a 1500µl i passar-ho al tubet.
 - Dia 8: 1 tub per RNA i un altre per citòmetre.
- ◆ Tot seguit pipetejar amb la p1000 fins a desfer tot el gromullet.
- ◆ Centrifugar-ho 5 minuts a 1200 – 2000rpm.
- ◆ A continuació aspirar sobrenedant (amb p200 o p1000 posant-lo en un tub de 15 o 50ml).
 - Mostres per el citòmetre: Afegir 500µl PBS + 10% FBS.
 - Mostres per RNA: Afegir 1ml de TRIzol, resuspendre i congelar a -80°C.
- ◆ Afegir 500µl PBS + 10% FBS.
- ◆ Finalment ja es pot anar al citòmetre.

Dia 10 (pellet per extracció RNA i citòmetre de dia 10 ≈ 30 - 45 min. / Dia 07/06/2013)

Material utilitzat:

- p1000 i puntes p1000.
- 1ml PBS.
- 2ml PBS + 10% FBS.
- 1ml de TRIzol.



- 0'5ml Tripsina.
- 0'1ml Iodur de propidi.
- KiPS 3F.7 no transgèniques EBs sembrats i a dia 0, 2a diferenciació (control - GFP).
- Nkx 2.5 EBs sembrats i a dia 0, 2a diferenciació.
- KiPS 3F.7 no transgèniques EBs sembrats i a dia 10 diferenciació (control - GFP).
- Nkx 2.5 EBs sembrats i a dia 10 diferenciació.

Protocol:

- ◆ Primer de tot fer 2 rentats amb PBS.
- ◆ Seguidament deixar la mostra entre 5 i 10 minuts amb tripsina 0'25% a 37°C.
- ◆ A continuació passar-ho a un eppendorf.
- ◆ Inhibir la tripsina i acabar de rentar el pouet amb PBS + FBS (10%). Omplir fins a 1500µl i ho passar-ho al tubet.
- ◆ Tot seguit pipetejar amb la p1000 fins a desfer tot el gromullet.
- ◆ Centrifugar-ho 5 minuts a 1200 – 2000rpm.
- ◆ A continuació aspirar sobrenedant (amb p200 o p1000 posant-lo en un tub de 15 o 50ml).
 - Mostres per el citòmetre: Afegir 500µl PBS + 10% FBS.
 - Mostres per RNA: Afegir 1ml de TRIzol, resuspendre i congelar a -80°C.
- ◆ Afegir 500µl PBS + 10% FBS.
- ◆ Finalment ja es pot anar al citòmetre.

Dia 13 (pellet per extracció RNA i citòmetre de dia 13 ≈2h / Dia 10/06/2013)

Material utilitzat.

- 6ml de col·lagenasa feta fresca.
- 8'5ml de PBS.
- 6ml de Solució 1.
- 1ml de TRIzol.
- p1000 i puntes p1000.



- 0'1ml de iodur de propidi.
- KiPS3F.7 no transgèniques EBs sembrats a dia 13 de diferenciació (control – GFP).
- Nkx2.5 EBs sembrats i a dia 13 de diferenciació.

Protocol:

- ◆ Primer de tot fer dos rentats amb PBS.
- ◆ Tot seguit afegir col·lagenasa (1'5ml x pouet 6WP) i incubar-ho 1h a 37°C.
- ◆ Pipetejar amb la p1000 fins a desfer tot el gromullet.
- ◆ Afegir (1'5ml x pouet 6WP) de solució 1 a cada pouet i acabar de disgregar.
- ◆ Passar cada pouet a un tub de 15ml ben rotulat (volum total dins de cada tub = 3ml).
- ◆ Centrifugar-ho 5 minuts a 1200 – 2000rpm.
- ◆ Aspirar sobrenedant (amb p200 o p1000 posant-lo en un tub de 15 o 50ml).
 - Mostres per el citòmetre: Afegir 500µl PBS + 10% FBS.
 - Mostra per RNA: Afegir 1ml de TRIzol, resuspendre i congelar a -80°C.
- ◆ Finalment anar al citòmetre amb iodur de propidi.

Dia 14 i 18 (cell sorter, dia de màxima expressió Nkx2.5 – 2h / Dia 21/06/2013)

Material utilitzat:

- 1ml de PBS x pouet.
- 2ml de PBS + 10% FBS x pouet.
- 0'5ml de tripsina (0'25ml x pouet).
- Tubets.
- KiPS 3F.7 no transgèniques EBs sembrats a dia 14 de diferenciació (control – GFP).
- Nkx2.5 EBs sembrats i a dia 14 de diferenciació.
- KiPS 3F.7 no transgèniques EBs sembrats a dia 18 de diferenciació (control- GFP).
- Nkx2.5 EBs sembrats i a dia 18 de diferenciació.



Protocol:

- ◆ Primer de tot fer dos rentats amb PBS.
- ◆ Deixar-ho entre 5 i 10 minuts amb tripsina a 0'25% a 37°C.
- ◆ Seguidament passar-ho a un eppendorf.
- ◆ Inhibir la tripsina i acabar de rentar el pouet amb PBS + FBS 10%. Omplir fins a 1500µl i passar-ho al tubet.
- ◆ Pipetejar amb la p1000 fins a desfer tot el gromullet.
- ◆ Tot seguit centrifugar-ho 5 minuts a 1200 – 2000rpm.
- ◆ Aspirar sobrenedant (amb p200 o p1000 posant-lo en un tub de 15 o 50ml).
- ◆ Afegir 5ml EBm + EDTA 3mM.
- ◆ A continuació contar les cèl·lules i afegir el medi i les cèl·lules suficients per passar pel cell sorter.
- ◆ Per acabar ja es podrà anar al Cell Sorter i tot seguit es guardarà el pellet a -20°C.

Extracció RNA (Dies 0, 6, 8, 10, 13, 14 Cell Sorter i 18 Cell Sorter – 1h 30min.)

Material utilitzat:

- Campana química.
- 0'9ml Cloroform (0'2ml x mostra i ml de TRIzol).
- 2'25ml Isopropanol 100% (0'5ml x ml de TRIzol).
- 0'45ml etanol 75% (0'1ml x ml de TRIzol).
- 270µl H₂O MilliQ autoclavada o RNase free (30µl x mostra).

Protocol:

- ◆ Aquesta part de l'experiment s'haurà de dur a terme a la campana química ja que el TRIzol és molt tòxic.

1. Separació de fases (aproximadament 30 minuts).

- 1.1. Incubar a RT 5 minuts (permet la dissociació del complex de nucleoproteïnes).
- 1.2. Afegir 0'2ml de cloroform per cada ml de TRIzol.
- 1.3. Tot seguit agitar manualment amb energia durant 15 segons.



- 1.4. Incubar a RT durant 2 o 3 minuts.
- 1.5. A continuació centrifugar-ho a 12000xg durant 15 minuts a 4°C.
- 1.6. Recuperar la fase aquosa superior, amb molt de compte de no tocar la interfase i passar-la a un altre eppendorf.
- 1.7. Si es vol recuperar DNA o proteïnes, guardem la fase orgànica vermella de fenol-cloroform i la interfase.

2. Procediment d'aïllament del RNA (anar amb precaució per evitar la contaminació de les RNAses).

2.1. Precipitació de l' RNA (30 minuts aproximadament).

- 2.1.1 Afegir 0'5ml per cada ml de TRIzol utilitzat de 0'5ml Isopropanol al 100% a la fase aquosa.
- 2.1.2 Incubar a RT durant 10 minuts a -20°C.
- 2.1.3 Centrifugar-ho a 12000xg durant 10 minuts a 4°C.

2.2. Rentat RNA (aproximadament 10 minuts).

- 2.2.1 Aspirar sobrenedant deixant només el pellet d' RNA.
- 2.2.2 Rentar el pellet amb 0'1ml d'etanol al 75% (diluït en H₂O MilliQ).
- 2.2.3 Resuspendre la mostra breument.
- 2.2.4 Centrifugar-ho a 12000xg (7500xg en protocol TRIzol) durant 5 minuts a 4°C (mentrestant encendre el Termoblock i posar-ho a 50°C).
- 2.2.5 Tot seguit aspirar sobrenedant.
- 2.2.6 Centrifugar-ho al buit o Vacuum centrifuge.
- 2.2.7 Deixar la tapa mig oberta durant 5 minuts aproximadament.

2.3. Resuspensió d'RNA.

- 2.3.1 Resuspendre amb la pipeta el pellet d'RNA en 30µl H₂O MilliQ autoclavada o Aigua RNAsa free.
- 2.3.2 Posar-ho a incubar al heat block durant 5 minuts a 50°C.



2.3.3 Procedir a la quantificació.

Quantificació RNA (Dies 0, 6, 8, 10, 13, 14CS, 18CS amb Nanodrop – 1h)

Material utilitzat:

- Nanodrop.
- P2 i puntes p10.
- Mostres.
- H₂O MilliQ (autoclavada).

Protocol:

Es vol aconseguir una concentració final de cada mostra de 1µg RNA.

- ◆ Primer de tot encendre l'ordinador.
- ◆ Obrir el programa ND-1000.
- ◆ A continuació clicar a Nucleic Acid.
- ◆ Netejar dues vegades amb 1µl H₂O MilliQ de la següent manera:
 - Posar 1µl H₂O MilliQ.
 - Posar 1µl H₂O MilliQ.
 - Assecar-ho amb paper.
 - Clicar a OK RNA 40✓.
- ◆ Per analitzar BLANC clicar a BLANK.
 - Posar 1µl H₂O MilliQ.
- ◆ Per analitzar les mostres clicar a MEASURE i et dona:
 - Abs 260/280 (Indica contaminació per proteïnes, s'accepta >1'8, òptim 2).
 - Abs 260/230 (Indica contaminació per solvents, s'accepta >1'6, òptim 2).
 - Concentració en ng/µl.
- ◆ Netejar entre mostra i mostra amb H₂O.
- ◆ Finalment omplir la taula per calcular el volum necessari per a tenir 1µg RNA per mostra (*Taula 3*).



Taula 3 Taula per calcular el volum per obtenir 1µg de RNA

Mostra	[RNA] ng/µl	260/280	260/230
T D0(1)	61,1	1,86	0,13
T D0(2)	129,5	1,78	0,34
T D6	53,8	1,87	0,11
T D8	61,5	1,74	0,13
T D10	56,3	1,85	0,15
T D13	19,8	1,84	0,06
NT D14	258,2	1,88	1,92
T D14 ACS (Abans Cell Sorting – Es fa el mateix dia però sense sortejar les poblacions).	26,0	2,00	0,21
T D14 GFP - -	6,4	2,43	0,21
T D14 GFP + -	4,7	1,9	0,09
T D14 GFP + +	2,51	2,07	0,01
NT D18	47,4	1,86	1,04
T D18 ACS	64,8	1,9	0,87
T D18 GFP - -	4,8	2,45	0,2
T D18 GFP + -	5,2	2,03	0,9
T D18 GFP + +	5,0	1,58	0,87

Transcripció reversa (Dies 0,6,8,10,13,14CS i 18CS – 1h 30min.)

Material utilitzat:

- Mix A:
 - RNA 1µg (Idealment en aquest cas no s'hi arriba).
 - Random Hexamers 1µl.
 - dNTPs 1µl.
 - DEPC H₂O fins arribar a 10µl.
- Mix B:
 - 10X RT Buffer 2µl.
 - MgCl₂ 4µl.



- DDT 2 μ l.
 - Rnasa OUT 1 μ l.
 - SS III RT 1 μ l.
 - Total 10 μ l.
- Cada mostra de 1 μ g RNA (idealment en aquest cas no s'hi arriba).

Protocol:

- ◆ Per fer aquesta part de l'experiment, es treballarà sobre gel.
- ◆ Prèviament s'haurà d'encendre el Termoblock a 65°C.
- 1. Preparem el Mix A:
 - RNA x.
 - Random Hexamers 1 μ l.
 - dNTPs 1 μ l.
 - DEPC H₂O fins a arribar a 10 μ l.
- ◆ Tot seguit incubar el Mix A a 65°C durant 5 minuts i 1 minut al gel.
- ◆ Ajustar el Termoblock a 50°C.
- 2. Preparar el Mix B:
 - 10X RT Buffer 2 μ l.
 - MgCl₂ 4 μ l.
 - DDT 2 μ l.
 - Rnasa OUT 1 μ l.
 - SS III RT 1 μ l.
 - Total 10 μ l.
- ◆ Barrejar el Mix A + Mix B (total de 20 μ l) i fer un SPIN.
- ◆ Posar-ho a incubar durant 10 minuts a RT.
- ◆ Tot seguit incubar-ho 50 minuts a 50°C.
- ◆ A continuació incubar-ho durant 5 minuts a 85°C.
- ◆ Passar-ho al gel.
- ◆ Opcionalment es pot fer un SPIN i afegir 1 μ l de RNasa H i incubar 20 minuts a 37°C.
- ◆ Fer la RT-qPCR o guardar a -20°C (*Taula 4*).



Taula 4 Graella per saber el nombre de cèl·lules sortejades

Mostra	RNA al retrotranscriure	Cells sortejades	%
T D0(1)	158,4 ng		
T D0(2)	158,4 ng		
T D6	158,4 ng		
T D8	158,4 ng		
T D10	158,4ng		
T D13	158,4ng		
NT D14	51.6ng (258.2ng/ul x 0.2ul)		
T D14 ACS	52ng (26.0ng/ul x 2 ul)		
T D14 GFP - -	51.2ng (6.4ng/ul x 8ul)		
T D14 GFP + -	37.6ng (4.7ng/ul x 8ul)		
T D14 GFP + +	20 ng (2.5ng/ul x 8ul)		
NT D14 dil	20,08ng		
T D14 ACS dil	20,08ng		
T D14 GFP - - dil	20,08ng	48186	53.87%
T D14 GFP + - dil	20,08ng	37327	41.73%
T D14 GFP + + dil	20,08ng	3936	4.40%
NT D18	47.4 ng (47.4ng/ul x 1ul)		
T D18 ACS	64.8ng (64.8ng/ul x 1ul)		
T D18 GFP - -	38.4 ng (4.8ng/ul x 8ul)	8641	
T D18 GFP + -	41.6 ng (5.2ng/ul x 8ul)	10843	
T D18 GFP + +	40.0 ng (5.0ng/ul x 8ul)	4269	

RT-qPCR (Dies 0, 6, 8, 10, 14CS i 18CS)

Material utilitzat:

- SYBR Green.
- H₂O PCR.
- cDNA dies 0, 6, 8, 10, 13, 14CS i 18CS, diferenciació, control positiu (VHH).
- Primers per A:
 - Control:



- GAP DH.
- Marcadors cardíacs:
 - Nanog.
 - Bry.
 - Isl1.
 - Nkx2.5.
 - Tbx5.
 - cTnT.
 - Mlc2a.
- És una bona línia reporter?
 - GFP.
 - Nkx2.5.

Protocol:

- ◆ Primera RT-qPCR: GFP – Nkx2.5

	NT14	14- -	14+ -	14+ +	14ACS	NT18	18- -	18+ -	18+ +	18ACS		
												GAPDH
												GAPDH
												GFP
												GFP
												Nkx2.5
												Nkx2.5

- ◆ Segona RT-qPCR: Marcadors Cardíacs.

D0(2)	D0(2)	D6	D6	D8	D8	D10	D10	D13	D13	VHH	VHH	
												Nanog
												Bry
												Isl1
												Nkx2.5
												Tbx5
												cTnT
												Mlc2a
												GAPDH



- ◆ Tercera RT-qPCR : GFP – Nkx2.5 (repetició).

GAPDH	GAPDH	GAPDH	GFP	GFP	GFP	Nkx2.5	Nkx2.5	Nkx2.5				
												NT14
												14- -
												14+ -
												14 + +
												14ACS
												D0(1)

- ◆ Per a cada mostra es necessita:
 - SYBR Green 6 µl.
 - cDNA 0'6 µl .
 - Primer forward 0'6 µl.
 - Primer reverse 0'6 µl.
 - H₂O per PCR 4'2 µl.
 - Total 12 µl.
- ◆ Fer el MATER MIX per a cada primer (multiplicar x nombre de mostres + 1).
 - SYBR Green 6 µl.
 - Primer forward 0'6 µl.
 - Primer reverse 0'6 µl.
 - H₂O per PCR 4'2 µl.
 - Total 11'4 µl.
- ◆ Afegir els 0'6 µl cDNA lo últim.
- ◆ Posar-ho al Termociclador.

Dia 35 (Immunofluorescència – 2h)

Material utilitzat:

- TBS.
- TBS + 0'1% TRITON.
- TBS + 3% Donkey Serum + 0'3% TRITON.
- Mounting medium.
- Anticossos primaris: Mouse IgG cTnT 1:200



- Anticossos secundaris: Donkey anti Mouse IgG Alexa 488 verd 1:200.

Protocol:

- ◆ Primer de tot rentar dues vegades amb TBS durant 5 minuts RT.
- ◆ A continuació rentar amb TBS + 0'1% TRITON durant 15 minuts RT.
- ◆ Bloquejar amb TBS + 3% Donkey Serum + 0'3% TRITON durant 2h RT.
- ◆ Tot seguit incubar l'anticòs primari durant 2h RT i ON a 4°C.
 - Mouse IgG cTnT (1:200).
- ◆ Seguidament fer tres rentats amb TBS + 0'1% TRITON durant 5 minuts.
- ◆ Bloquejar amb TBS + 3% Donkey Serum + 0'3% TRITON durant 2h RT.
 - Donkey anti Mouse IgG Alexa 488 verd (1:500).
- ◆ Fer 3 rentats amb TBS + 0'1% TRITON durant 10 – 15 minuts.
- ◆ Incubar amb DAPI 1:5000 en TBS + 3% Donkey Serum + 0'3% TRITON durant 15 minuts RT.
- ◆ A continuació fer 2 rentats amb TBS durant 15 minuts RT.
- ◆ Mounting.
- ◆ Finalment guardar les mostres a 4°C protegides de la llum.



EVOLUCIÓ DE LA DIFERENCIACIÓ DELS EBs A CARDIOMIÒCITS

Per tal de seguir l'evolució dels EBs en els pouets, hem assenyalat quatre pouets de cada placa d' Aggrewell. Un pouet de color vermell, un altre blau, un verd i l'últim de color negre. A continuació en podem apreciar l'evolució amb imatges fetes amb el microscopi. (*L'autora de totes les imatges fetes durant la diferenciació ha estat la Laia Gregori*).

Dia 0

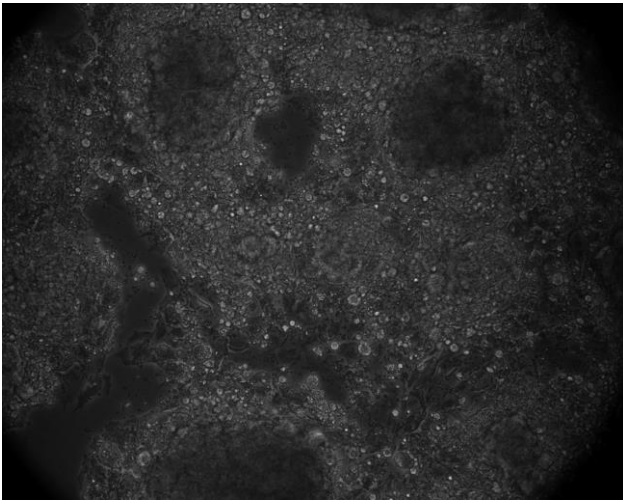


Figura 16 Blau 20x

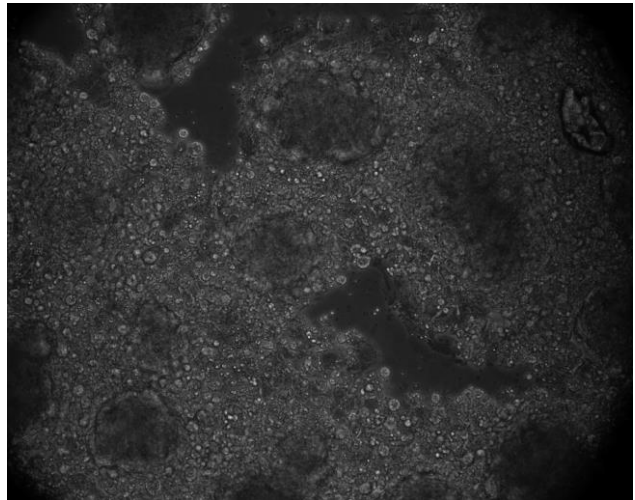


Figura 17 Negre 20x

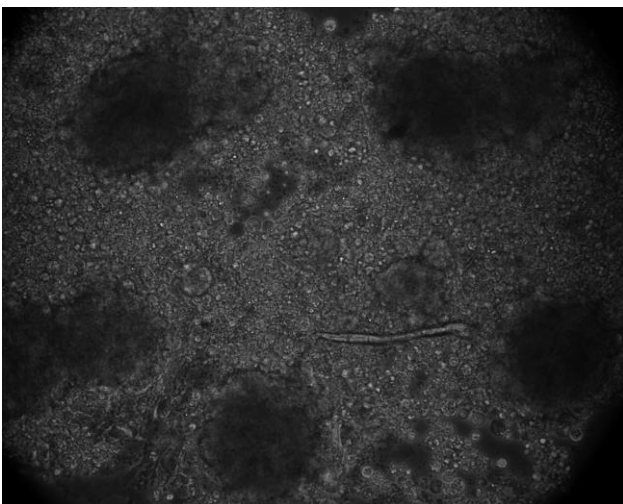


Figura 18 Verd 20x

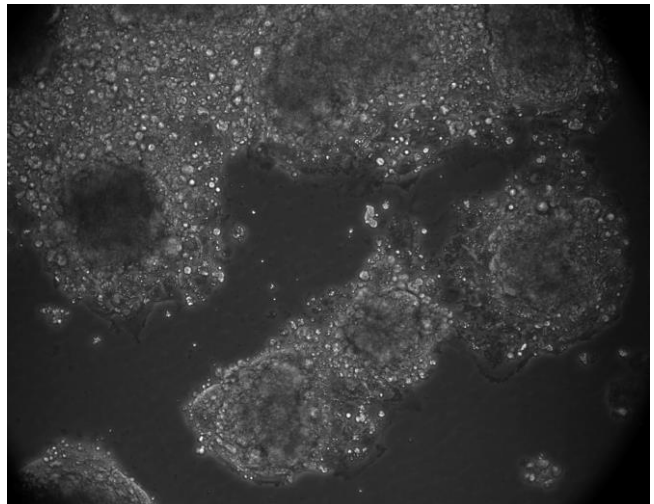


Figura 19 Vermell 20x



DIA 1

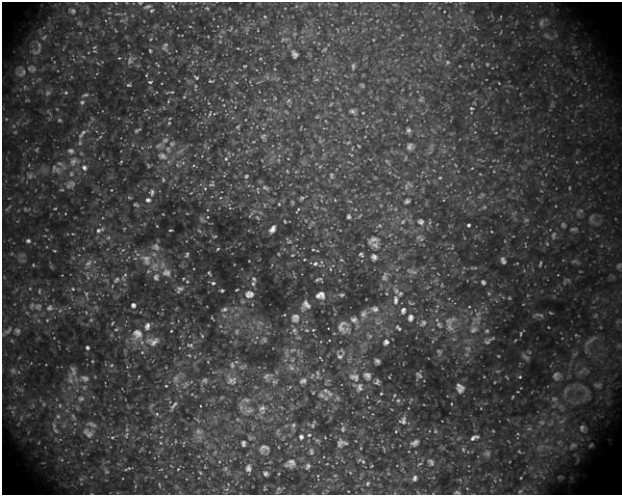


Figura 20 Blau 20x

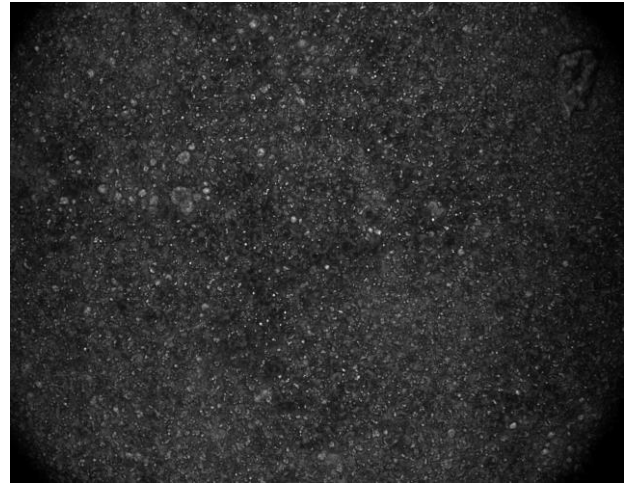


Figura 21 Negre 20x



Figura 22 Verd 20x

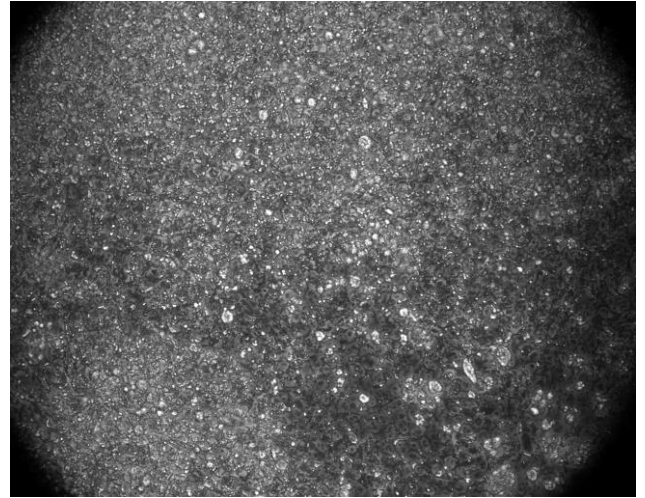


Figura 23 Vermell 20x



DIA 2

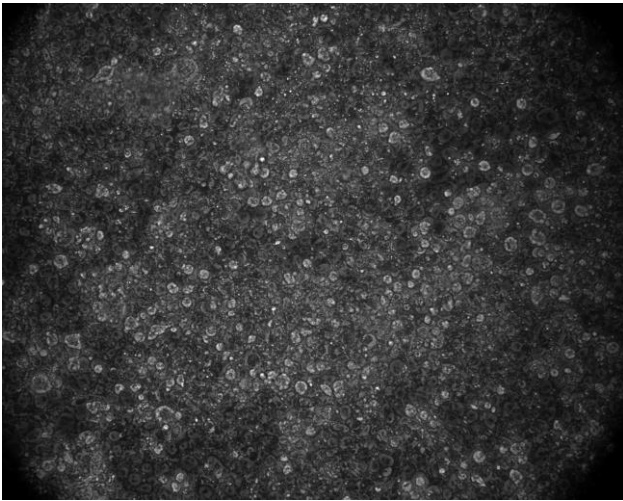


Figura 24 Blau 20x

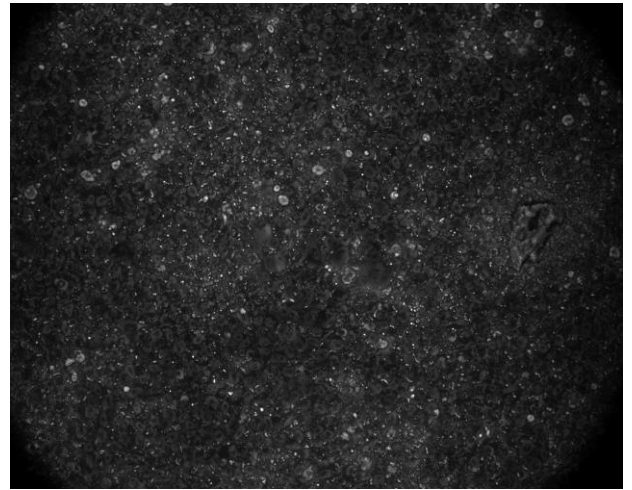


Figura 25 Negre 20x

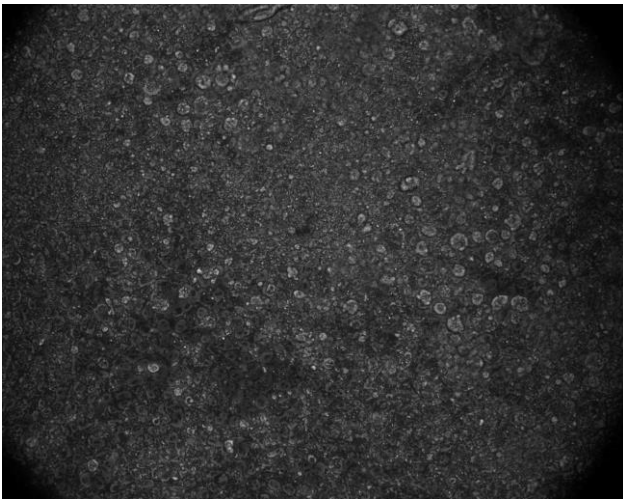


Figura 26 Verd 20x

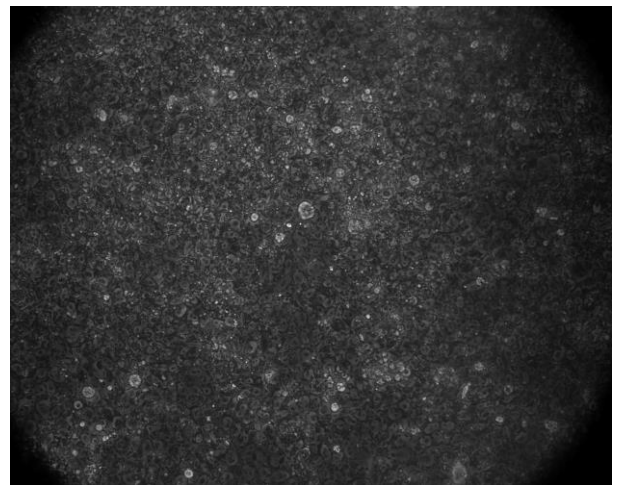


Figura 27 Vermell 20x



DIA 3

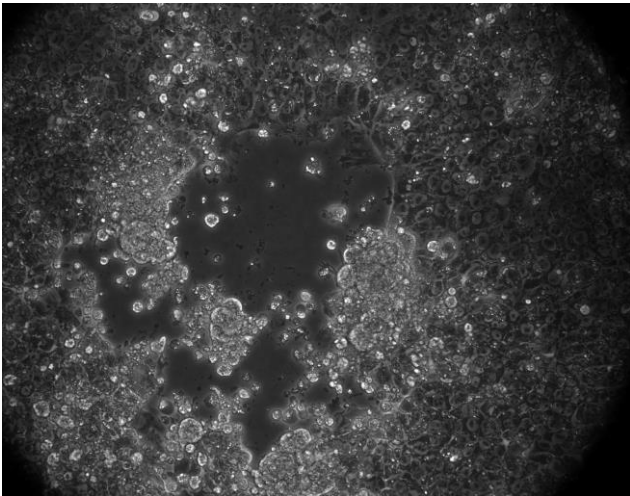


Figura 28 Blau 20x

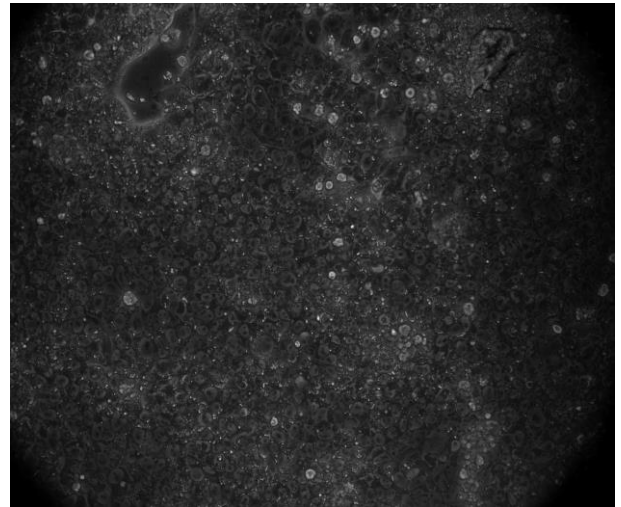


Figura 29 Negre 20x

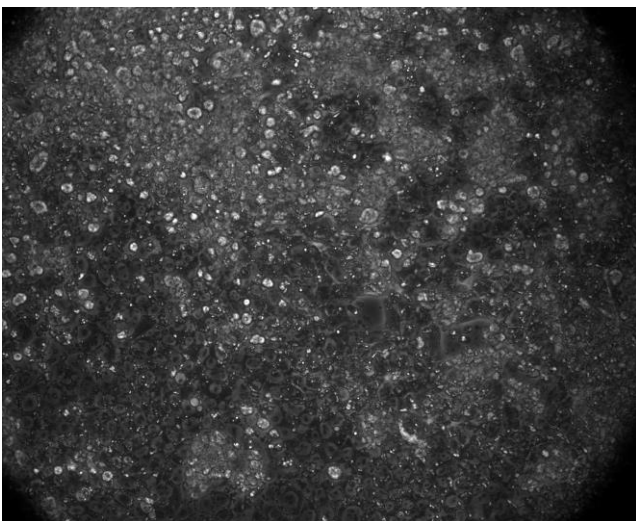


Figura 30 Verd 20x

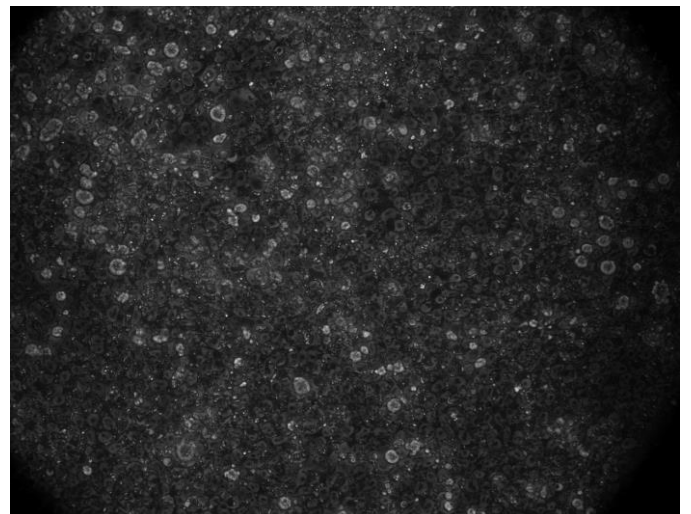


Figura 31 Vermell 20x



DIA 6

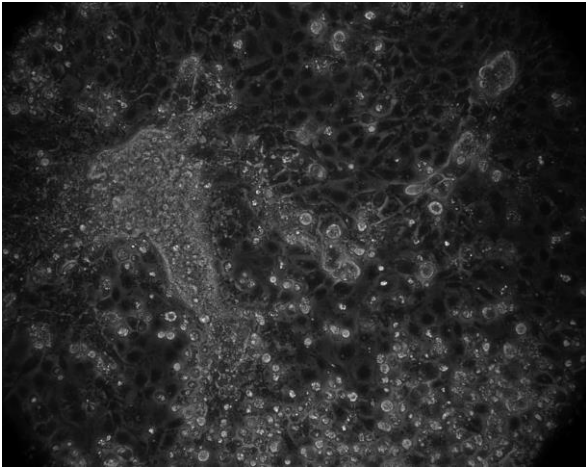


Figura 32 Blau 20x

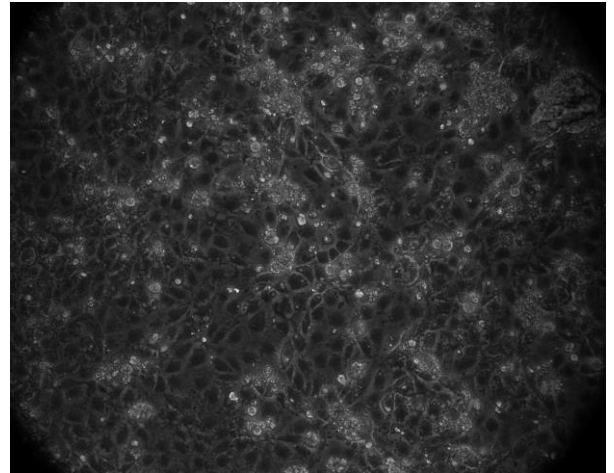


Figura 33 Negre 20x

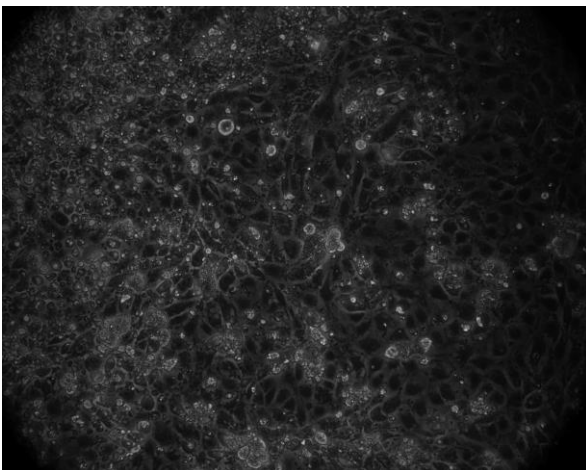


Figura 34 Verd 20x

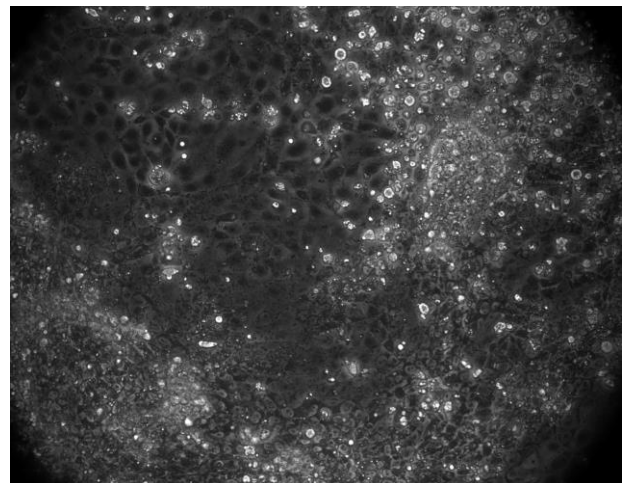


Figura 35 Vermell 20x



DIA 7

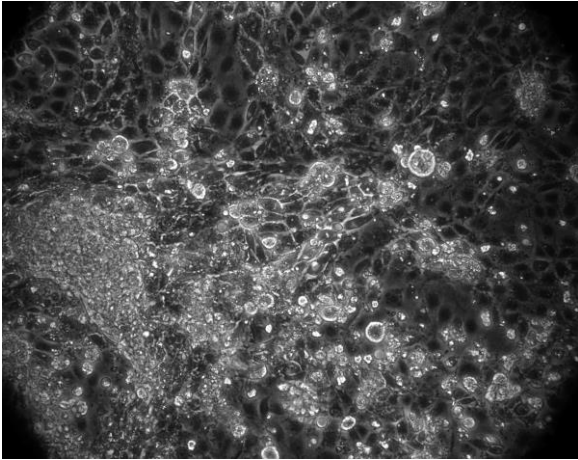


Figura 36 Blau 20x

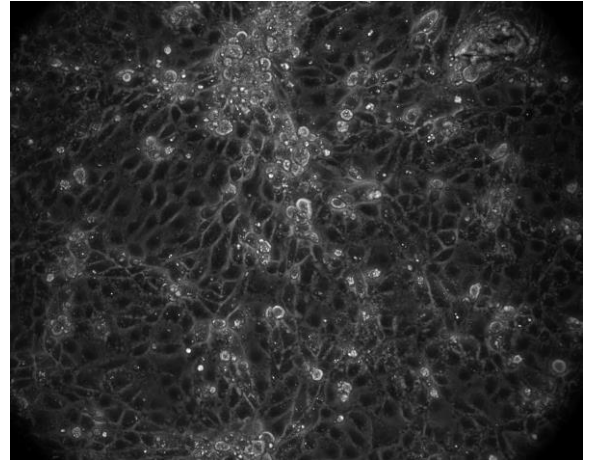


Figura 37 Negre 20x

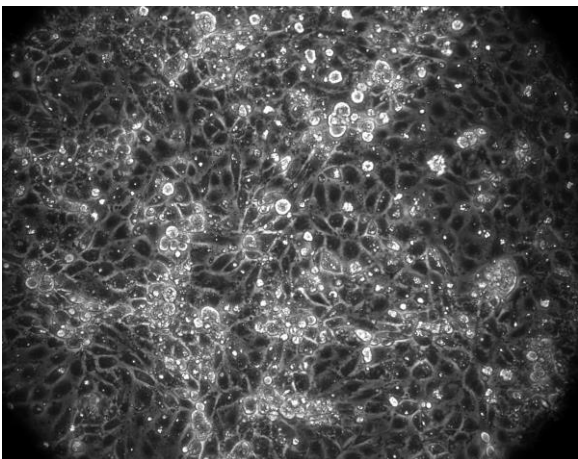


Figura 38 Verd 20x

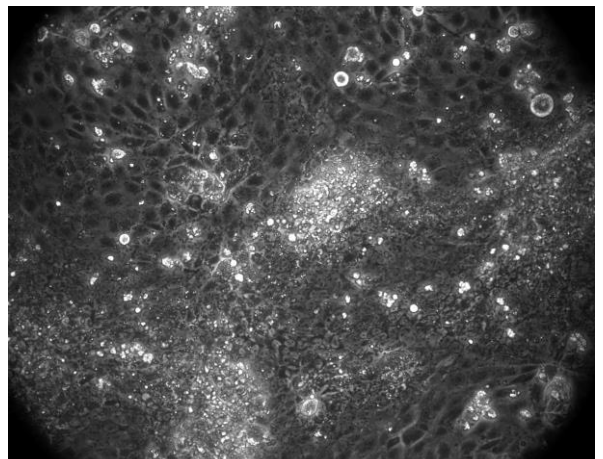


Figura 39 Vermell 20x



DIA 8

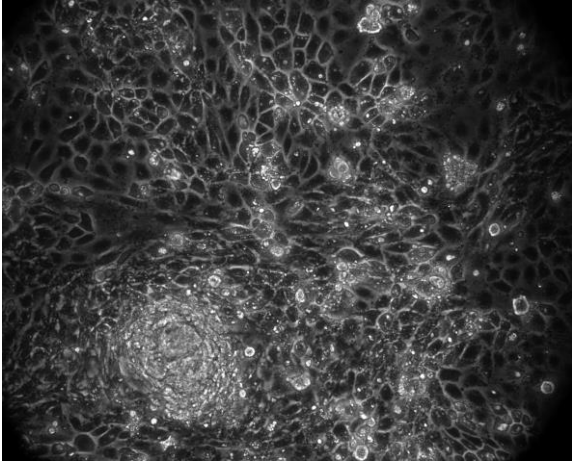


Figura 40 Blau 20x

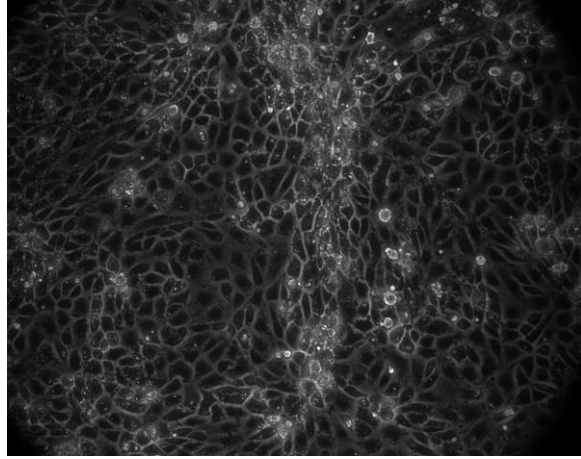


Figura 41 Negre 20x

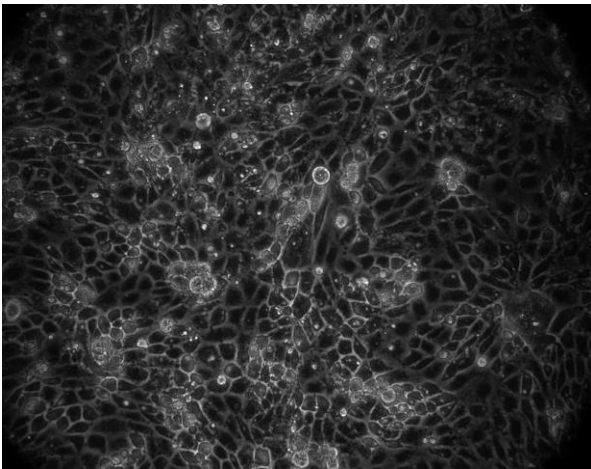


Figura 42 Verd 20x

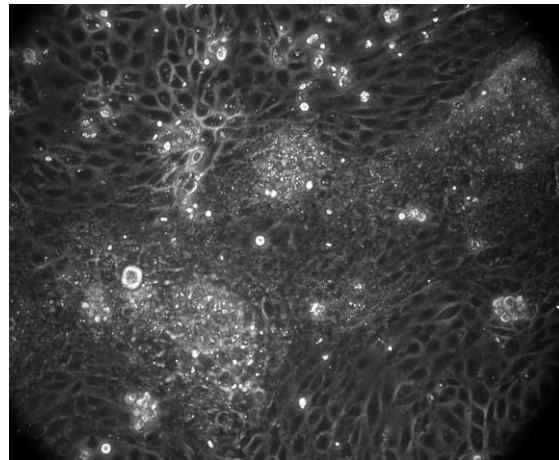


Figura 43 Vermell 20x



DIA 14

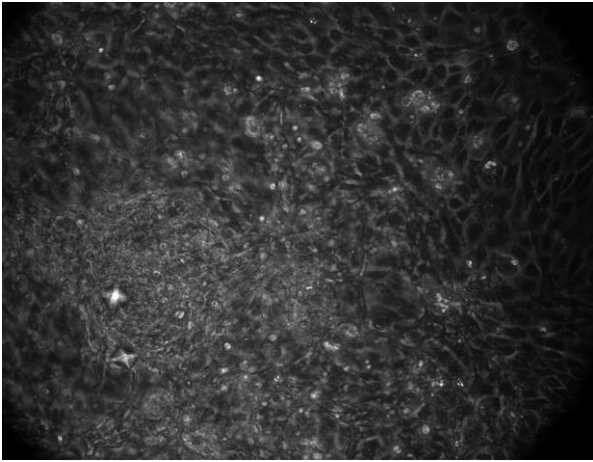


Figura 44 Blau 20x

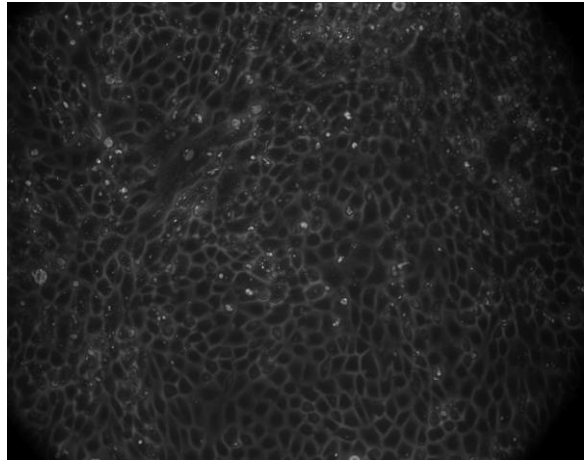


Figura 45 Negre 20x

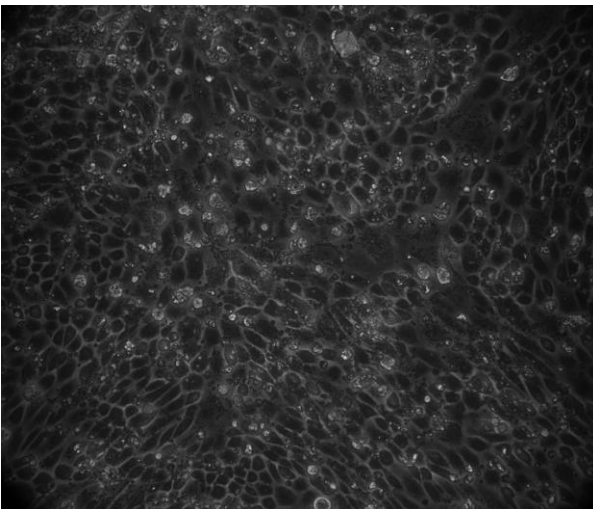


Figura 46 Verd 20x

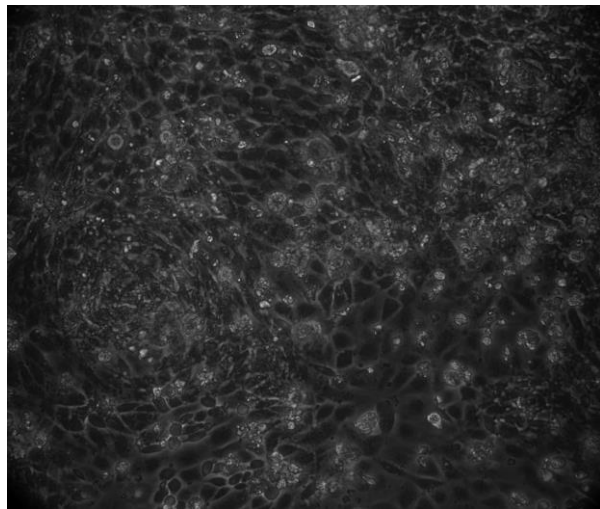
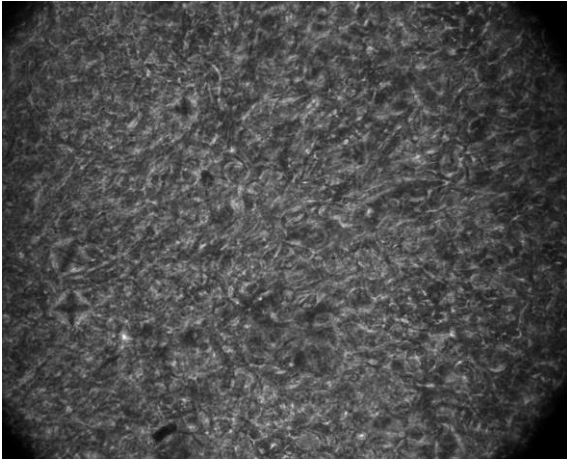
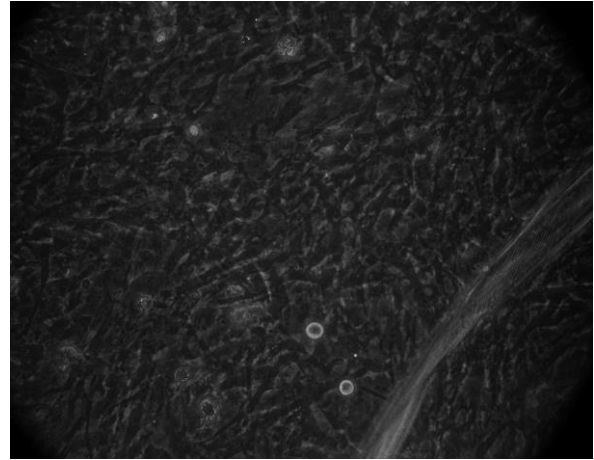
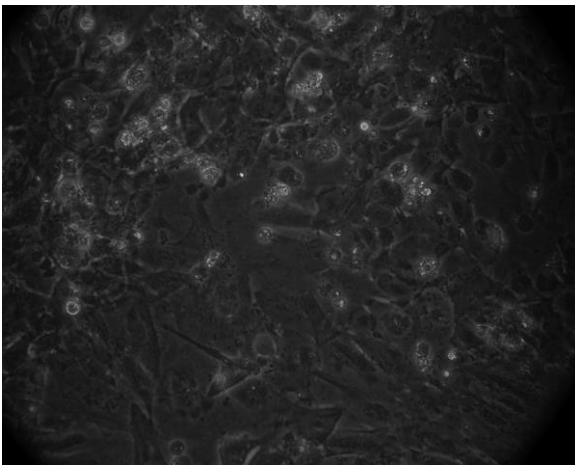
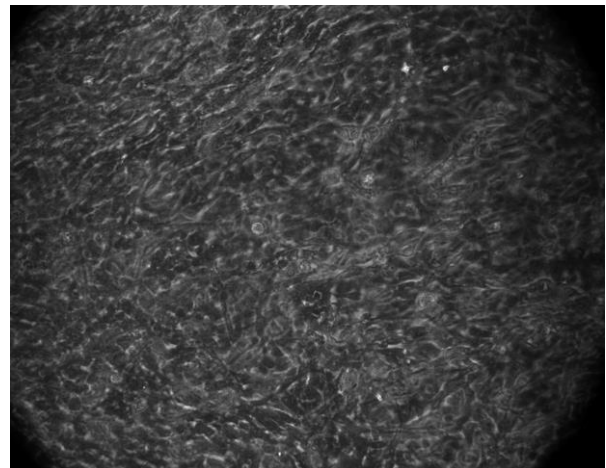


Figura 47 Vermell 20x

DIA 23**Figura 48** Blau 20x**Figura 49** Negre 20x**Figura 50** Verd 20x**Figura 51** Vermell 20x

Amb aquestes fotografies, podem observar que en un principi els EBs tenien una forma no gaire definida i molt irregular (*Fig.19*). A mesura que han anat passant els dies de diferenciació, els EBs s'han tornat més arrodonits i han definit més la seva estructura fins a convertir-se en cèl·lules del cor (cardiomiòcits, *Fig.51*).



RESULTATS I CONCLUSIONS

Resultats de diferenciació utilitzant Aggrewell (hem fet servir aquest protocol ja que és el més adequat per dur a terme l'experiment. Això és degut a que si s'utilitza Aggrewell, els EBs creixeran de forma controlable i tindran una estructura definida ja que es desenvoluparan en un espai concret –pouet-. D'altra banda si n s'utilitza l' Aggrewell, els EBs creixerien de forma incontrolable i la seva estructura no seria gens definida per el que podria comportar anomalies al final de la diferenciació i no acabar sent una bona cèl·lula), (Fig.54).

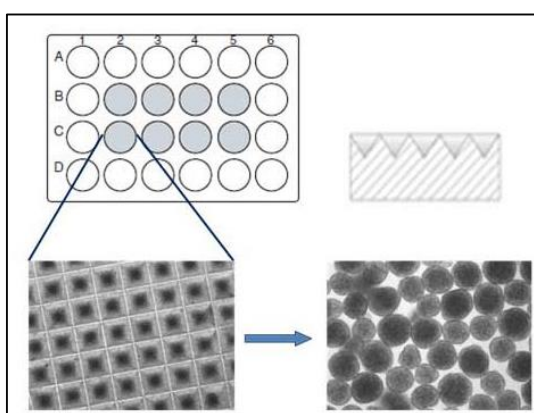


Figura 52 Aggrewell i formació EBs

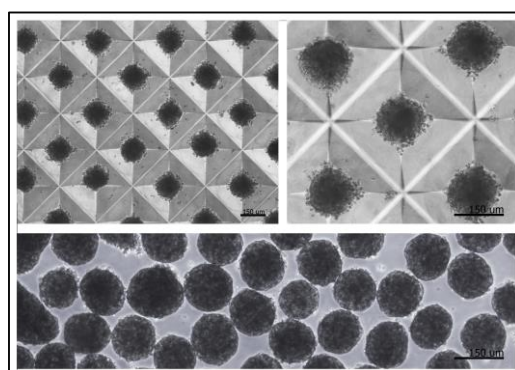


Figura 53 EBs en Aggrewell

- La mida dels EBs és homogènia, controlable i reproduïble.
- Sense suspensió, revestiment de gelatina i 60 EBs sembrats per pouet s'ha comprovat que són les millors condicions per seguir el protocol establert.

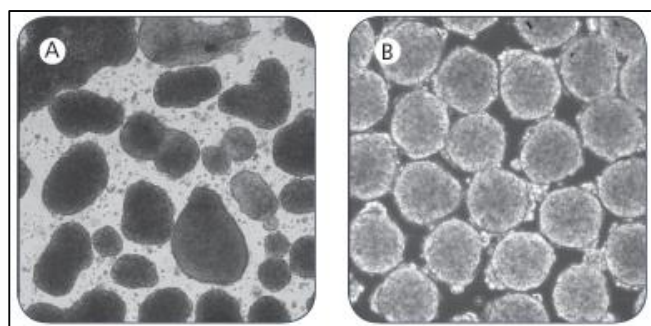


Figura 54 A) cultiu EBs sense pouet, B) Cultiu EBs dins del pouet



Resultats línia cel·lular KIPS3F.7Nkx2.5GFPNeo:

- Mostra un cariotip normal.
- Es diferencia en cèl·lules cardíques.
- Mostra una correlació significativa entre Nkx2.5 i l'expressió de GFP.
- Proporciona una forma d'enriquiment de cèl·lules progenitores cardíques.
- L'alta taxa de replicació podria portar l'adquisició d'anomalies cromosòmiques. Per analitzar la línia cel·lular, es va fer un anàlisi del seu cariotip. En aquest cas va mostrar-se normal (46, XX).
- La diferenciació es va poder seguir diàriament amb el microscopi invertit.
- Al final de l'experiment es va dur a terme una immunofluorescència per comprovar que la línia transgènica havia assolit la pluripotència en estat de cardiomiòcits.
- Quan es va fer la immunofluorescència es van detectar tres tipus de GFP: alta intensitat ++, mitja intensitat +- i baixa intensitat - - (*Fig.55*).

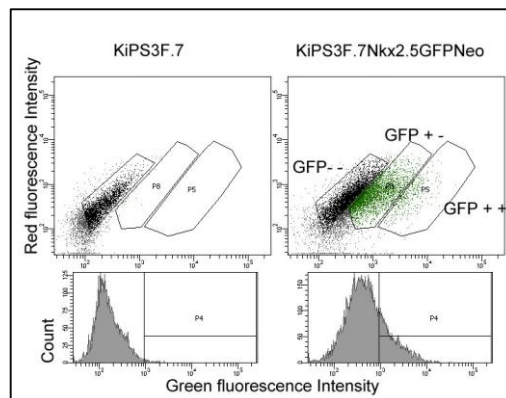


Figura 55 Diferents intensitats de GFP

- El nivell dels dos gens (GFP i Nkx2.5) es va mesurar mitjançant la RT-qPCR.

Resultats finals:

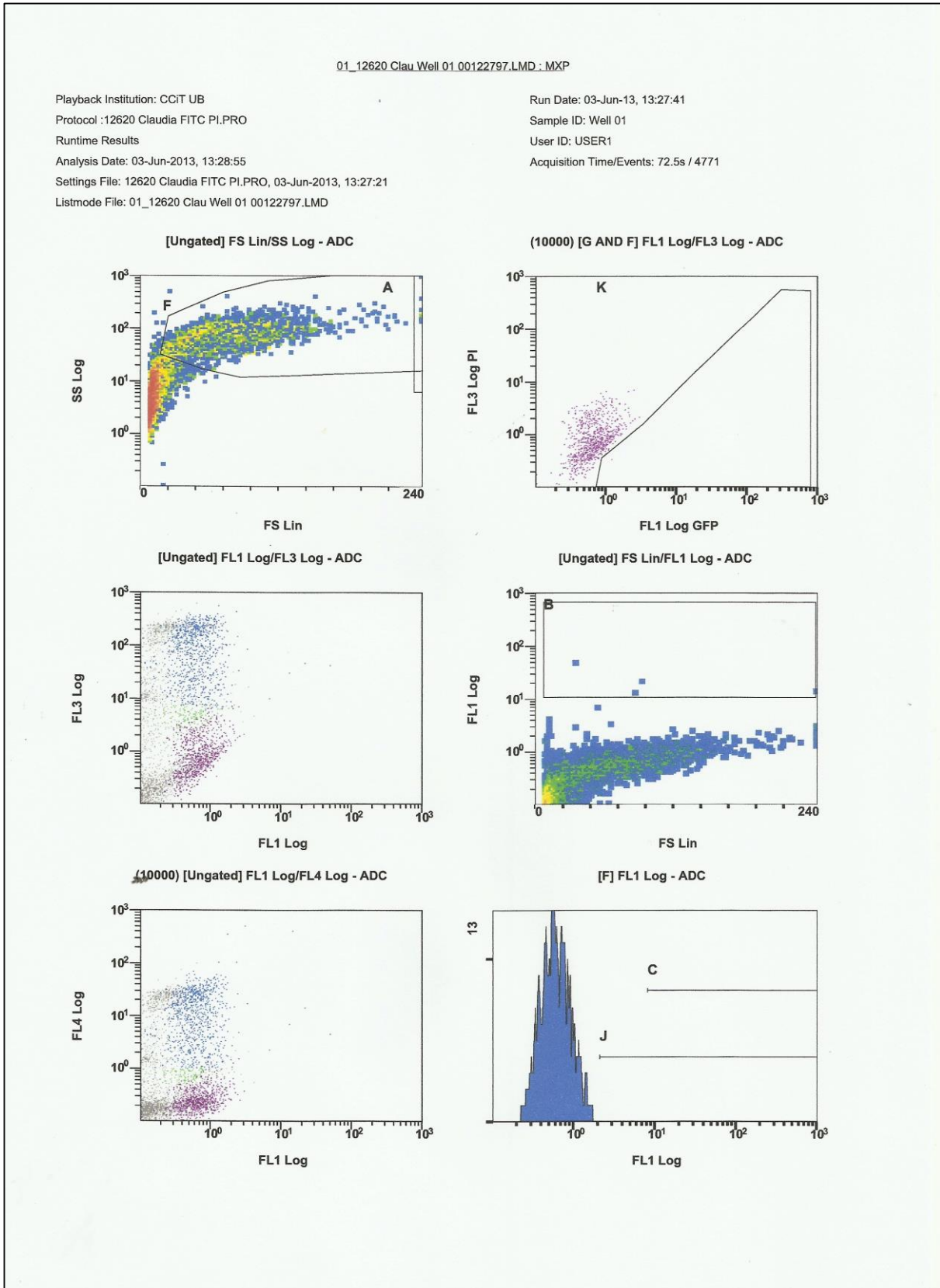
- El nivell de fluorescència correspon al nivell d'expressió de GFP.
- Els nivells de GFP i de Nkx2.5 correlacionen bé amb els altres nivells ja siguin cel·lulars o a nivell de fluorescència.
- A major nivell de fluorescència, major enriquiment en progenitors cardíacs.



RESULTATS CITOMETRIA LÍNIA CEL·LULAR NO TRANSGÈNICA



DIA 0 (PRIMERA CITOMETRIA)





01_12620 Clau Well 01 00122797.LMD : MXP

Playback Institution: CCiT UB

Run Date: 03-Jun-13, 13:27:41

Protocol :12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 01

Runtime Results

User ID: USER1

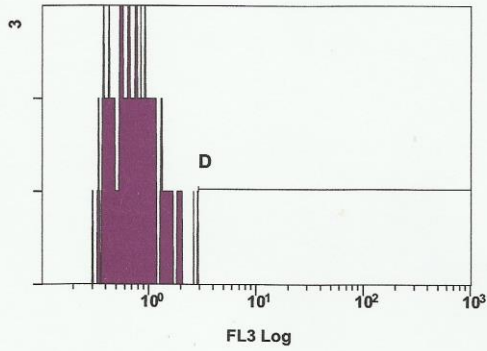
Analysis Date: 03-Jun-2013, 13:28:55

Acquisition Time/Events: 72.5s / 4771

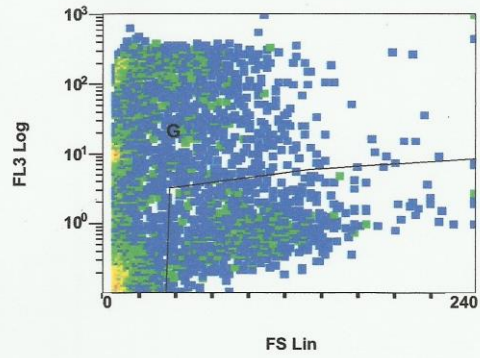
Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 03-Jun-2013, 13:27:21

Listmode File: 01_12620 Clau Well 01 00122797.LMD

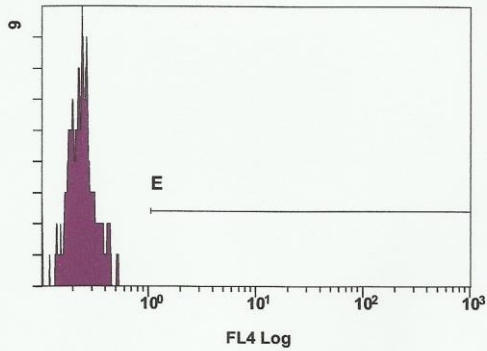
[G AND F] FL3 Log - ADC



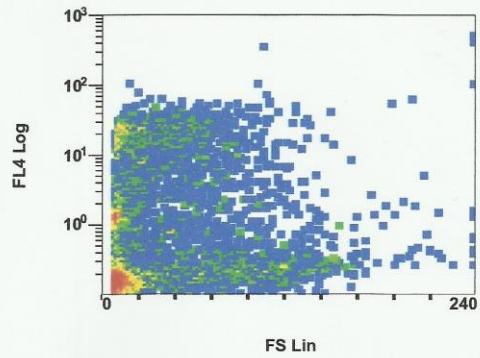
[Ungated] FS Lin/FL3 Log - ADC



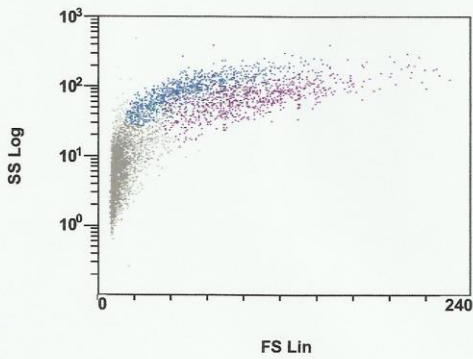
[G AND F] FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/SS Log - ADC





1

Playback Institution: CCIT UB

Run Date: 03-Jun-13, 13:27:41

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 01

Runtime Results

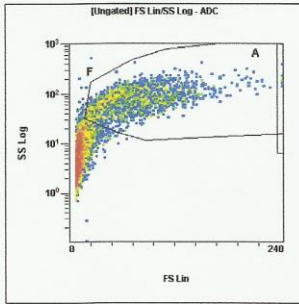
User ID: USER1

Analysis Date: 03-Jun-2013, 13:28:55

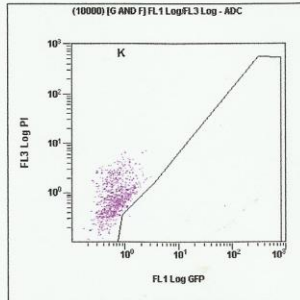
Acquisition Time/Events: 72.5s / 4771

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 03-Jun-2013, 13:27:21

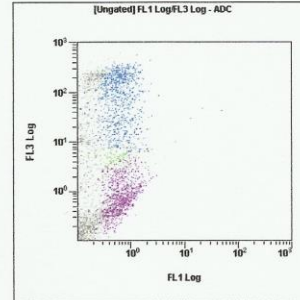
Listmode File: 01_12620 Clau Well 01 00122797.LMD



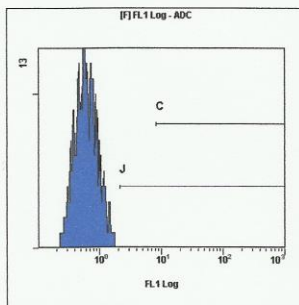
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4771	100.00	37.5	38.6
A	11	0.23	240	283
F	1854	38.86	74.2	85.2



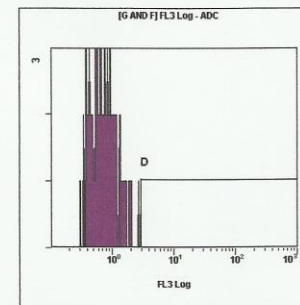
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	791	100.00	0.727	1.1
K	1	0.13	1.21	0.354



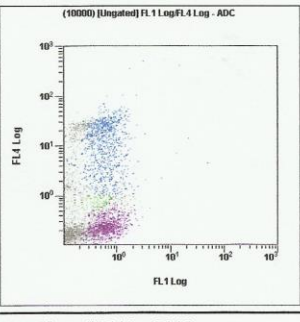
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4771	100.00	0.393	38.3



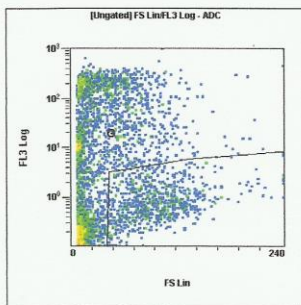
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1854	100.00	0.742	###
C	4	0.22	24.7	###
J	20	1.08	7.15	###



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	791	100.00	1.1	###
D	51	6.45	3.97	###

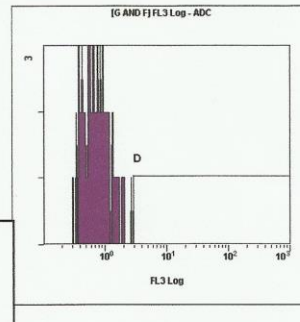


Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4771	100.00	0.393	5.15



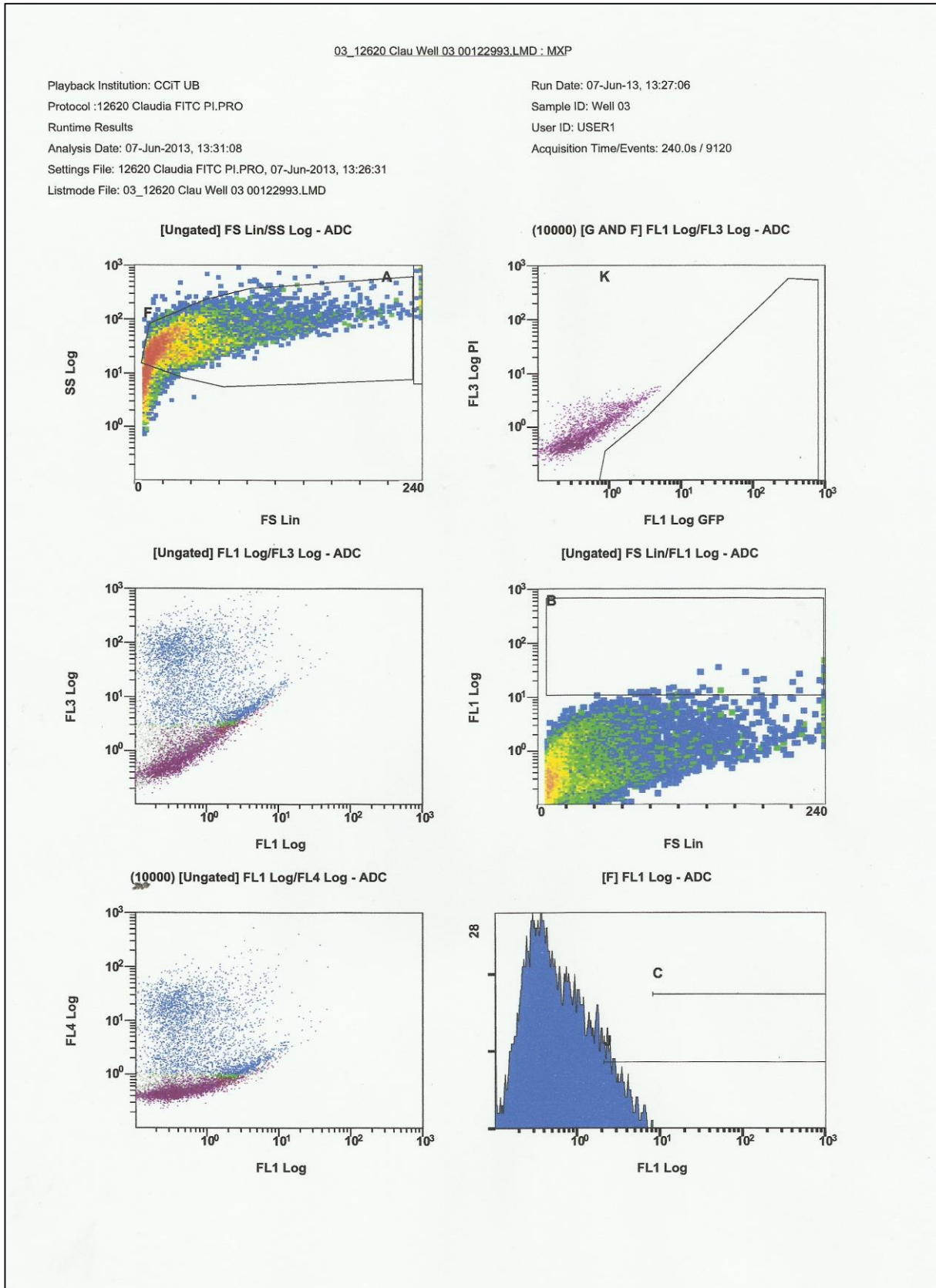
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4771	100.00	37.5	38.3
G	814	17.06	95.4	1.08

Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	791	100.00	1.1	###
D	51	6.45	3.97	###





DIA 0 (SEGONA CITOMETRIA)



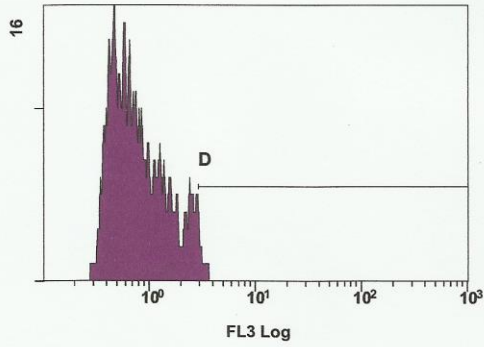


03_12620 Clau Well 03.00122993.LMD : MXP

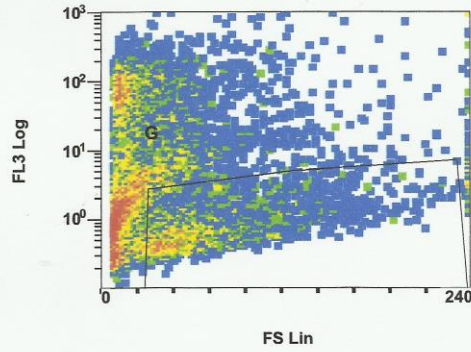
Playback Institution: CCIT UB
Protocol :12620 Claudia FITC PI.PRO
Runtime Results
Analysis Date: 07-Jun-2013, 13:31:08
Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 07-Jun-2013, 13:26:31
Listmode File: 03_12620 Clau Well 03.00122993.LMD

Run Date: 07-Jun-13, 13:27:06
Sample ID: Well 03
User ID: USER1
Acquisition Time/Events: 240.0s / 9120

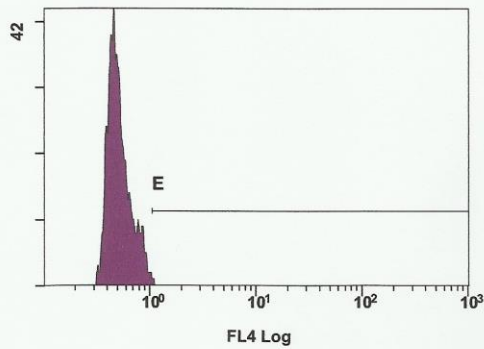
[G AND F] FL3 Log - ADC



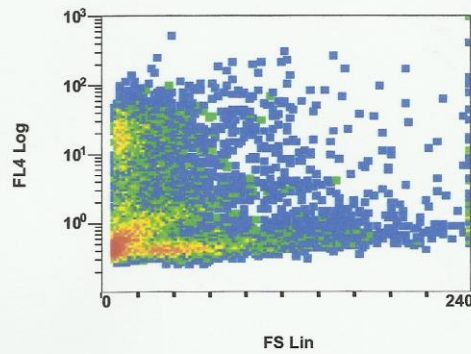
[Ungated] FS Lin/FL3 Log - ADC



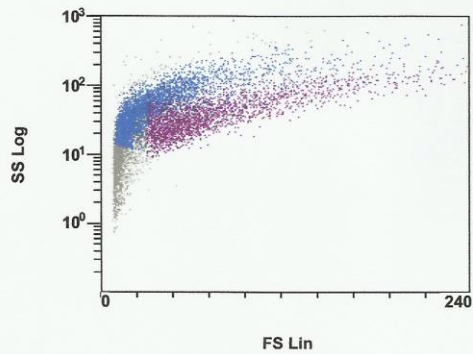
[G AND F] FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/SS Log - ADC





Playback Institution: CGIT UB

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Runtime Results

Analysis Date: 07-Jun-2013, 13:31:08

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 07-Jun-2013, 13:26:31

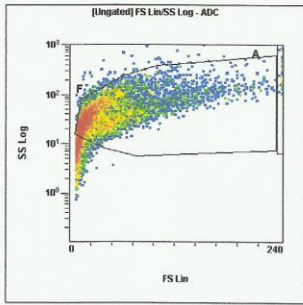
Listmode File: 03_12620 Clau Well 03 00122993.LMD

Run Date: 07-Jun-13, 13:27:06

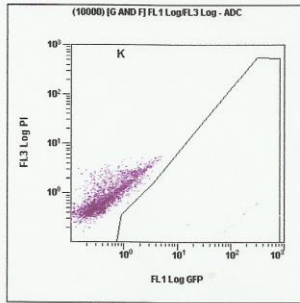
Sample ID: Well 03

User ID: USER1

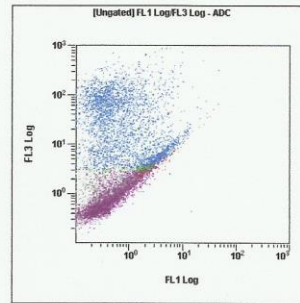
Acquisition Time/Events: 240.0s / 9120



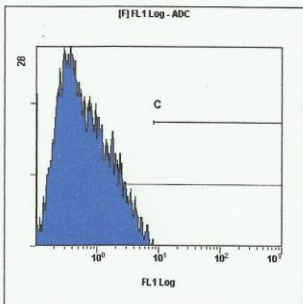
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	9120	100.00	41.2	47.7
A	75	0.82	240	350
F	7344	80.53	45.5	51.2



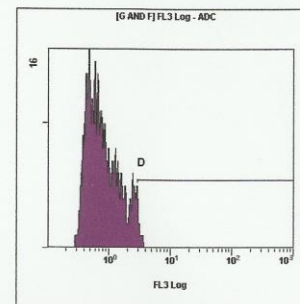
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	2404	100.00	0.66	1.09
K	0	0.00	0	0



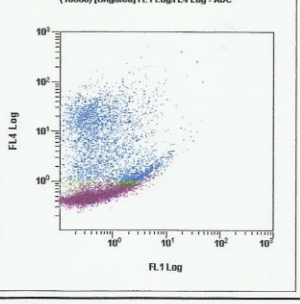
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	9120	100.00	1.06	23.9



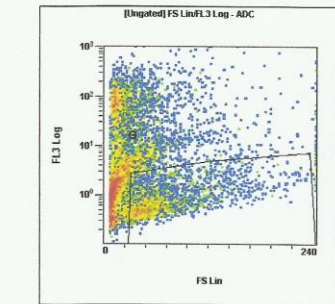
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	7344	100.00	1.14	###
C	59	0.80	11.8	###
J	1054	14.35	4.09	###



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	2404	100.00	1.09	###
D	113	4.70	3.65	###

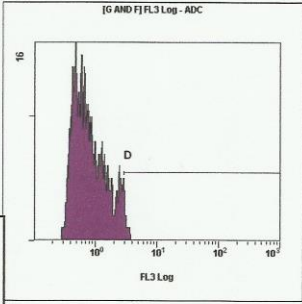


(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	9120	100.00	1.06	6.24



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	9120	100.00	41.2	23.9
G	2420	26.54	70.1	1.09

[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	2404	100.00	1.09	###
D	113	4.70	3.65	###

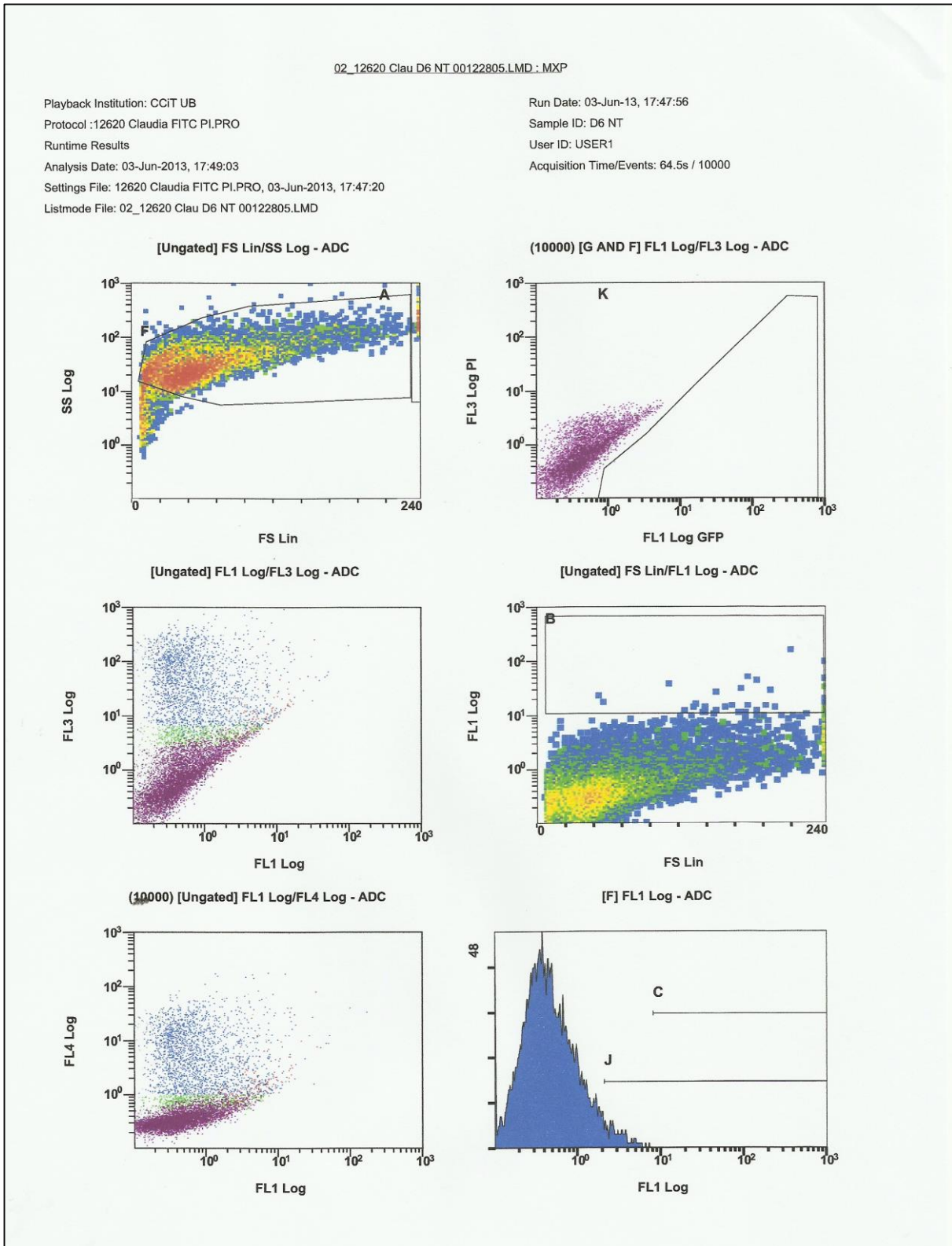


Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1



DIA 6



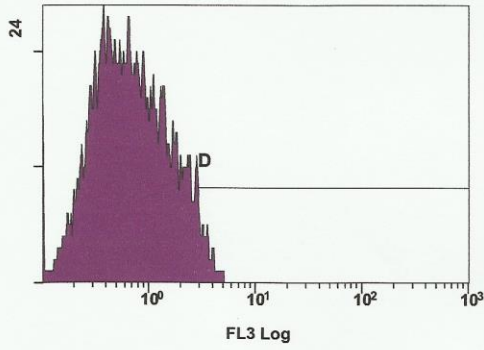


02_12620 Clau D6 NT 00122805.LMD : MXP

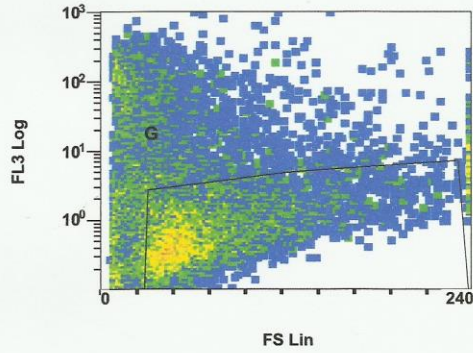
Playback Institution: CCIT UB
Protocol :12620 Claudia FITC PI.PRO
Runtime Results
Analysis Date: 03-Jun-2013, 17:49:04
Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 03-Jun-2013, 17:47:20
Listmode File: 02_12620 Clau D6 NT 00122805.LMD

Run Date: 03-Jun-13, 17:47:56
Sample ID: D6 NT
User ID: USER1
Acquisition Time/Events: 64.5s / 10000

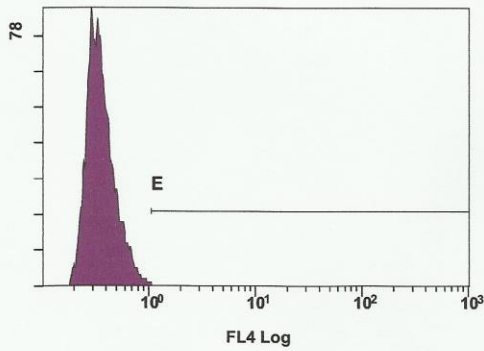
[G AND F] FL3 Log - ADC



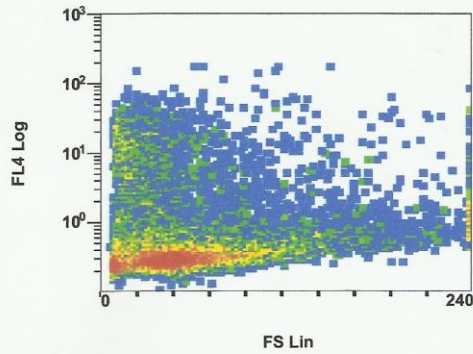
[Ungated] FS Lin/FL3 Log - ADC



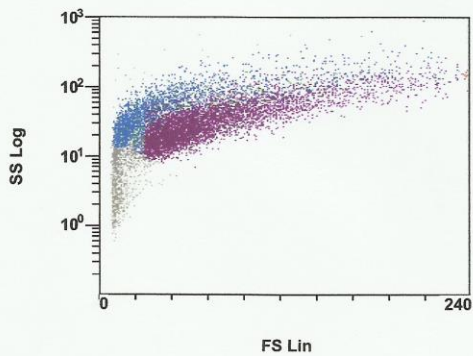
[G AND F] FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/SS Log - ADC





Playback Institution: CCiT UB

Run Date: 03-Jun-13, 17:47:56

Protocol: 12620 Claudia FITC PL.PRO

Sample ID: D6 NT

Runtime Results

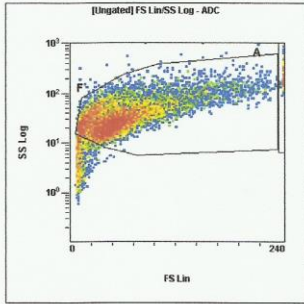
User ID: USER1

Analysis Date: 03-Jun-2013, 17:49:04

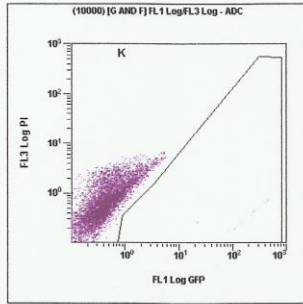
Acquisition Time/Events: 64.5s / 10000

Settings File: 12620 Claudia FITC PL.PRO, 03-Jun-2013, 17:47:20

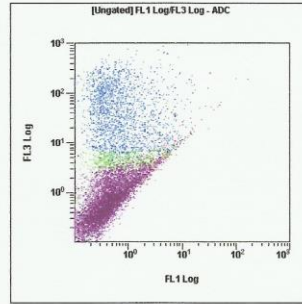
Listmode File: 02_12620 Clau D6 NT 00122805.LMD



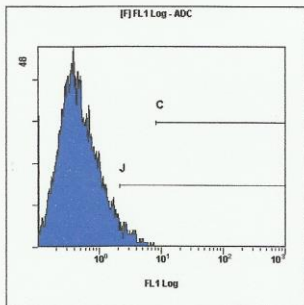
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	60.5	44.9
A	172	1.72	240	261
F	8849	88.49	62	44



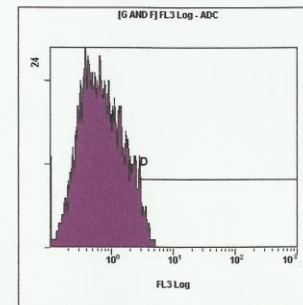
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5738	100.00	0.595	0.996
K	1	0.02	1.2	0.499



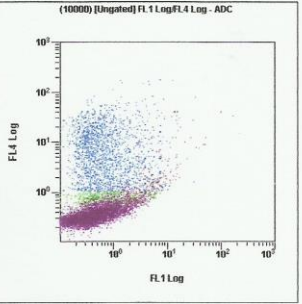
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.876	17.7



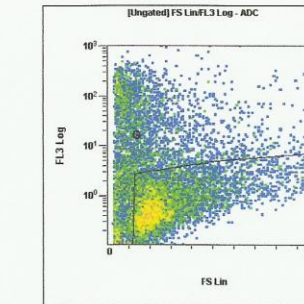
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	8849	100.00	0.812	###
C	37	0.42	15.4	###
J	595	6.72	4.43	###



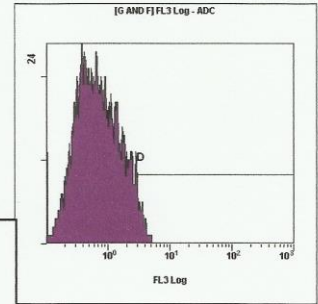
[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5738	100.00	0.996	###
D	292	5.09	3.79	###



(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.876	2.62



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	60.5	17.7
G	5787	57.87	70.8	0.99



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5738	100.00	0.996	###
D	292	5.09	3.79	###

Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1



DIA 8 (PRIMERA CITOMETRIA)

Playback Institution: CCIT UB

Run Date: 05-Jun-13, 15:12:41

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 01

Runtime Results

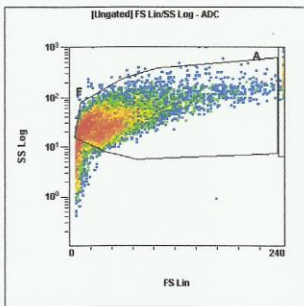
User ID: USER1

Analysis Date: 05-Jun-2013, 15:14:10

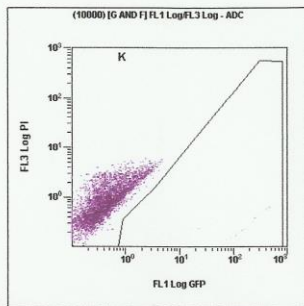
Acquisition Time/Events: 87.4s / 10000

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 05-Jun-2013, 15:12:17

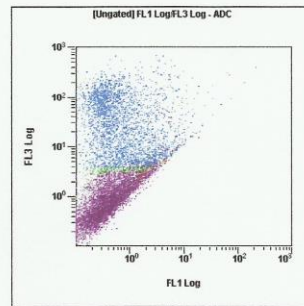
Listmode File: 01_12620 Clau Well 01 00122864.LMD



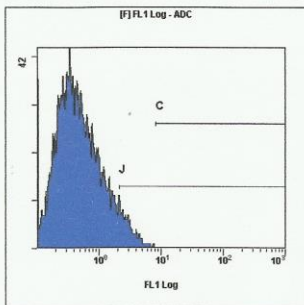
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	49	43
A	124	1.24	240	295
F	8604	86.04	51.4	43.7



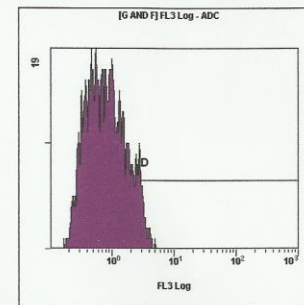
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4246	100.00	0.56	1.08
K	0	0.00	0	0



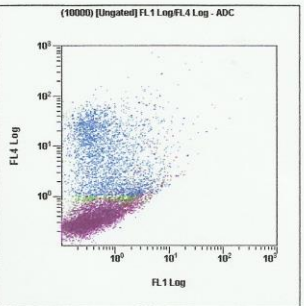
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.917	20.1



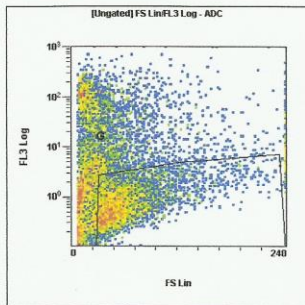
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	8604	100.00	0.906	###
C	48	0.56	19.3	###
J	749	8.71	4.56	###



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4246	100.00	1.08	###
D	229	5.39	3.68	###

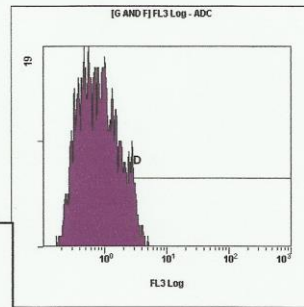


(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.917	5.07



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	49	20.1
G	4284	42.84	65	1.07

[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4246	100.00	1.08	###
D	229	5.39	3.68	###



Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1



DIA 8 (SEGONA CITOMETRIA)

Playback Institution: CCIT UB

Run Date: 05-Jun-13, 15:21:09

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 01

Runtime Results

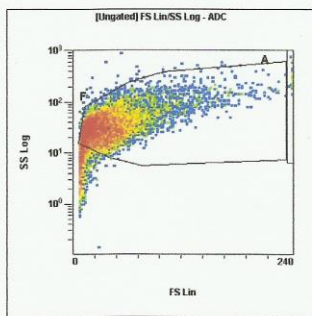
User ID: USER1

Analysis Date: 05-Jun-2013, 15:22:29

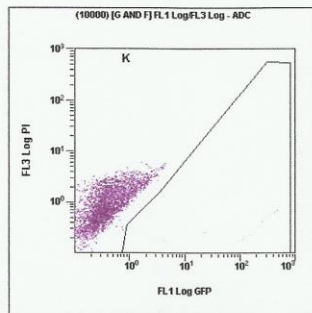
Acquisition Time/Events: 77.9s / 10000

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 05-Jun-2013, 15:20:45

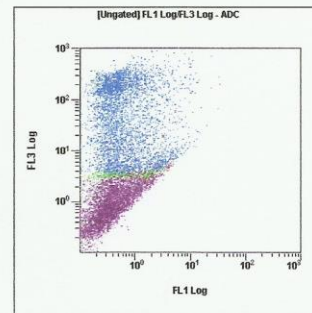
Listmode File: 01_12620 Clau Well 01 00122868.LMD



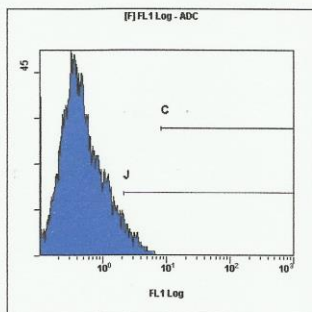
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	40.8	41.4
A	36	0.36	240	408
F	8582	85.82	44.2	44.2



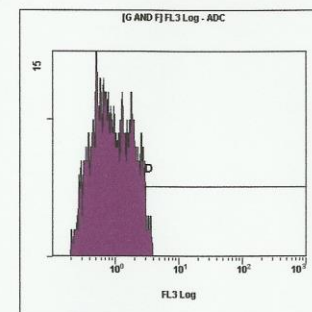
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3175	100.00	0.518	1.17
K	0	0.00	0	0



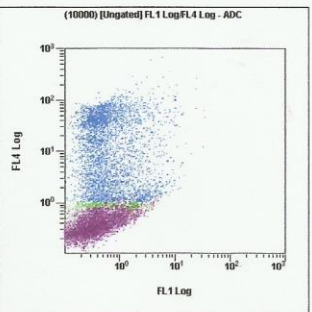
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.784	46.5



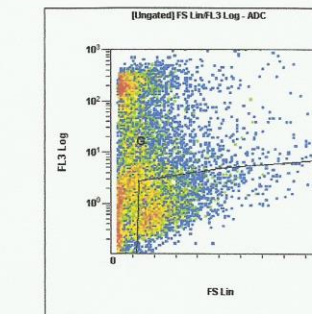
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	8582	100.00	0.821	###
C	36	0.42	11.8	###
J	653	7.61	3.99	###



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3175	100.00	1.17	###
D	164	5.17	3.65	###

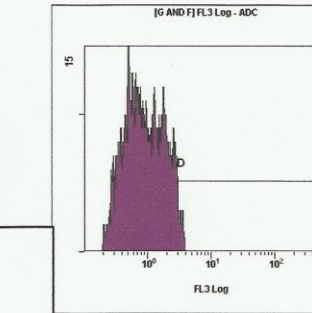


(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.784	11.3



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	40.8	46.5
G	3213	32.13	58.9	1.16

[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3175	100.00	1.17	###
D	164	5.17	3.65	###

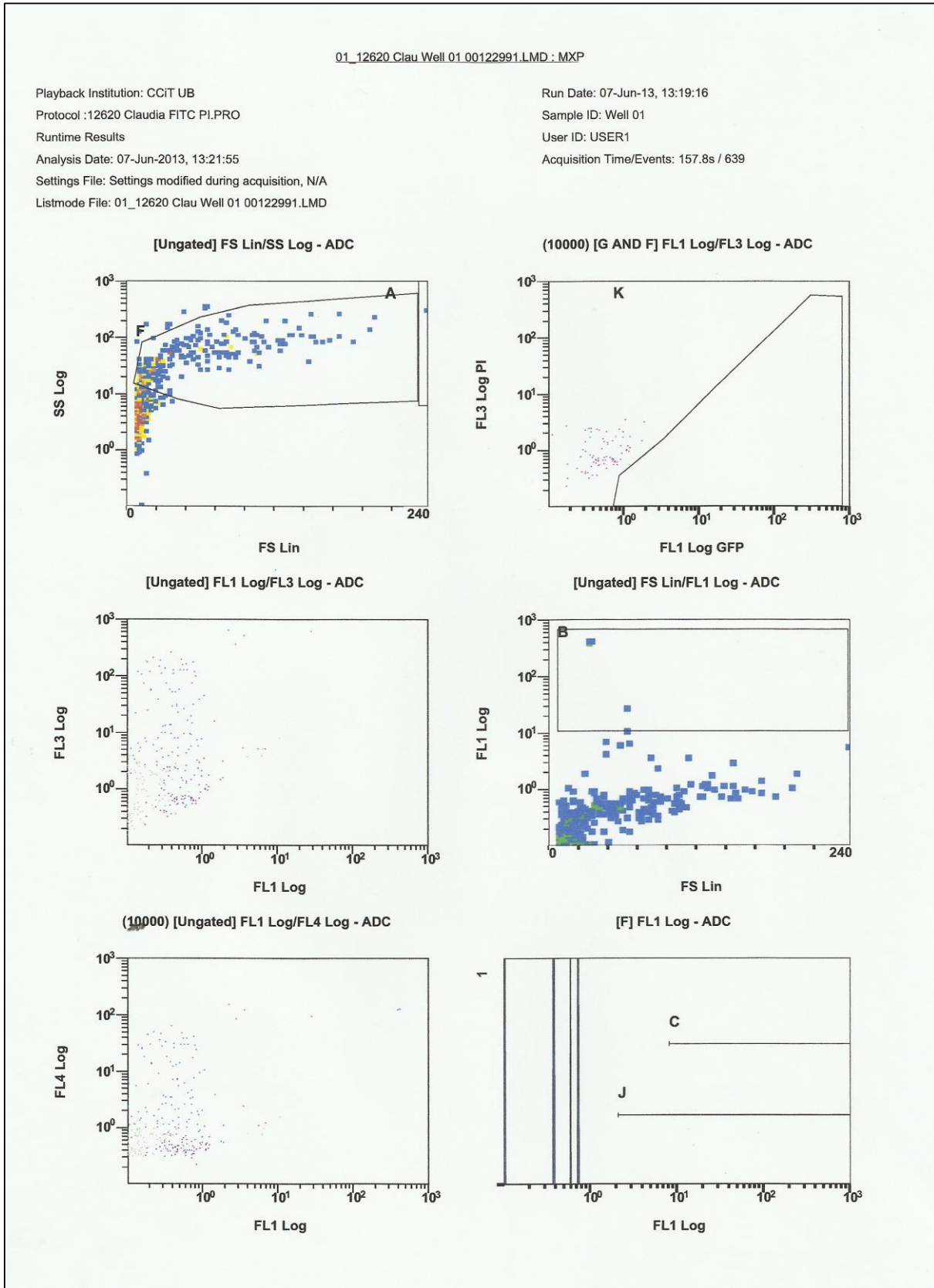


Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1



DIA 10





01_12620 Clau Well 01 00122991.LMD : MXP

Playback Institution: CCIT UB

Run Date: 07-Jun-13, 13:19:16

Protocol :12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 01

Runtime Results

User ID: USER1

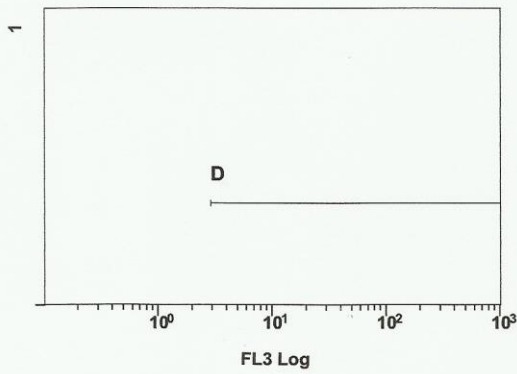
Analysis Date: 07-Jun-2013, 13:21:55

Acquisition Time/Events: 157.8s / 639

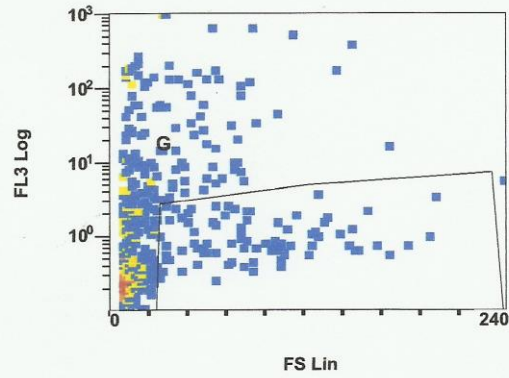
Settings File: Settings modified during acquisition, N/A

Listmode File: 01_12620 Clau Well 01 00122991.LMD

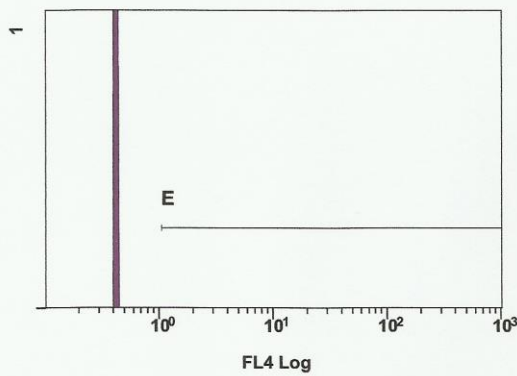
[G AND F] FL3 Log - ADC



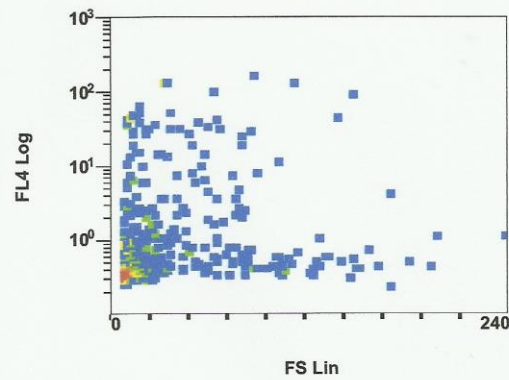
[Ungated] FS Lin/FL3 Log - ADC



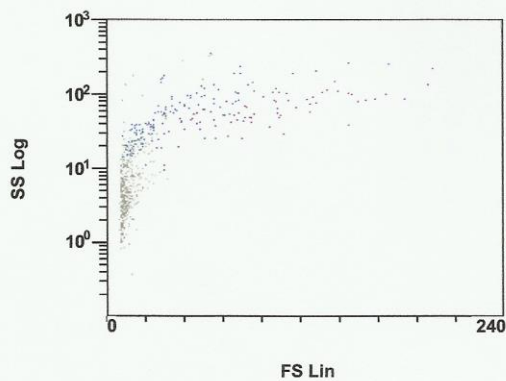
[G AND F] FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/SS Log - ADC





Playback Institution: CCIT UB

Run Date: 07-Jun-13, 13:19:16

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 01

Runtime Results

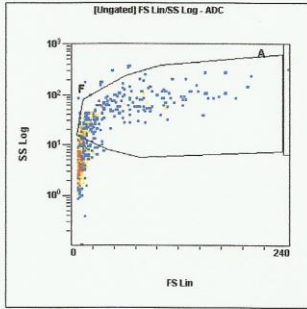
User ID: USER1

Analysis Date: 07-Jun-2013, 13:21:55

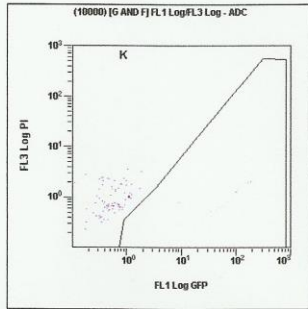
Acquisition Time/Events: 157.8s / 639

Settings File: Settings modified during acquisition, N/A

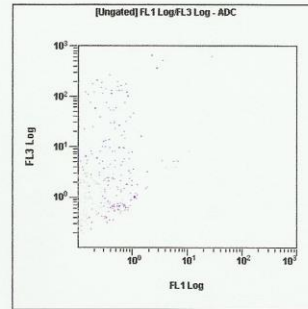
Listmode File: 01_12620 Clau Well 01 00122991.LMD



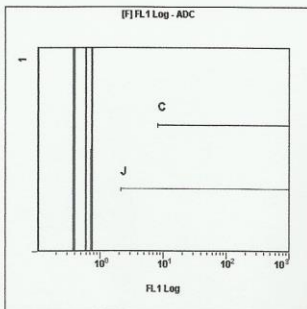
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	639	100.00	27.7	29.1
A	1	0.16	240	301
F	259	40.53	49.3	54.1



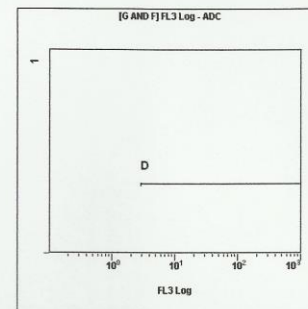
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	82	100.00	0.589	1.1
K	0	0.00	0	0



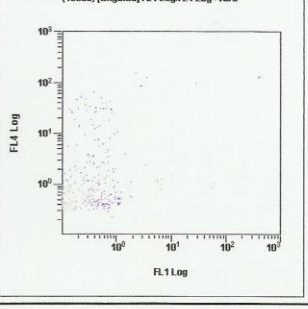
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	639	100.00	2.85	20



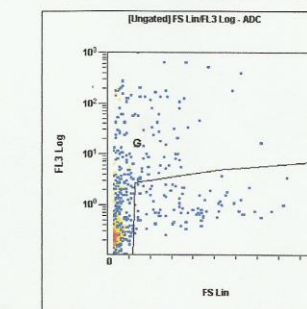
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	259	100.00	0.501	###
C	0	0.00	0	###
J	6	2.32	4.19	###



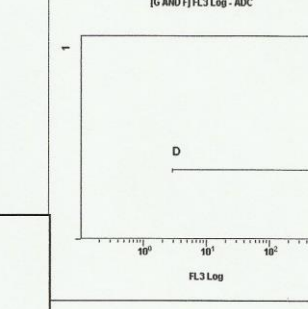
[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	82	100.00	1.1	###
D	2	2.44	3.45	###



(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	639	100.00	2.85	4.32



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	639	100.00	27.7	20
G	85	13.30	86.1	1.09



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	82	100.00	1.1	###
D	2	2.44	3.45	###



DIA 13 (PRIMERA CITOMETRIA)

Playback Institution: CCIT UB

Protocol: 12620 Claudia FITC PI,PRO

Runtime Results

Analysis Date: 10-Jun-2013, 13:08:40

Settings File: Settings modified during acquisition, N/A

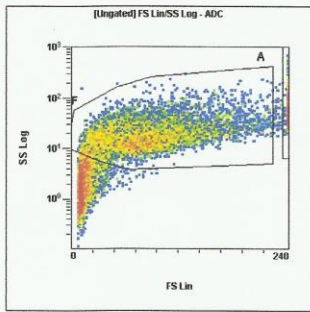
Listmode File: 01_12620 Clau Well 01 00123000.LMD

Run Date: 10-Jun-13, 13:06:28

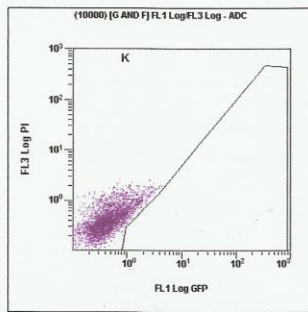
Sample ID: Well 01

User ID: USER1

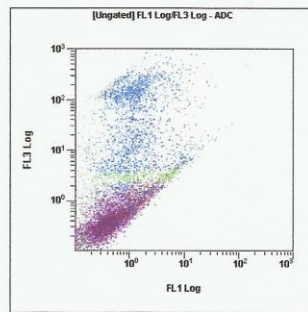
Acquisition Time/Events: 130.3s / 10000



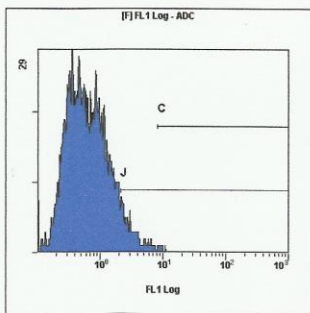
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	69.7	19.2
A	419	4.19	240	85.5
F	6278	62.78	84.6	23.1



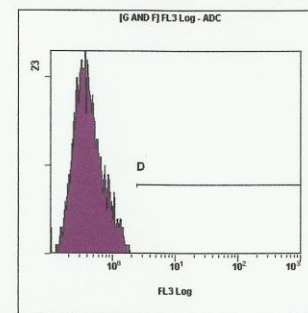
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3390	100.00	0.562	0.508
K	1	0.03	5.92	2.47



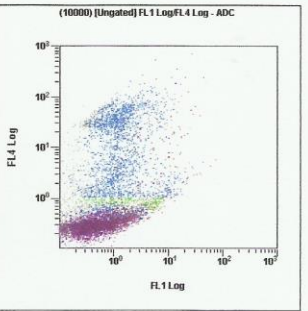
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	1.08	24.9



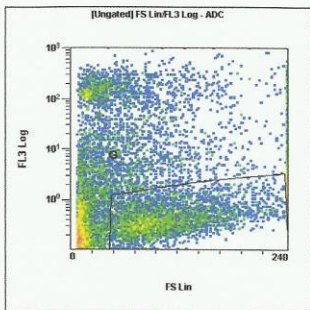
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	6278	100.00	1.19	###
C	107	1.70	12	###
J	737	11.74	4.98	###



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3390	100.00	0.508	###
D	3	0.09	2.61	###

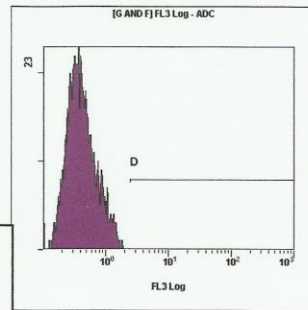


(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	1.08	6.33



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	69.7	24.9
G	3496	34.96	105	0.511

[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3390	100.00	0.508	###
D	3	0.09	2.61	###



Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1



DIA 13 (SEGONA CITOMETRIA)

Playback Institution: CCIT UB

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Runtime Results

Analysis Date: 10-Jun-2013, 13:12:26

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 10-Jun-2013, 13:11:08

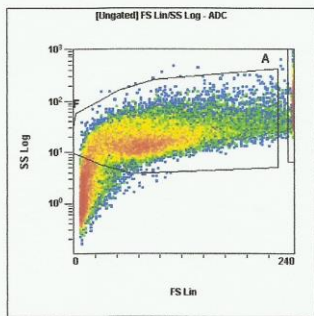
Listmode File: 01_12620 Clau Well 01 00123002.LMD

Run Date: 10-Jun-13, 13:11:32

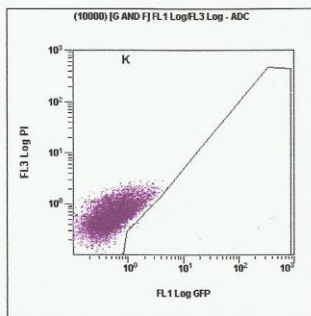
Sample ID: Well 01

User ID: USER1

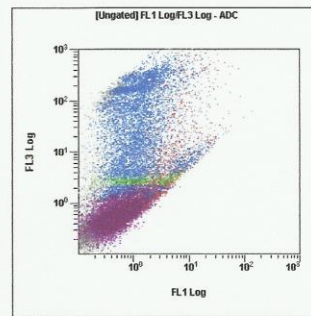
Acquisition Time/Events: 51.2s / 28869



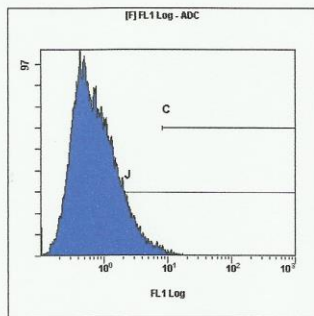
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	28869	100.00	75.7	22.5
A	1548	5.36	240	103
F	18933	65.58	86.3	24.1



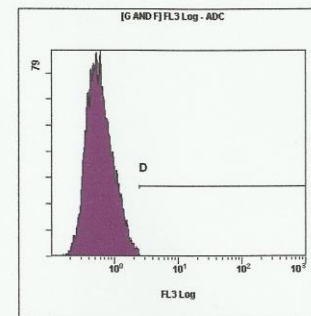
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.611	0.672
K	4	0.04	1.79	0.519



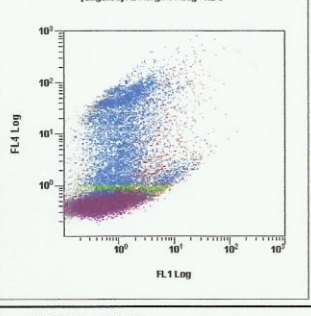
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	28869	100.00	1.34	33.4



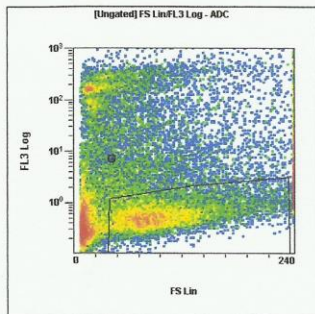
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	18933	100.00	1.35	###
C	297	1.57	19.9	###
J	2333	12.32	5.72	###



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.672	###
D	16	0.16	2.68	###

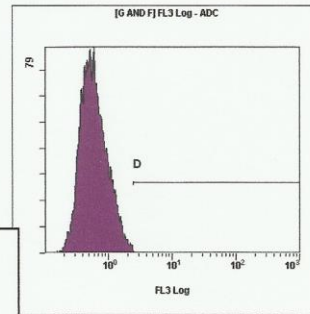


[Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	28869	100.00	1.34	8.5



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	28869	100.00	75.7	33.4
G	10359	35.88	101	0.672

[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.672	###
D	16	0.16	2.68	###



Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1



ASSOLICIÓ DE LA PLURIPOTÈNCIA

Playback Institution: CGIT UB

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Runtime Results

Analysis Date: 05-Jun-2013, 15:17:21

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 05-Jun-2013, 15:16:30

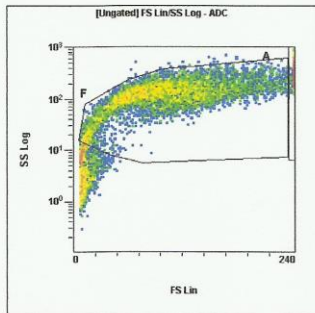
Listmode File: 03_12620 Clau Well 03 00122866.LMD

Run Date: 05-Jun-13, 15:17:05

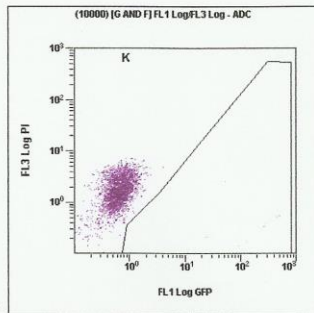
Sample ID: Well 03

User ID: USER1

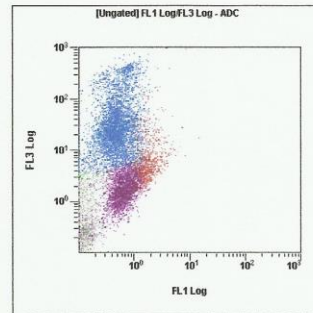
Acquisition Time/Events: 13.7s / 10000



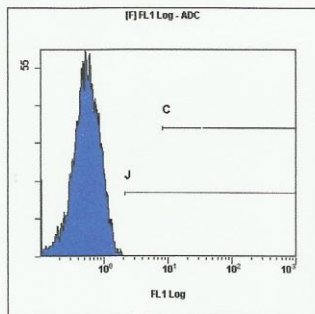
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	97.9	127
A	882	8.82	240	332
F	7194	71.94	102	133



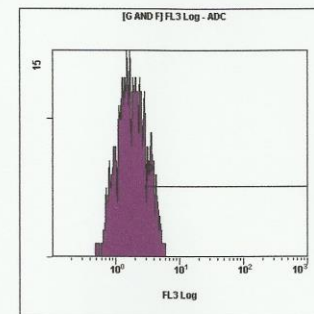
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	2523	100.00	0.683	2.01
K	1	0.04	1.24	0.512



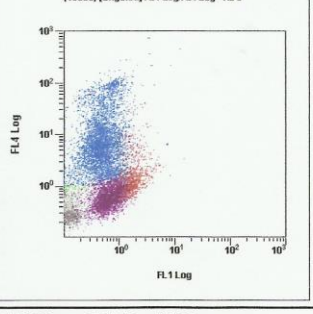
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.618	34



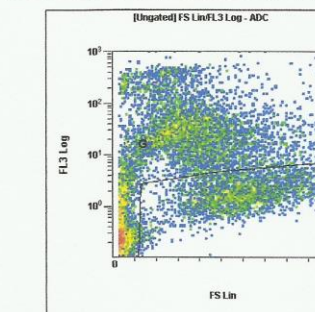
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	7194	100.00	0.59	###
C	0	0.00	0	###
J	16	0.22	3.27	###



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	2523	100.00	2.01	###
D	504	19.98	3.97	###



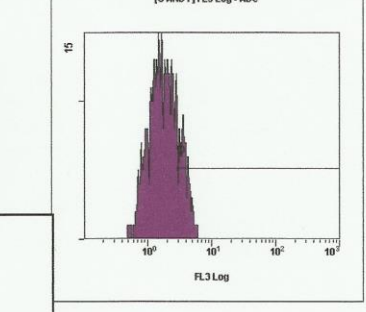
(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	0.618	8.71



Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	97.9	34
G	2602	26.02	134	1.96

[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	2523	100.00	2.01	###
D	504	19.98	3.97	###

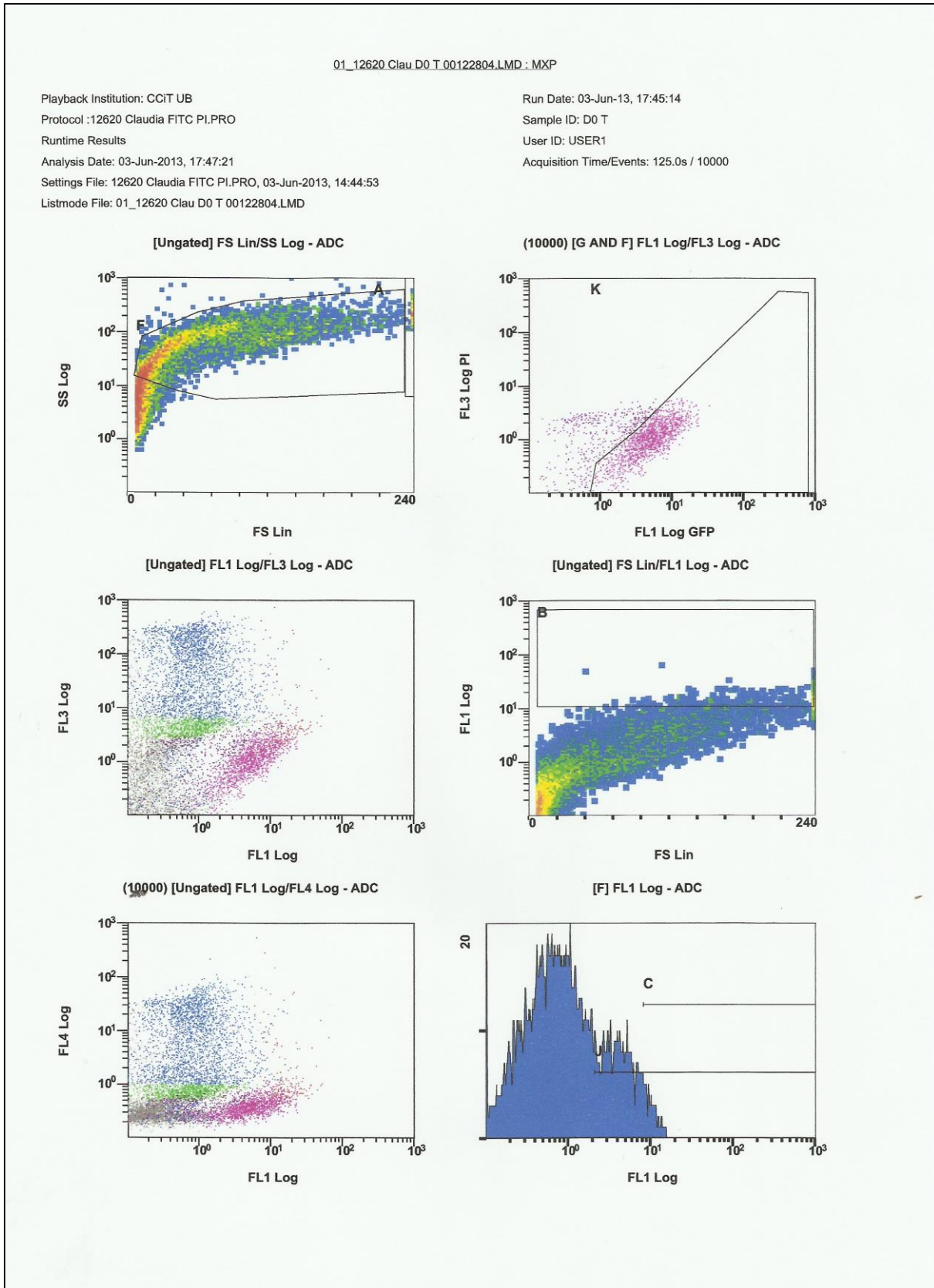




RESULTATS CITOMETRIA LÍNIA CEL·LULAR TRANSGÈNICA



DIA 0 (PRIMERA CITOMETRIA)





01_12620 Clau D0 T 00122804.LMD : MXP

Playback Institution: CCiT UB

Protocol :12620 Claudia FITC PI.PRO

Runtime Results

Analysis Date: 03-Jun-2013, 17:47:21

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 03-Jun-2013, 14:44:53

Listmode File: 01_12620 Clau D0 T 00122804.LMD

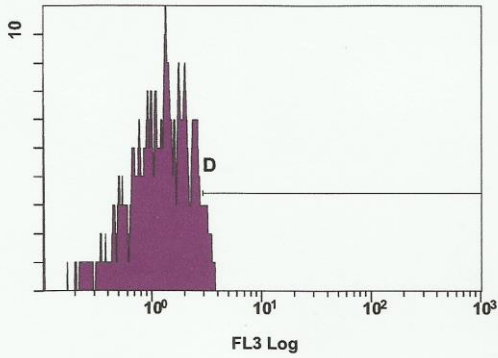
Run Date: 03-Jun-13, 17:45:14

Sample ID: D0 T

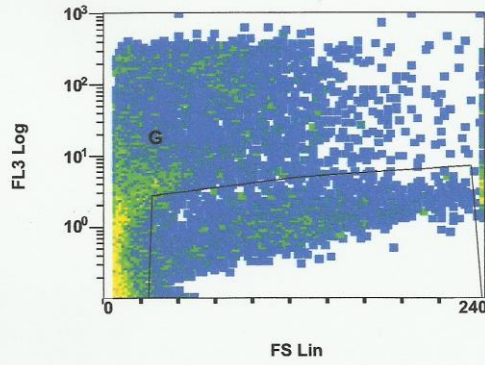
User ID: USER1

Acquisition Time/Events: 125.0s / 10000

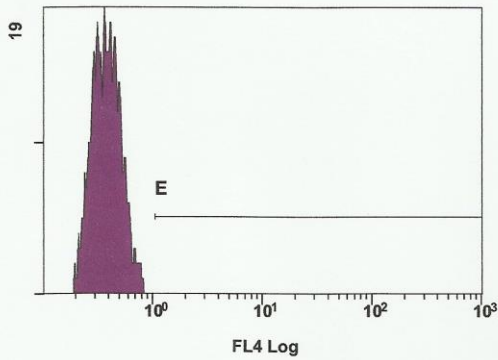
[G AND F] FL3 Log - ADC



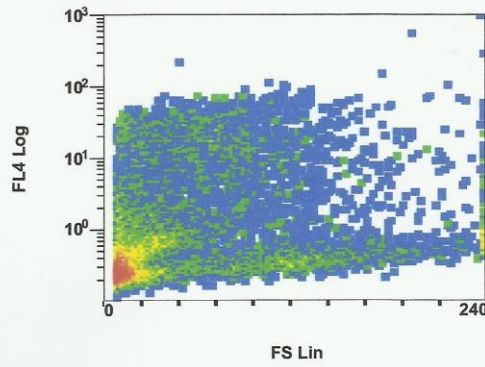
[Ungated] FS Lin/FL3 Log - ADC



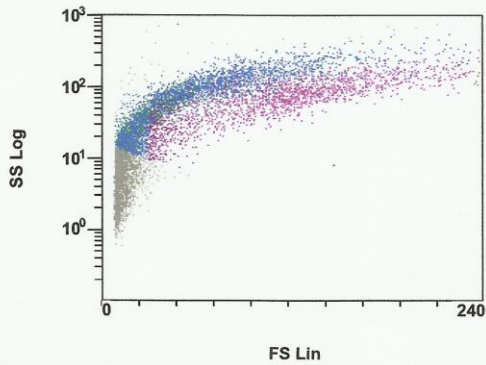
[G AND F] FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/SS Log - ADC





Playback Institution: CGIT UB

Run Date: 03-Jun-13, 17:45:14

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: D0 T

Runtime Results

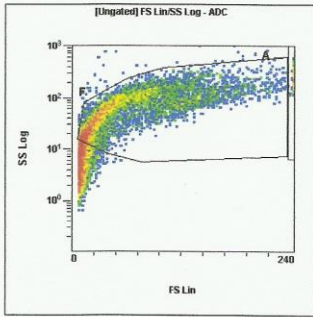
User ID: USER1

Analysis Date: 03-Jun-2013, 17:47:22

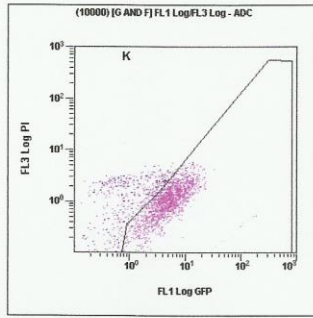
Acquisition Time/Events: 125.0s / 10000

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 03-Jun-2013, 14:44:53

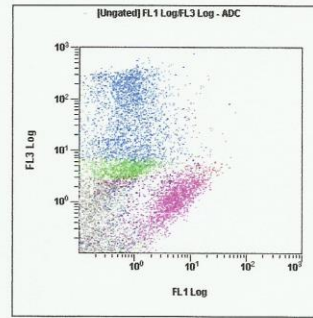
Listmode File: 01_12620 Clau D0 T 00122804.LMD



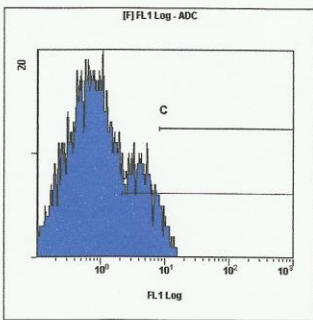
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	49	55.3
A	161	1.61	240	256
F	6344	63.44	63.9	75.3



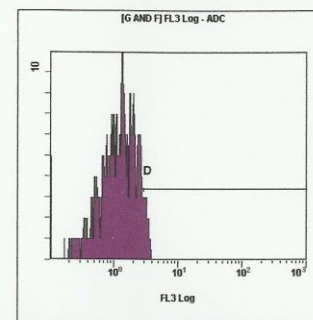
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1833	100.00	4.91	1.37
K	1356	73.98	6.1	1.3



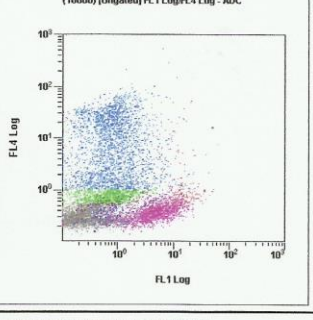
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	1.74	28.3



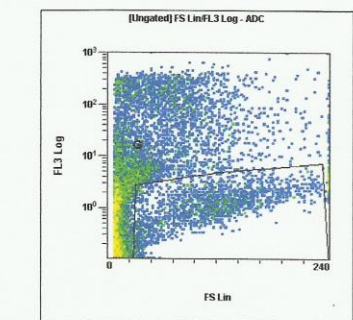
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	6344	100.00	2.15	###
C	350	5.52	12.2	###
J	1763	27.79	5.89	###



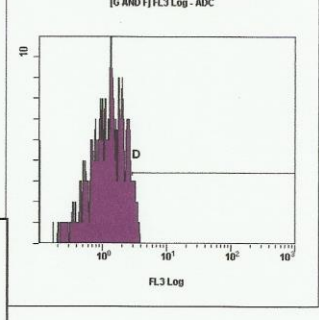
[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1833	100.00	1.37	###
D	148	8.07	3.72	###



(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	1.74	4.32



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	49	28.3
G	1875	18.75	101	1.35



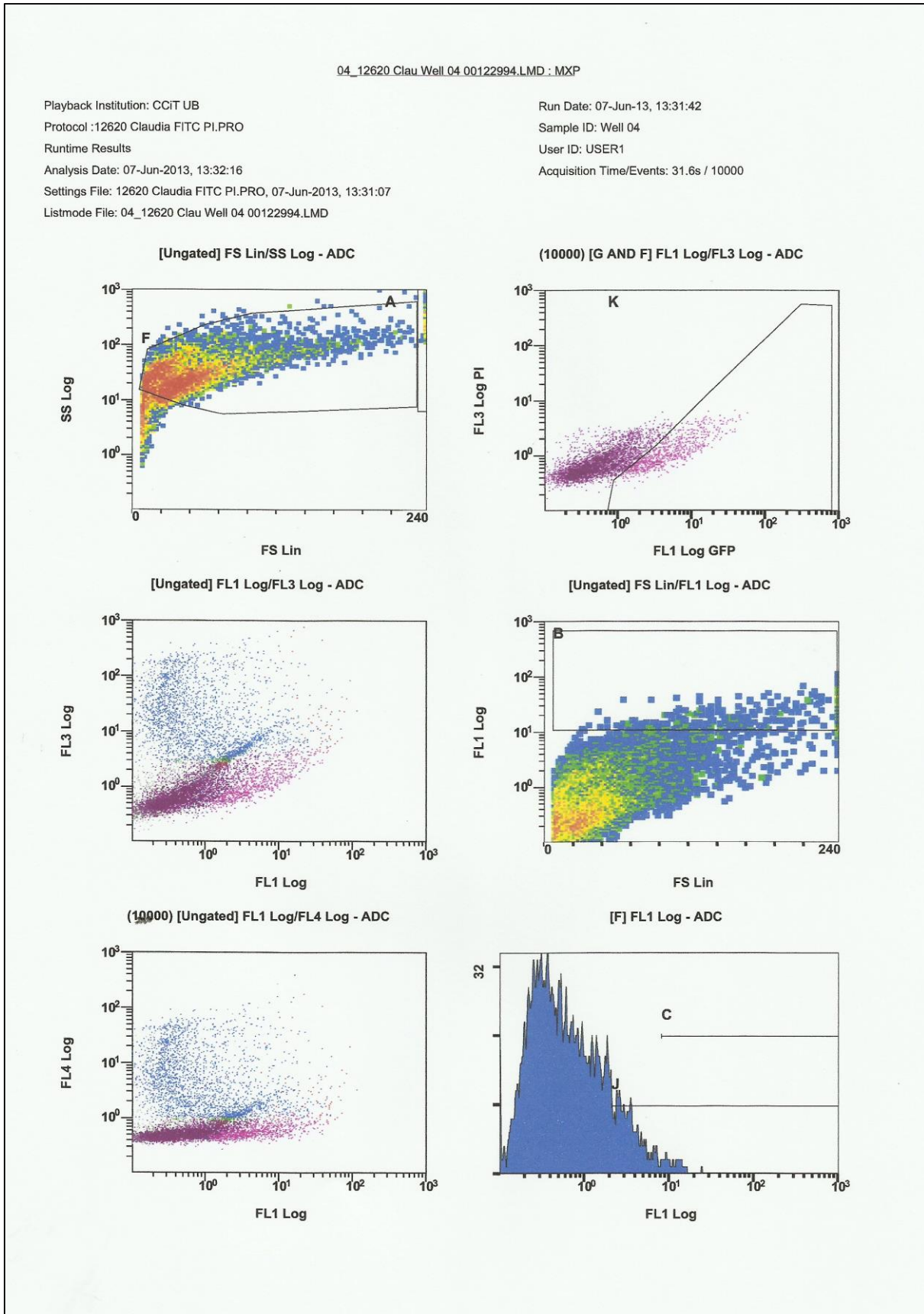
[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1833	100.00	1.37	###
D	148	8.07	3.72	###

Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1



DIA 0 (SEGONA CITOMETRIA)



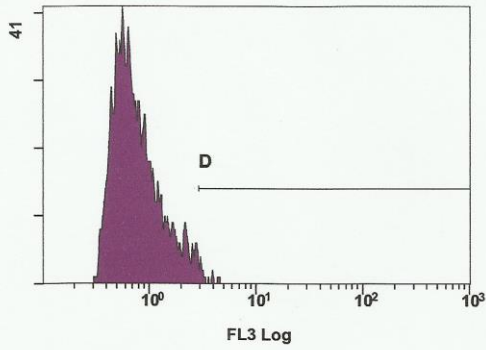


04_12620 Clau Well 04 00122994.LMD : MXP

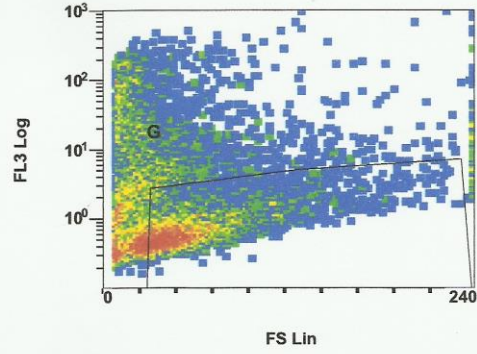
Playback Institution: CCIT UB
Protocol :12620 Claudia FITC PI.PRO
Runtime Results
Analysis Date: 07-Jun-2013, 13:32:16
Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 07-Jun-2013, 13:31:07
Listmode File: 04_12620 Clau Well 04 00122994.LMD

Run Date: 07-Jun-13, 13:31:42
Sample ID: Well 04
User ID: USER1
Acquisition Time/Events: 31.6s / 10000

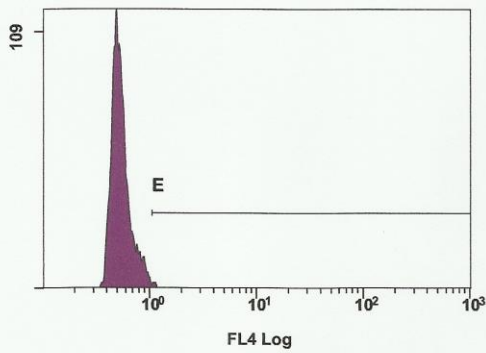
[G AND F] FL3 Log - ADC



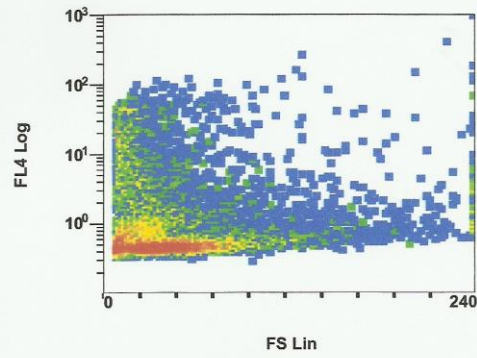
[Ungated] FS Lin/FL3 Log - ADC



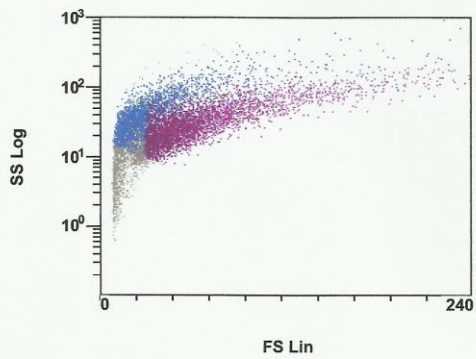
[G AND F] FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/SS Log - ADC





Playback Institution: CGIT UB

Run Date: 07-Jun-13, 13:31:42

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 04

Runtime Results

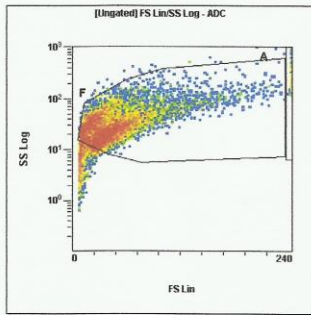
User ID: USER1

Analysis Date: 07-Jun-2013, 13:32:17

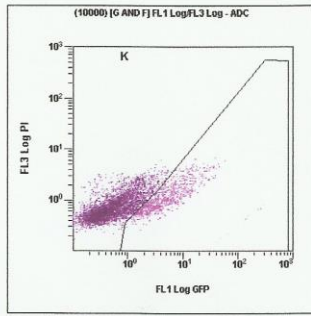
Acquisition Time/Events: 31.6s / 10000

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 07-Jun-2013, 13:31:07

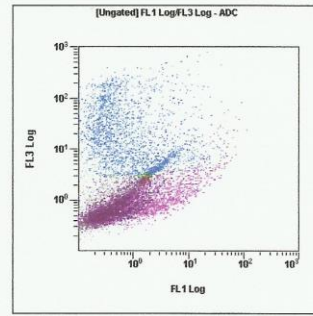
Listmode File: 04_12620 Clau Well 04 00122994.LMD



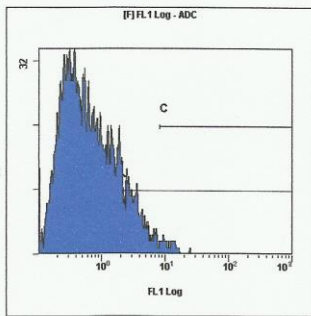
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	45.7	38.3
A	81	0.81	240	309
F	8633	86.33	48.2	39.2



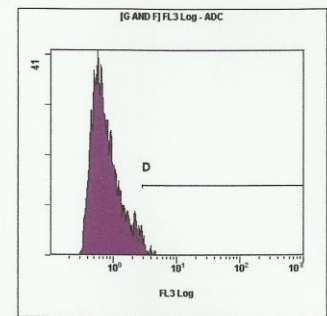
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4727	100.00	1.75	0.98
K	787	16.65	6.87	1.46



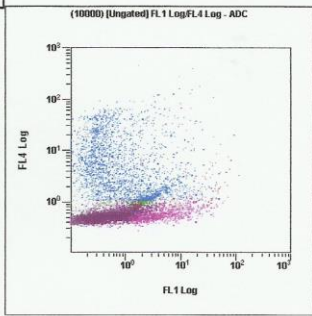
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	1.79	12.4



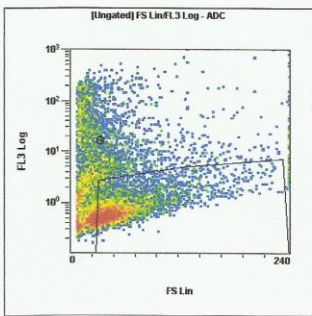
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	8633	100.00	1.73	###
C	348	4.03	16.3	###
J	1563	18.10	6.64	###



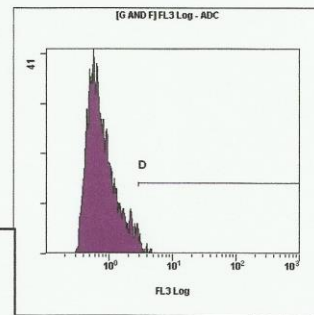
[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4727	100.00	0.98	###
D	147	3.11	3.8	###



(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	1.79	3.37



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	45.7	12.4
G	4760	47.60	60.1	0.977



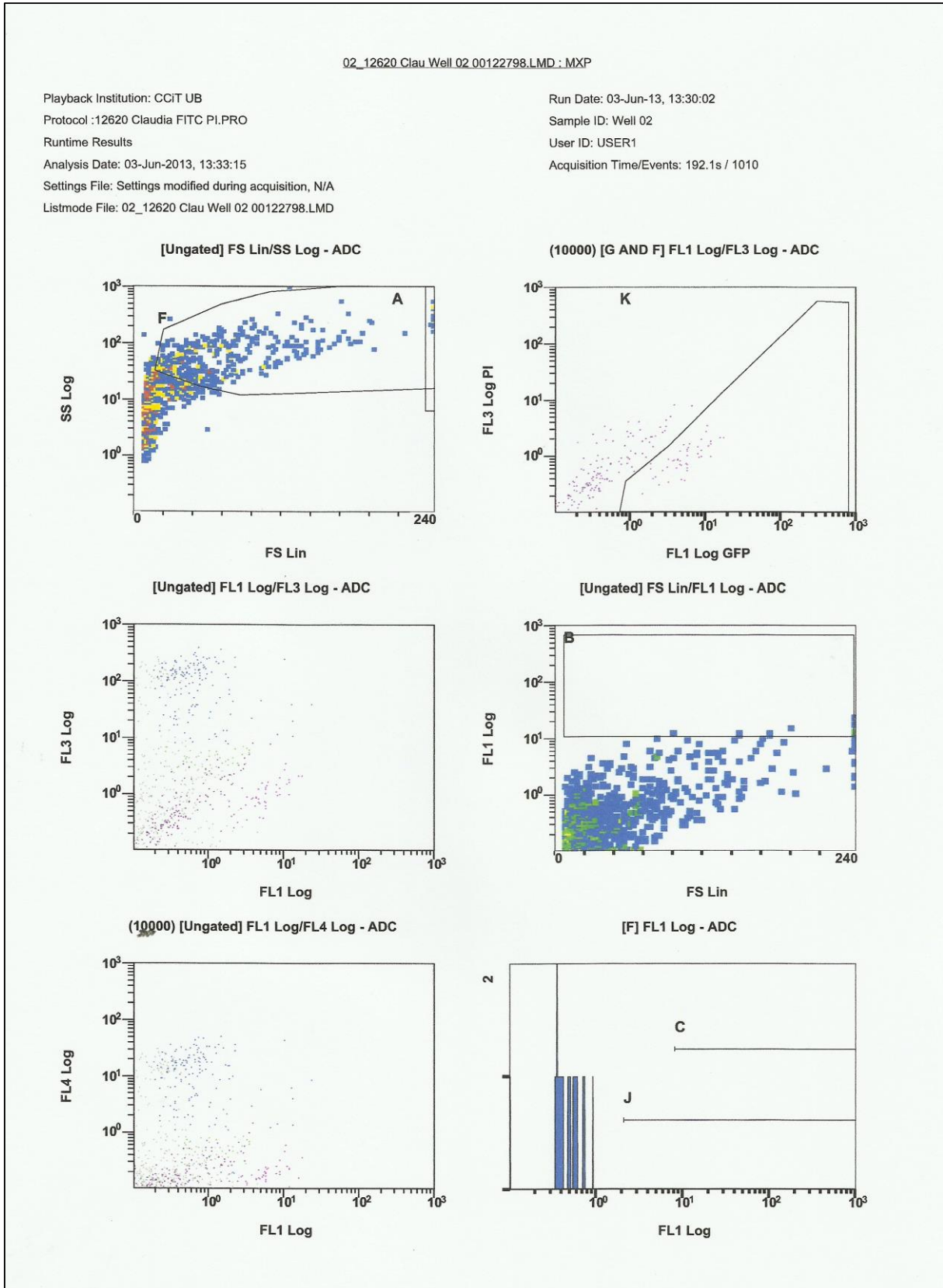
[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	4727	100.00	0.98	###
D	147	3.11	3.8	###

Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1



TRANSGÈNIQUES DIA 0 + NO TRANSGÈNIQUES DIA 6



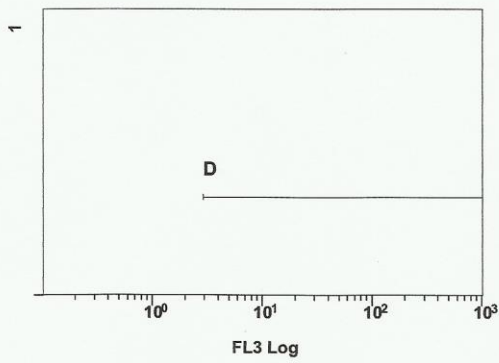


02_12620.Clau Well 02.00122798.LMD : MXP

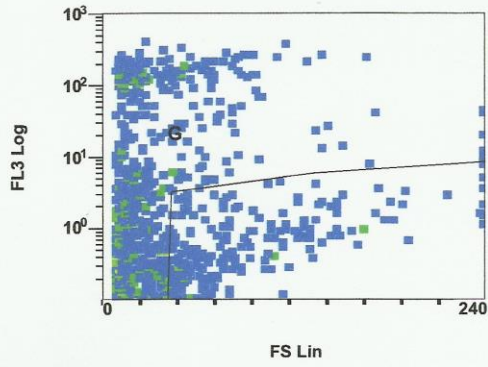
Playback Institution: CCIT UB
Protocol :12620 Claudia FITC PI.PRO
Runtime Results
Analysis Date: 03-Jun-2013, 13:33:16
Settings File: Settings modified during acquisition, N/A
Listmode File: 02_12620 Clau Well 02 00122798.LMD

Run Date: 03-Jun-13, 13:30:02
Sample ID: Well 02
User ID: USER1
Acquisition Time/Events: 192.1s / 1010

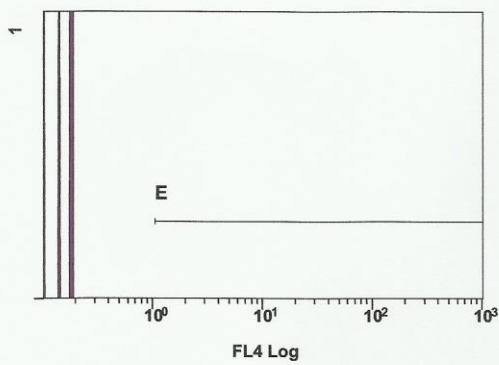
[G AND F] FL3 Log - ADC



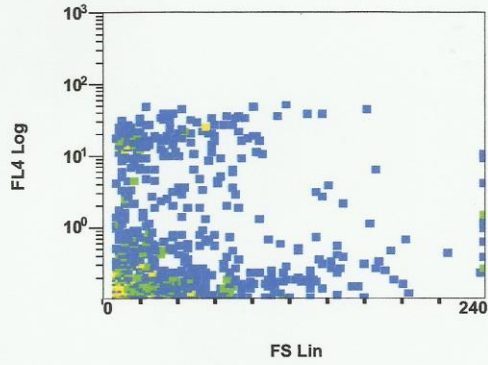
[Ungated] FS Lin/FL3 Log - ADC



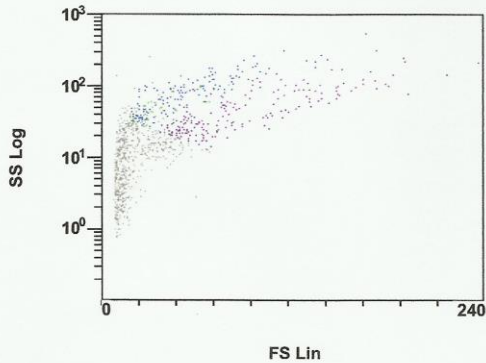
[G AND F] FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/SS Log - ADC





Playback Institution: CCiUT UB

Run Date: 03-Jun-13, 13:30:02

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 02

Runtime Results

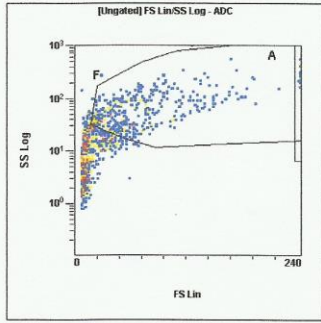
User ID: USER1

Analysis Date: 03-Jun-2013, 13:33:16

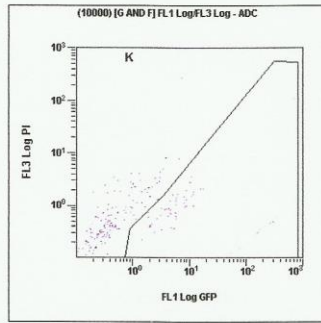
Acquisition Time/Events: 192.1s / 1010

Settings File: Settings modified during acquisition, N/A

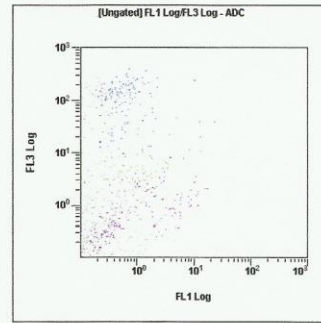
Listmode File: 02_12620 Clau Well 02 00122798.LMD



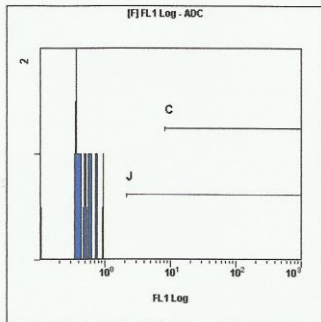
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1010	100.00	40.3	39.8
A	13	1.29	240	310
F	412	40.79	71.8	77.4



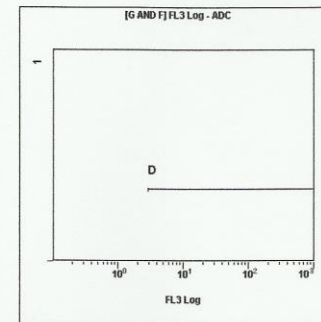
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	189	100.00	2.03	1.05
K	46	24.34	6.25	1.11



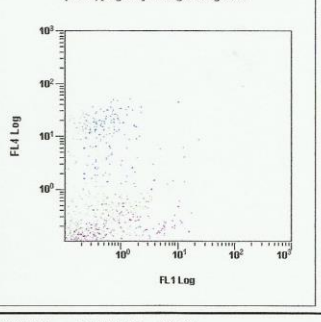
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1010	100.00	0.796	26.1



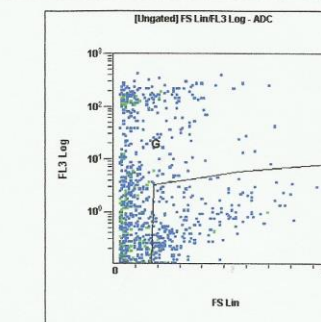
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	412	100.00	1.56	###
C	17	4.13	12.2	###
J	72	17.48	6.02	###



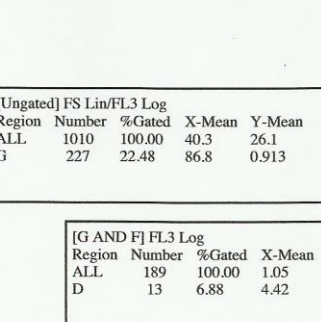
[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	189	100.00	1.05	###
D	13	6.88	4.42	###



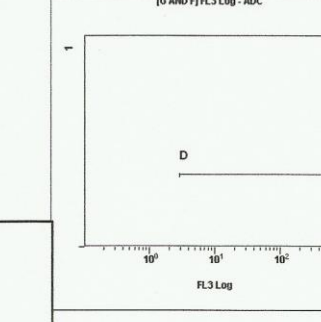
(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1010	100.00	0.796	3.41



Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2



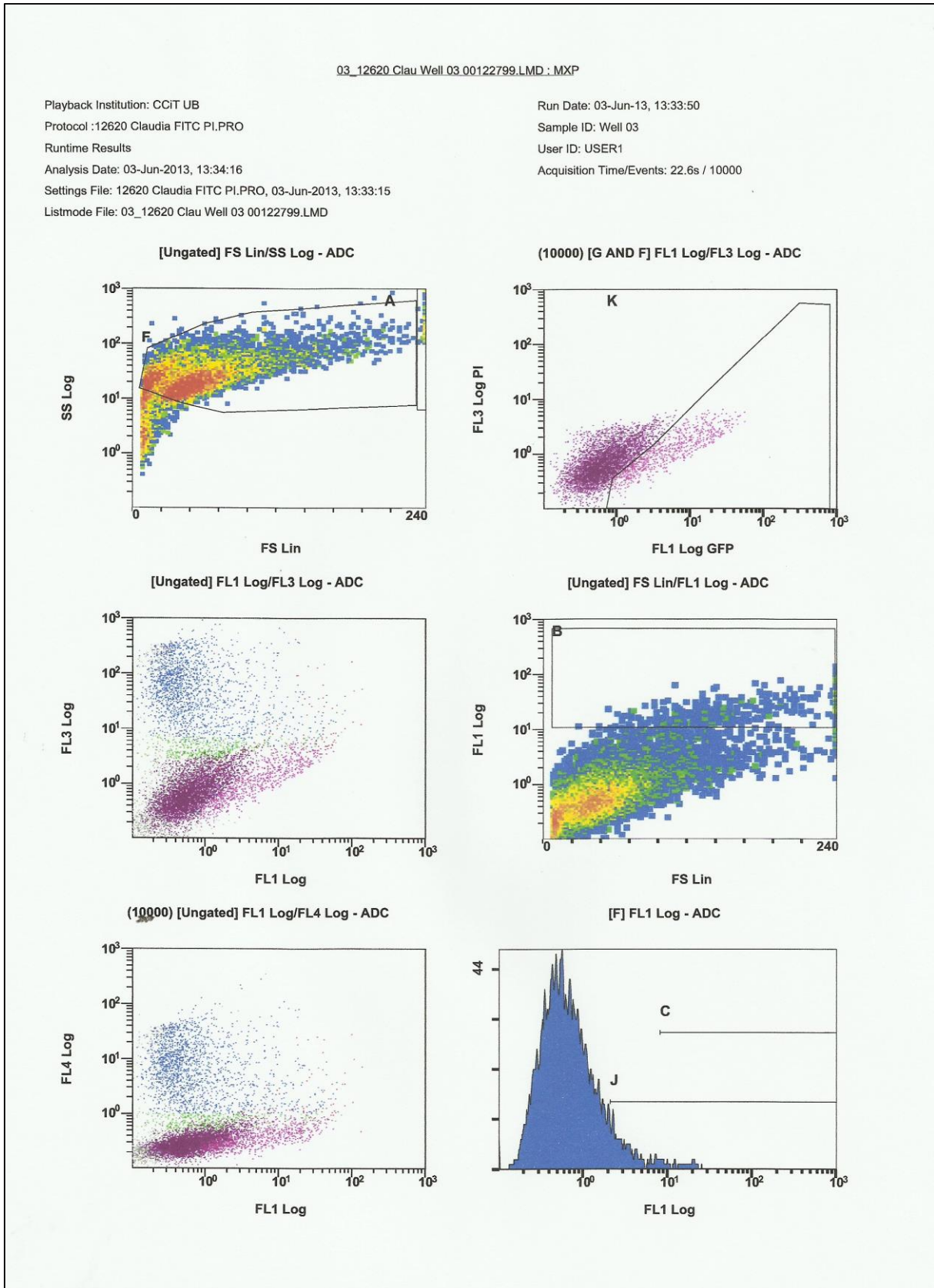
[Ungated] FS Lin/FL3 Log
Region Number %Gated X-Mean Y-Mean
ALL 1010 100.00 40.3 26.1
G 227 22.48 86.8 0.913



[G AND F] FL3 Log
Region Number %Gated X-Mean Y-Mean
ALL 189 100.00 1.05 ###
D 13 6.88 4.42 ###



DIA 6





03_12620 Clau Well 03 00122799.LMD : MXP

Playback Institution: CCIT UB

Protocol :12620 Claudia FITC PI.PRO

Runtime Results

Analysis Date: 03-Jun-2013, 13:34:16

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 03-Jun-2013, 13:33:15

Listmode File: 03_12620 Clau Well 03 00122799.LMD

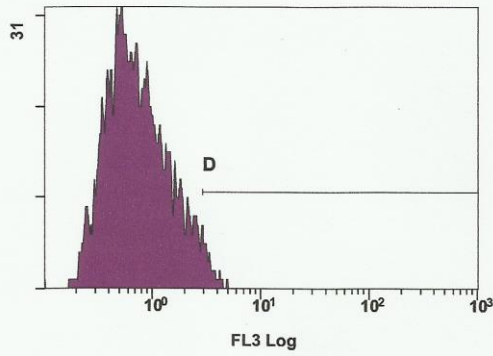
Run Date: 03-Jun-13, 13:33:50

Sample ID: Well 03

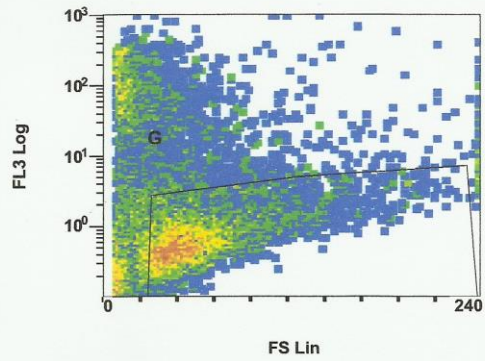
User ID: USER1

Acquisition Time/Events: 22.6s / 10000

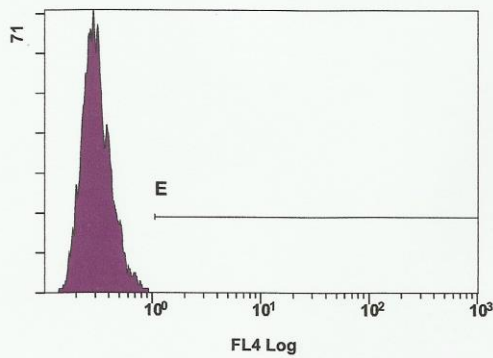
[G AND F] FL3 Log - ADC



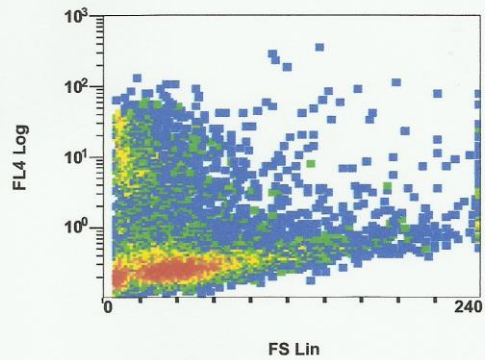
[Ungated] FS Lin/FL3 Log - ADC



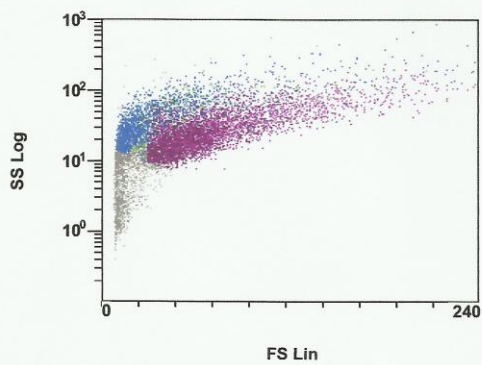
[G AND F] FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/SS Log - ADC

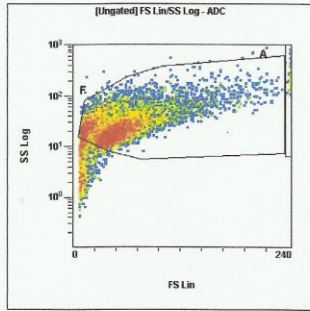




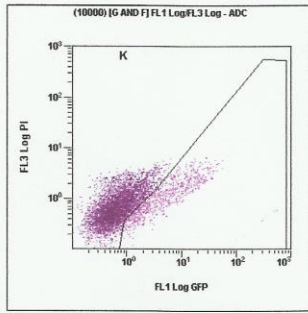
Playback Institution: CCIT UB
 Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO
 Runtime Results

Run Date: 03-Jun-13, 13:33:50
 Sample ID: Well 03
 User ID: USER1
 Acquisition Time/Events: 22.6s / 10000

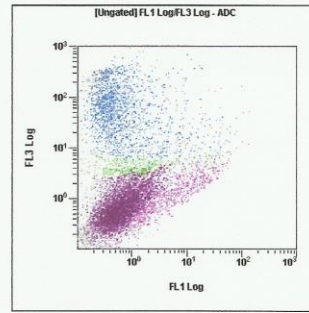
Analysis Date: 03-Jun-2013, 13:34:16
 Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 03-Jun-2013, 13:33:15
 Listmode File: 03_12620 Clau Well 03 00122799.LMD



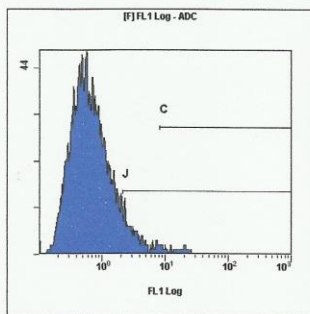
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	50.7	32.6
A	76	0.76	240	264
F	8477	84.77	55	34.4



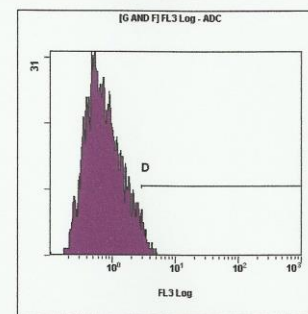
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5558	100.00	1.79	0.979
K	770	13.85	7.81	1.48



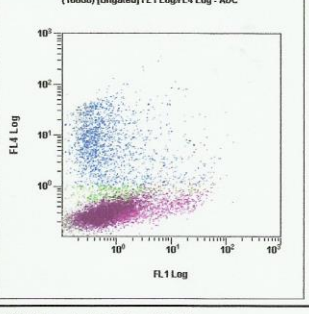
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	1.84	21.3



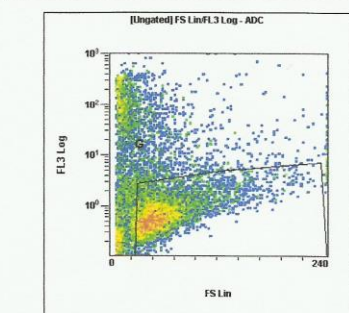
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	8477	100.00	1.8	###
C	363	4.28	19.2	###
J	1183	13.96	8.55	###



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5558	100.00	0.979	###
D	236	4.25	3.73	###

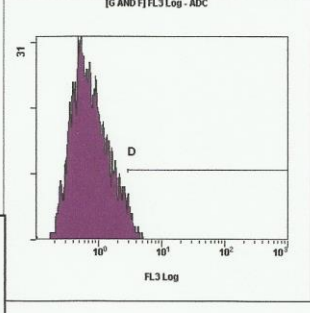


(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	1.84	2.92



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	50.7	21.3
G	5652	56.52	64	0.969

[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5558	100.00	0.979	###
D	236	4.25	3.73	###





DIA 8 (PRIMERA CITOMETRIA)

Playback Institution: CCIT UB

Run Date: 05-Jun-13, 15:14:43

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 02

Runtime Results

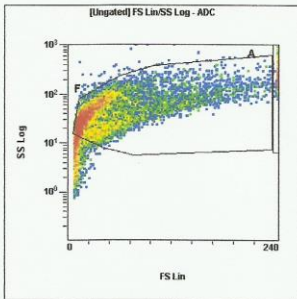
User ID: USER1

Analysis Date: 05-Jun-2013, 15:16:31

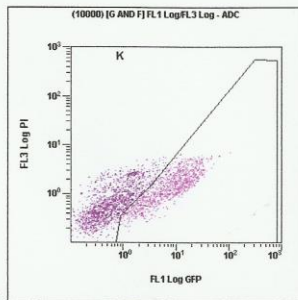
Acquisition Time/Events: 105.6s / 10000

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 05-Jun-2013, 15:14:09

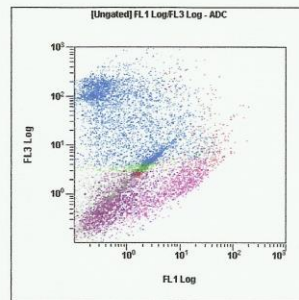
Listmode File: 02_12620 Clau Well 02 00122865.LMD



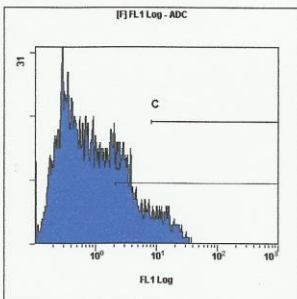
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	53.5	56.5
A	322	3.22	240	295
F	8219	82.19	53.2	54.1



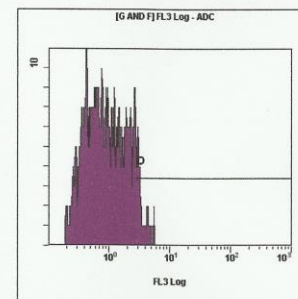
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	2470	100.00	4.72	1.3
K	959	38.83	10.8	1.81



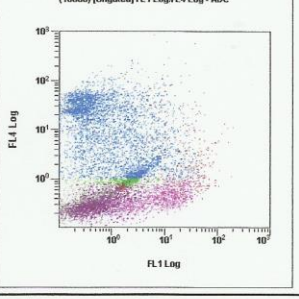
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	3.69	40



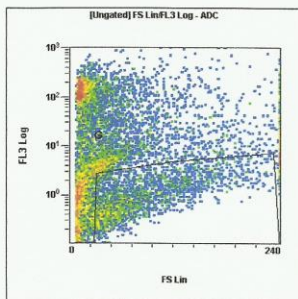
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	8219	100.00	3.02	###
C	821	9.99	17.4	###
J	2512	30.56	8.32	###



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	2470	100.00	1.3	###
D	246	9.96	3.94	###

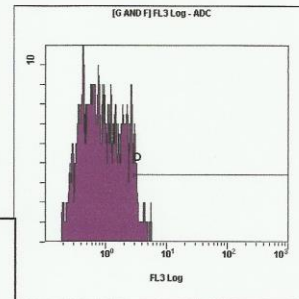


Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	3.69	9.87



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	53.5	40
G	2505	25.05	80.5	1.29

Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	2470	100.00	1.3	###
D	246	9.96	3.94	###

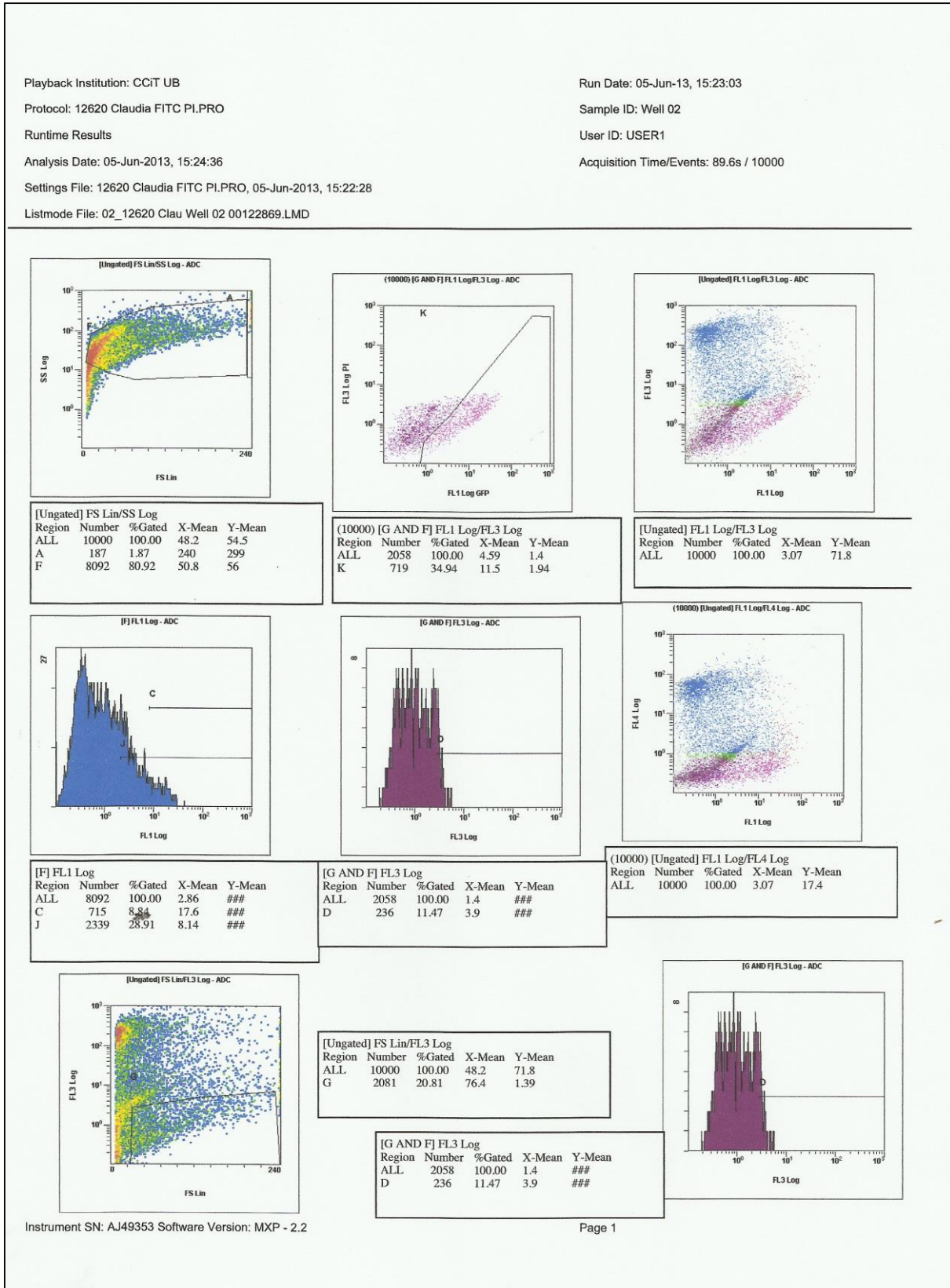


Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1

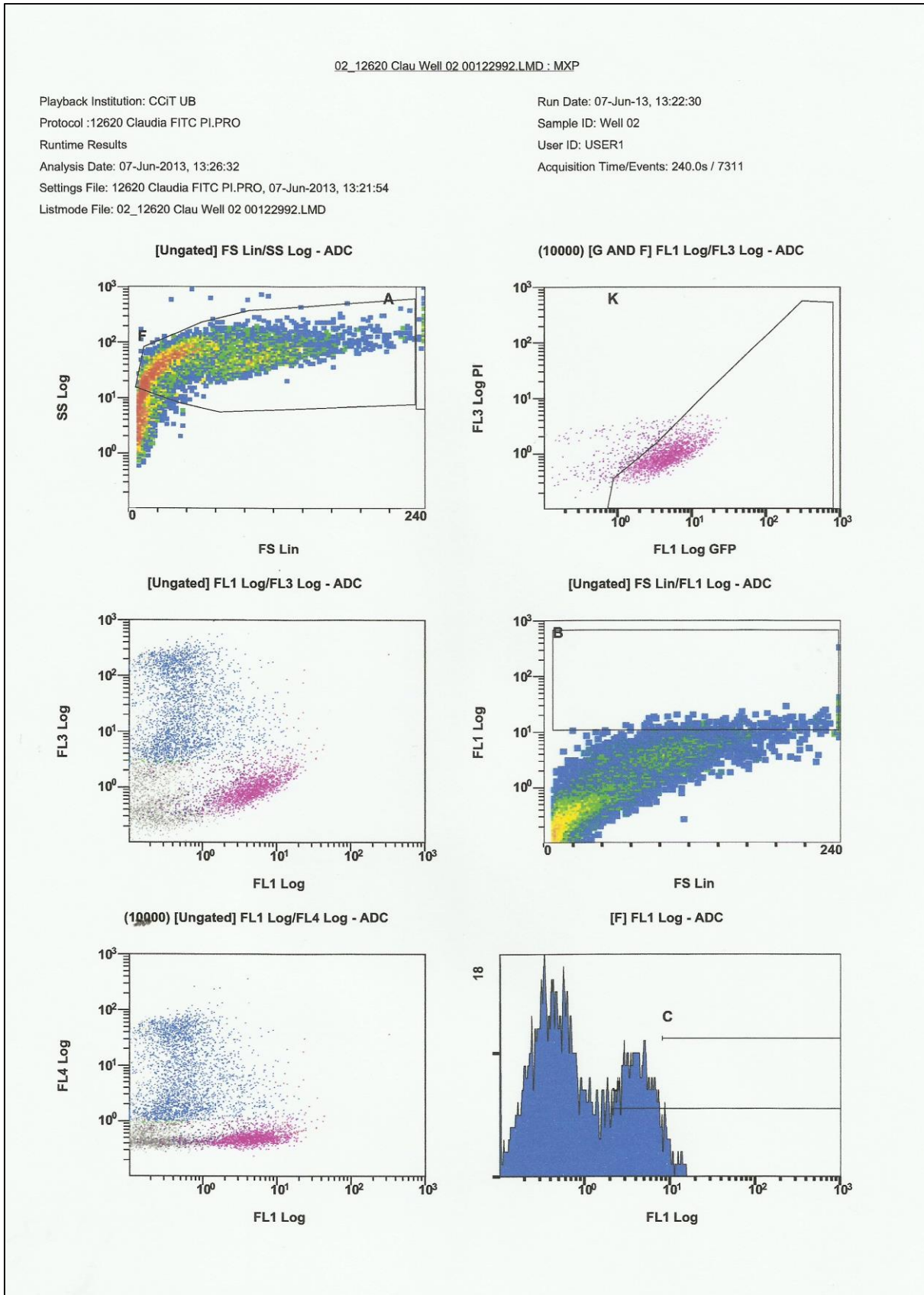


DIA 8 (SEGONA CITOMETRIA)





DIA 10





02_12620 Clau Well 02 00122992.LMD : MXP

Playback Institution: CCIT UB

Run Date: 07-Jun-13, 13:22:30

Protocol :12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 02

Runtime Results

User ID: USER1

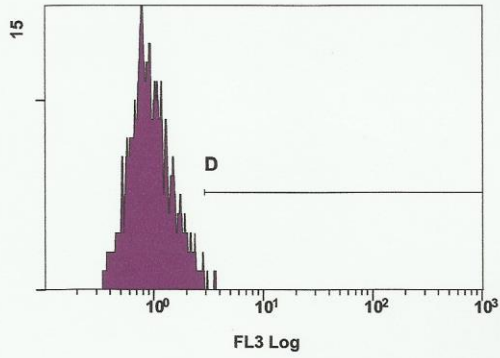
Analysis Date: 07-Jun-2013, 13:26:32

Acquisition Time/Events: 240.0s / 7311

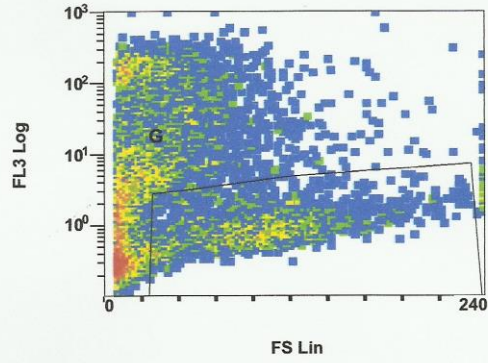
Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 07-Jun-2013, 13:21:54

Listmode File: 02_12620 Clau Well 02 00122992.LMD

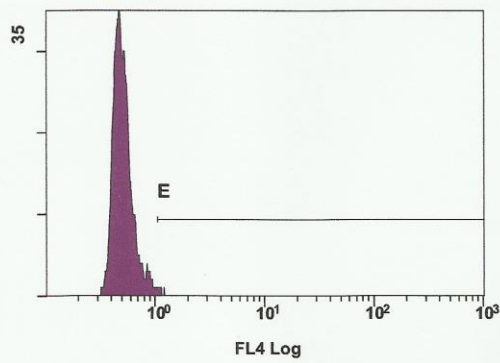
[G AND F] FL3 Log - ADC



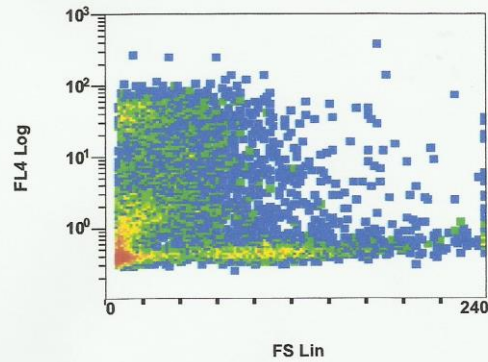
[Ungated] FS Lin/FL3 Log - ADC



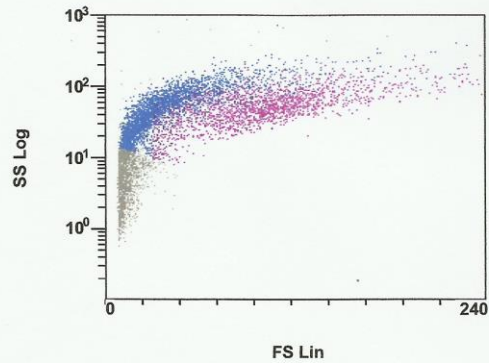
[G AND F] FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/FL4 Log - ADC



[Ungated] FS Lin/SS Log - ADC





Playback Institution: CCIT UB

Run Date: 07-Jun-13, 13:22:30

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Sample ID: Well 02

Runtime Results

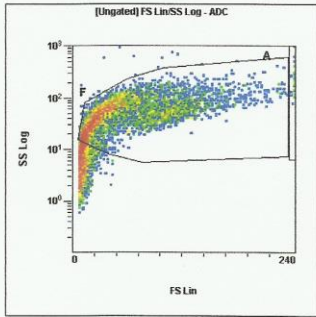
User ID: USER1

Analysis Date: 07-Jun-2013, 13:26:32

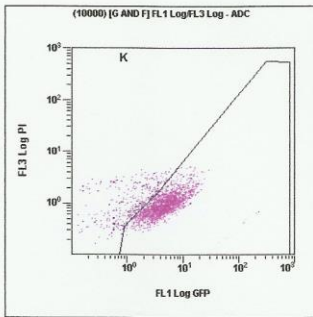
Acquisition Time/Events: 240.0s / 7311

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 07-Jun-2013, 13:21:54

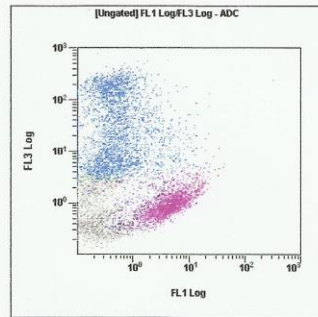
Listmode File: 02_12620 Clau Well 02 00122992.LMD



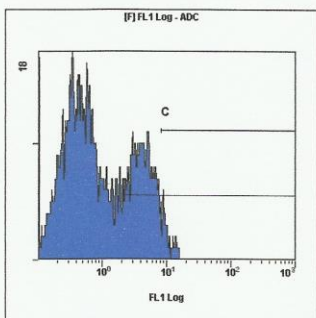
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	7311	100.00	48.1	46.5
A	45	0.62	240	232
F	5323	72.81	59.2	58.5



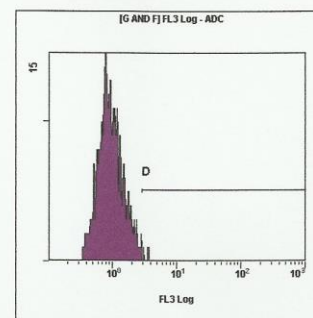
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1884	100.00	4.77	1.15
K	1533	81.37	5.49	1.08



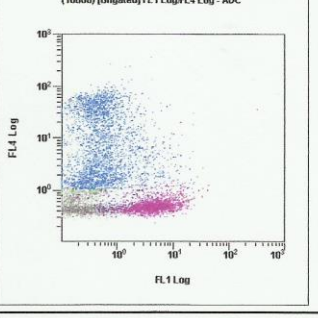
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	7311	100.00	1.86	31.5



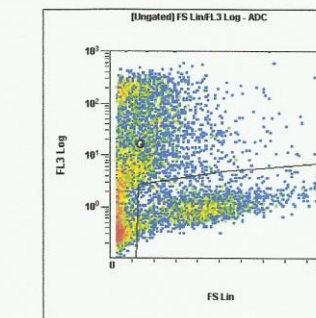
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5323	100.00	2.25	###
C	278	5.22	11.9	###
J	1745	32.78	5.61	###



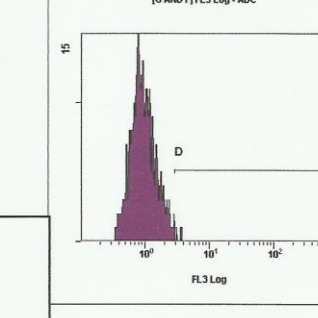
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1884	100.00	1.15	###
D	74	3.93	3.66	###



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	7311	100.00	1.86	7.92



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	7311	100.00	48.1	31.5
G	1918	26.23	95.9	1.14



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1884	100.00	1.15	###
D	74	3.93	3.66	###

Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

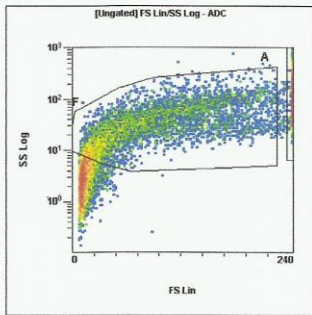
Page 1



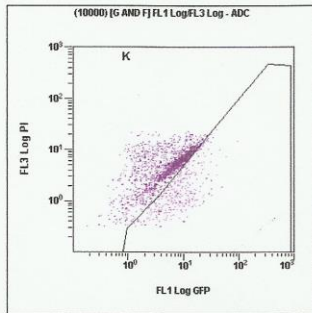
DIA 13 (PRIMERA CITOMETRIA)

Playback Institution: CCIT UB
 Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO
 Runtime Results
 Analysis Date: 10-Jun-2013, 13:09:51
 Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 10-Jun-2013, 13:08:39
 Listmode File: 02_12620 Clau Well 02 00123001.LMD

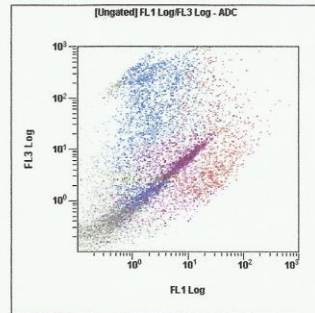
Run Date: 10-Jun-13, 13:09:14
 Sample ID: Well 02
 User ID: USER1
 Acquisition Time/Events: 33.7s / 10000



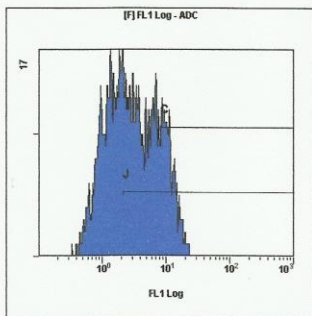
[Ungated] FS Lin/SS Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	82.9	42.5
A	1375	13.75	240	143
F	5003	50.03	85.4	41.8



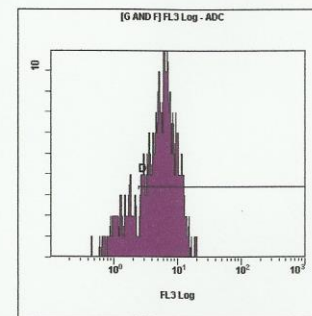
(10000) [G AND F] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1989	100.00	7.27	5.57
K	324	16.29	11.7	3.07



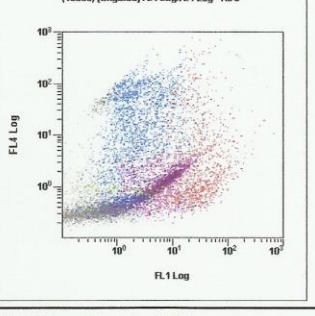
[Ungated] FL1 Log/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	7.52	51.1



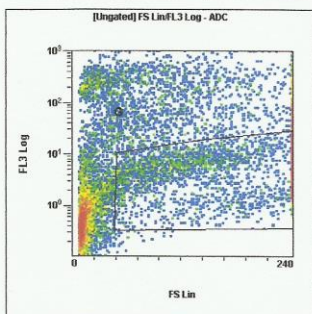
[F] FL1 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5003	100.00	4.82	###
C	949	18.97	13.5	###
J	2964	59.24	7.31	###



[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1989	100.00	5.57	###
D	1452	73.00	7.15	###

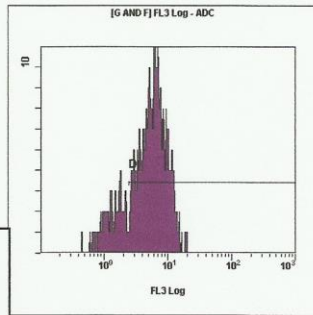


(10000) [Ungated] FL1 Log/FL4 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	7.52	13



[Ungated] FS Lin/FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	82.9	51.1
G	3029	30.29	160	6.29

[G AND F] FL3 Log				
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	1989	100.00	5.57	###
D	1452	73.00	7.15	###

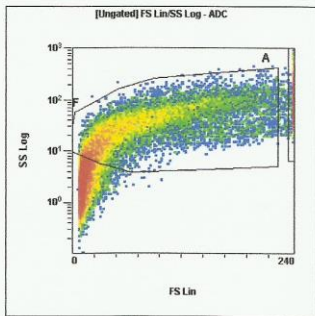




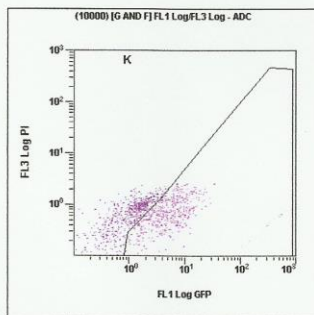
DIA 13 (SEGONA CITOMETRIA)

Playback Institution: CCIT UB
 Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO
 Runtime Results
 Analysis Date: 10-Jun-2013, 13:17:53
 Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 10-Jun-2013, 13:12:42
 Listmode File: 02_12620 Clau Well 02 00123003.LMD

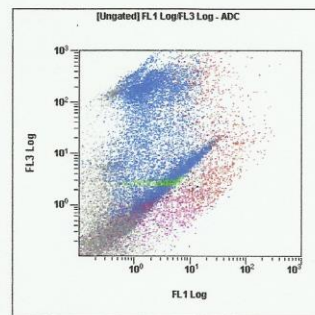
Run Date: 10-Jun-13, 13:13:53
 Sample ID: Well 02
 User ID: USER1
 Acquisition Time/Events: 236.1s / 29091



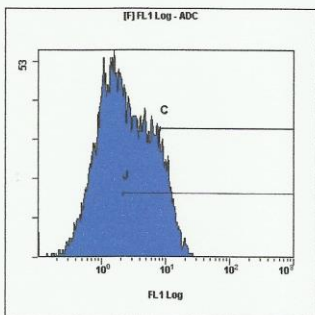
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	29091	100.00	59.6	29.4
A	1811	6.23	240	144
F	14227	48.91	75.5	38.2



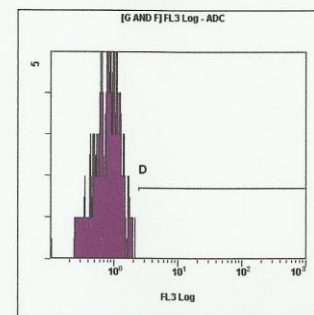
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	999	100.00	3.64	0.81
K	446	44.64	6.56	0.837



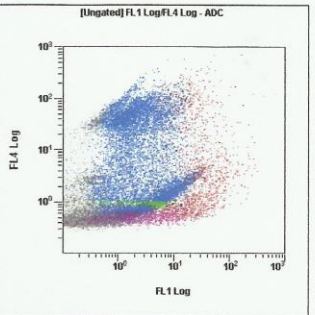
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	29091	100.00	4.13	47.4



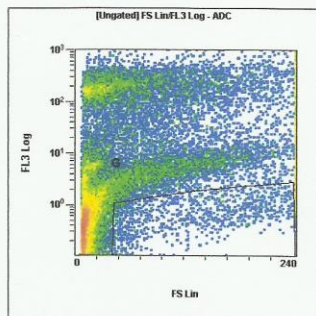
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	14227	100.00	3.94	###
C	1823	12.81	13.4	###
J	7280	51.17	6.61	###



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	999	100.00	0.81	###
D	4	0.40	2.61	###

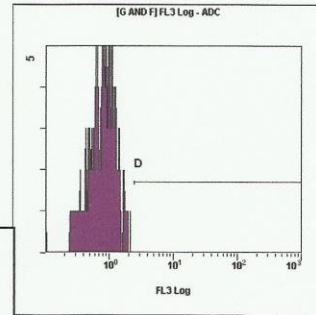


Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	29091	100.00	4.13	11.8



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	29091	100.00	59.6	47.4
G	1119	3.85	119	0.798

Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	999	100.00	0.81	###
D	4	0.40	2.61	###





ASSOLICIÓ DE LA PLURIPOTÈNCIA

Playback Institution: CCIT UB

Protocol: 12620 Claudia FITC PI.PRO

Runtime Results

Analysis Date: 05-Jun-2013, 15:18:07

Settings File: 12620 Claudia FITC PI.PRO, 05-Jun-2013, 15:17:20

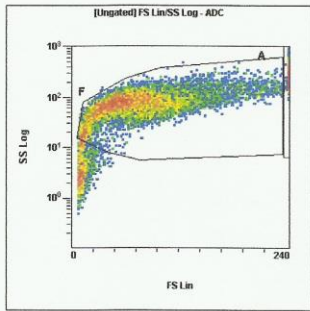
Listmode File: 04_12620 Clau Well 04 00122867.LMD

Run Date: 05-Jun-13, 15:17:55

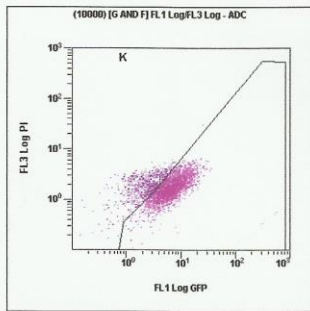
Sample ID: Well 04

User ID: USER1

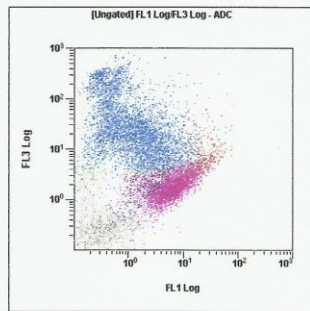
Acquisition Time/Events: 8.9s / 10000



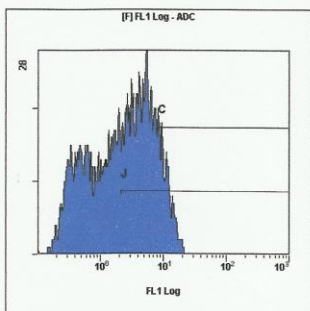
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	75.4	78.5
A	429	4.29	240	265
F	8199	81.99	76.9	80.8



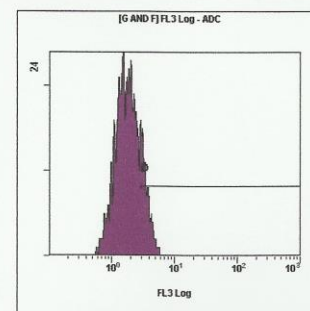
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3249	100.00	6.47	2.02
K	2478	76.27	7.64	1.96



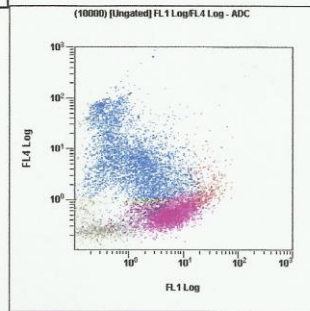
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	4.3	34.9



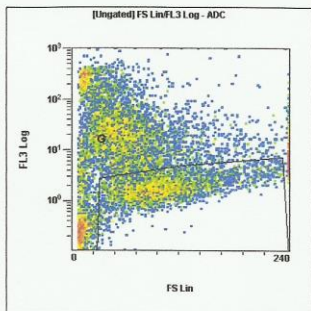
Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	8199	100.00	3.83	###
C	1075	13.11	12.2	###
J	4397	53.63	6.4	###



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3249	100.00	2.02	###
D	598	18.41	3.76	###

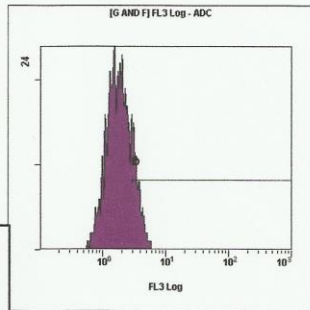


Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	4.3	8.98



Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	10000	100.00	75.4	34.9
G	3297	32.97	102	2

Region	Number	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3249	100.00	2.02	###
D	598	18.41	3.76	###



Instrument SN: AJ49353 Software Version: MXP - 2.2

Page 1



CONCLUSIONS DE CITOMETRIA

(Per explicar com analitzem els resultats de citometria, he agafat com a referència els resultats de la línia transgènica D0 (2)).

El primer gràfic (FS Lin/SS Log – ADC) és en el primer en el que ens hem de fixar. El que ens permet veure és tot allò que són cèl·lules, el que no ho són i els grups cel·lulars. Per saber-ho distingir, sabem que tots els puntets de dins del gate, per tant corresponents a la lletra F, són cèl·lules. Finalment només ens quedaria una part per analitzar que seria la part dreta del gràfic que es el conjunt de grups cel·lulars. Aquests, es troben fora del gate.

El segon gràfic va junt amb el tercer ([G AND F]FL1 Log/FL3 Log – ADC) i (FL1 Log/FL3 Log – ADC). En el segon gràfic, el que tenim és tot un conjunt de cèl·lules, tan vives com mortes. A més a més també hi ha alguna cosa que no ho és. Per tant el que es fa es separar les cèl·lules vives de la resta. Això es pot fer perquè les cèl·lules vives tenen fluorescència. En el tercer gràfic, a l'eix de la y, trobem la intensitat de fluorescència vermella, i a l'eix de les x, trobem la intensitat de fluorescència verda. El que sol ser amb aquest gràfic, és agafar la diagonal i treure les conclusions que el principi, o sigui la part que està a 0, és a on les cèl·lules no són fluorescentes. A mesura que s'avança per la diagonal la fluorescència va augmentant fins a tal punt en què si es troben cèl·lules al final de tot de la diagonal, aquestes tindran autofluorescència i per tant no es considerarà fluorescent. A més a més de controlar la fluorescència, aquest gràfic ens permet saber les cèl·lules que estan vives (les que estan dins del gate).

El quart gràfic (FL1 Log - ADC) el que ens permet és observar la intensitat de fluorescència verda. La J en aquest cas representaria el nombre de cèl·lules que considerem verdes. A l'eix de la x trobaríem la intensitat i a l'eix de la y, la fluorescència.

El cinquè gràfic ([G AND F] FL3 Log – ADC) el que ens ve a dir és el nivell d'autofluorescència vermella. Per tant, aquelles cèl·lules que no necessiten cap fluoròfor. Aquest gràfic es torna a fer més endavant i per tant és el mateix que el vuitè gràfic.



El sisè gràfic (FL1 Log/FL4 Log – ADC) ens serveix per comparar la intensitat de fluorescència verda amb la de vermell llunyà (es sol comparar les cèl·lules que es troben en diagonal - autofluorescència -). La taca rosa el que representa és una població cel·lular amb fluorescència verda, i la taca verda, són tot el que considerem cèl·lules sense fluorescència verda).

El setè gràfic (FS Lin/FL3 Log – ADC), és el gràfic a on s'ajunten totes les dades aconseguides anteriorment. El que es vol saber és la morfologia de les cèl·lules. La lletra G i tots els puntets que hi ha dins del gate, representen les cèl·lules vives.

D'altra banda, tots els puntets que hi ha fora del gate són cèl·lules mortes. A l'eix de la y el que trobem és el control d'intensitat de fluorescència vermella (això és gràcies al iodur de propidi que només es troba a les cèl·lules mortes). Totes les cèl·lules d'aquest gràfic, tant les vives com les mortes, són les mateixes que les del gate del primer gràfic.

El dotzè gràfic (FS Lin/FL1 Log – ADC) el que ens permet és comparar la intensitat de fluorescència verda amb la morfologia de la cèl·lula. Per tant, ens donen informació de l'estat en el qual estan totes les cèl·lules i també ens serveix per dir quines són les cèl·lules que ens interessin i les que no.

El dissetè gràfic (FL4 Log – ADC) ens mostra el nombre de cèl·lules que hi ha a cada punt d'intensitat de fluorescència. En aquest cas seria la fluorescència de vermell llunyà però com que a nosaltres ens interessa la fluorescència verda (GFP) o cèl·lules tenyides de iodur, en aquest cas parlariem d'autofluorescència.

El divuitè gràfic (FS Lin / FL4 Log – ADC) el que fa és comparar la morfologia de la cèl·lula amb la intensitat de fluorescència. En aquest cas es mira la fluorescència de vermell llunyà.

Per controlar el nivell de fluorescència de les cèl·lules, tant les de la línia cel·lular transgènica com la no transgènica, m'he centrat en els resultats de citometria dels dies 0,8,13 i el dia en què les cèl·lules assoleixen la pluripotència. He escollit aquests dies perquè representen el principi, la meitat i el final de l'experiment. A continuació faré dos gràfics a on es podrà veure l'evolució de la fluorescència i així poder comparar una línia cel·lular amb una altra (*Fig. 56 i 57*).

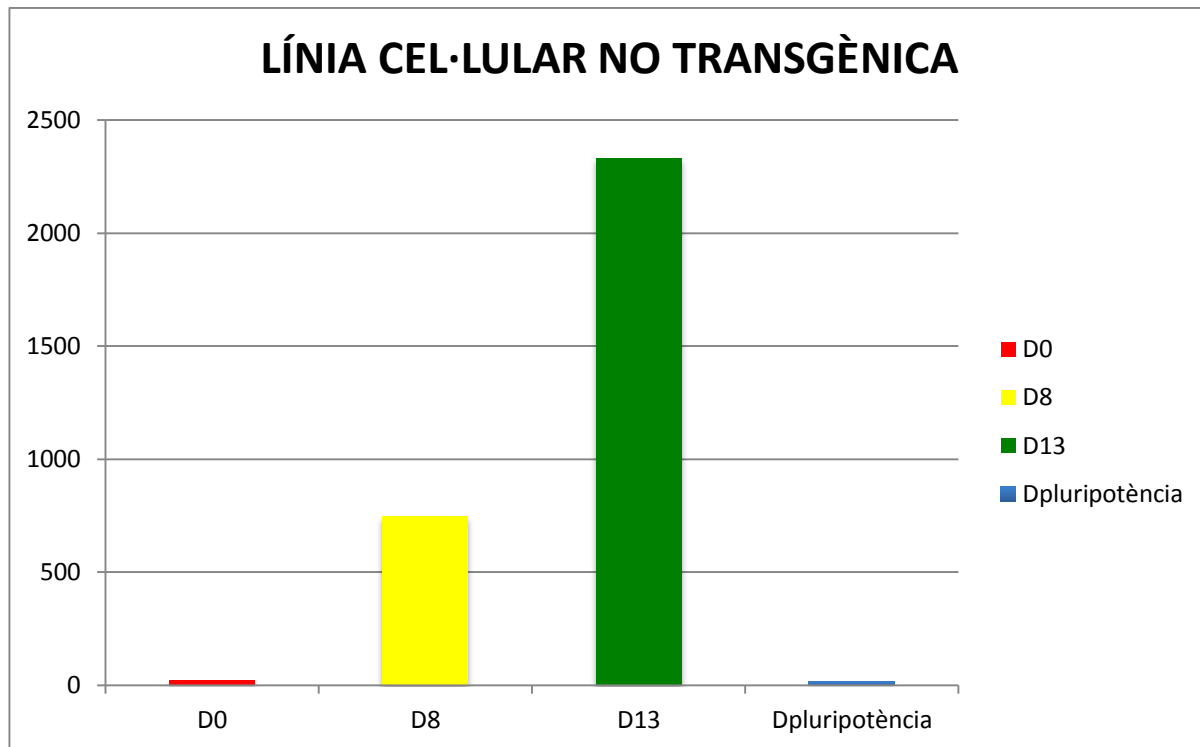


Figura 56 Gràfic línia cel·lular no transgènica

❖ Fluorescència línia cel·lular no transgènica:

Dia 0: 20 cèl·lules fluorescents.

Dia 8: 749 cèl·lules fluorescents.

Dia 13: 2333 cèl·lules fluorescents.

Dia associació pluripotència: 16 cèl·lules fluorescents.

❖ Fluorescència línia cel·lular transgènica:

Dia 0: 1763 cèl·lules fluorescents.

Dia 8: 2339 cèl·lules fluorescents.

Dia 13: 2964 cèl·lules fluorescents.

Dia associació pluripotència: 4397 cèl·lules fluorescents.

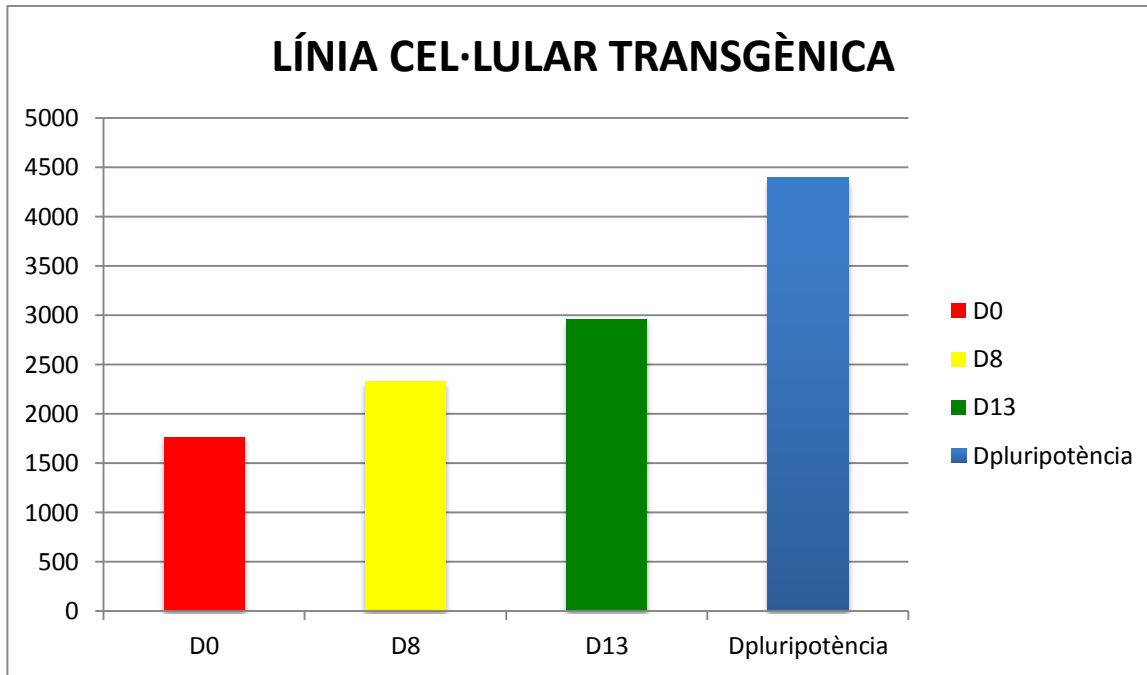


Figura 57 Gràfic línia cel·lular transgènica

Ara que ja tenim els dos gràfics que ens mostren les cèl·lules amb fluorescència, podem comparar fàcilment una línia cel·lular amb l'altra.

Mentre que la línia cel·lular transgènica té un augment consecutiu i estable del nombre de cèl·lules amb fluorescència fins el dia d'assolició de la pluripotència, la línia cel·lular no transgènica, comença amb un nombre de cèl·lules fluorescents bastant baix i de cop té un augment considerat que correspon al dia 8. A més a més a partir del dia 8, el nombre de cèl·lules fluorescents té un augment molt important que anirà acompanyat d'una forta davallada quan aquestes cèl·lules assoleixin el nivell de pluripotència.



3. ESTÀNCIA A L' IQS

Paral·lelament a la investigació que he estat fent a l' IBEC, com he esmentat anteriorment, vaig tenir l'oportunitat d'assistir a un altre projecte d'investigació, en aquest cas, a l'IQS. Aquest experiment es va dur a terme amb l'ajut dels diners aconseguits per la Marató de Tv3. Els diners es van destinar a la recerca entorn la diabetis. Vaig poder contactar amb el professor i cap del projecte, Carlos Semino. Després de la primera entrevista, en Carlos em va fer una explicació de en què consistiria l'experiment. Vaig creure que era un projecte molt interessant ja que utilitzava les mateixes tècniques emprades amb les investigacions amb cèl·lules mare i vaig creure que em serviria per complementar la recerca de l' IBEC.

La recerca d'aquest experiment consistia en dos objectius. Per això es van fer dos models de cultius: un en 2D i un altre amb 3D (l'experiment es basarà bàsicament en el cultiu 3D). El primer objectiu era l'estudi i la caracterització del RAD16 que és un pèptid. I el segon objectiu era l'avaluació de la influència del microentorn sobre el fenotip maligne del ductal pancreàtic adenocarcinoma.

Degut al temps que es necessita per arribar a uns resultats, m'ha semblat interessant fer-ne unes pinzellades (de la recerca) degut a la importància que es dóna aquí a Catalunya a la Marató, dedicada a la recerca científica. M'ha fet molta il·lusió poder formar part d'aquest projecte degut a la seva importància.



4. ARTICLES ACTUALS RELACIONATS AMB LES CÈL·LULES MARE



Ciència

« Enrere

1 comentari [Enviar un comentari](#)

★ A- A A+

Primeres cèl·lules mare d'embrions humans clonats

Un equip de científics dels EUA aconsegueix per primer cop derivar línies cel·lulars a partir d'embrions obtinguts per transferència nuclear

La clonació terapèutica obre noves portes a la medicina regenerativa, però crea recels

16/05/13 02:00 - BARCELONA - **Redacció**

Fa gairebé deu anys, el científic coreà Hwang Woo-suk revolucionava el món científic en anunciar que havia aconseguit clonar 30 embrions humans i que n'havia obtingut línies cel·lulars. La fita, publicada a Science, va resultar ser un frau, tal com es va descobrir anys més tard, i no ha estat fins ara que un altre equip d'investigadors, del Centre Nacional d'Oregon per a la Investigació amb Primats (ONPRC), ha assolit finalment el repte que pot obrir la porta a la clonació terapèutica. Liderats pel rus Shoukhrat Mitalpov, l'equip d'Oregon ha estat capaç d'obtenir cèl·lules mare a partir d'embrions humans clonats. La recerca ha estat publicada a la revista Cell.



La investigació és la culminació dels treballs duts a terme durant anys amb macacos. De fet, el 2007, Mitalpov ja va aconseguir clonar embrions de macaco i en va derivar línies cel·lulars. Una de les integrants de l'equip de Mitalpov (i coautora de l'article) és l'embrionòloga Núria Martí Gutiérrez, que va ser acomiadada amb un ERO del Centre d'Investigació Príncep Felip de València.

La tècnica utilitzada per obtenir els embrions clonats és la de la transferència nuclear i, de fet, és la mateixa, tot i que molt perfeccionada, que es va utilitzar amb l'ovella Dolly a mitjan anys 90. Mitalpov va utilitzar òvuls de donant de molt bona qualitat (tal com destaca al seu article), als quals va retirar el nucli per reemplaçar-lo pel nucli de cèl·lules de la pell d'un pacient, en aquest cas afectat de síndrome de Leigh, una malaltia que afecta el sistema nerviós. Per obtenir un embrió viable –altres investigacions que han intentat fer el mateix han fracassat quan l'embrió tenia pocs dies–, Mitalpov ha hagut de perfeccionar la tècnica de la transferència nuclear; per exemple, utilitzant una solució enriquida amb cafeïna que ha facilitat el procés.

El resultat d'aquest procés és l'embrió clonat, que conté el mateix material genètic del donant. La idea de la clonació amb finalitats terapèutiques és armar a obtenir cèl·lules mare que s'acabin diferenciant en teixits sans que puguin ajudar a regenerar-ne d'altres de danyats i que, alhora, siguin genèticament compatibles amb els pacients. L'equip d'Oregon ha aconseguit fins a quatre línies cel·lulars diferenciades. Per contra, aquesta tècnica també obre la porta al fantasma de la clonació amb finalitats reproductives.

LA FRASE

5.7.1996

El naixement

de Dolly impulsa la recerca en el camp de la clonació. L'ovella va morir el 2003.

La troballa ofereix noves formes de generació de cèl·lules mare per als pacients amb teixits danyats

Shoukhrat Mitalpov
INVESTIGADOR PRINCIPAL

Un cava especial per a unes festes històriques
Ajuda a finançar l'ANC

59,70 €
LA CASA DE 6 AMPOLLES

Infórmate en: euro6000.com

Enquesta



Creieu necessari que el Barça tingui un estadi nou?

- Sí
- No

[Vota](#) [Resultats](#)

¿Su lavavajillas es uno de los afectados?

Revise su modelo

Comprueba aquí si su lavavajillas está entre los afectados.

El llegat dels ossos Dolores Redondo



Una vacuna prevé el desenvolupament de la diabetis tipus 1 en ratolins

Investigadors del Germans Trias i Pujol han elaborat una teràpia que reeduca les cèl·lules per prevenir la diabetis en humans

ARA Barcelona | Actualitzada el 15/05/2013 23:00

★ El recomano 0 1 Comentaris

El Grup d'immunologia de la Diabetis de l'Hospital Germans Trias i Pujol ha elaborat una nova teràpia que evita l'aparició de la diabetis tipus 1, en ratolins que espontàniament pateixen aquesta malaltia. El tractament consisteix a extreure del cos mitjançant una vacuna les cèl·lules dendrítiques del sistema immunitari i modificar-les científicament. Quan es reintrodueixen, aquestes ajuden a frenar la destrucció de les cèl·lules productores d'insulina.

Segons els investigadors, aquesta estratègia podria ser la base per prevenir la diabetis i altres malalties de causa autoimmunitària en humans, tot i que falta ampliar els experiments i encara no es pot constatar del cert. Les primeres conclusions s'han publicat aquest dimecres a la revista científica PLOS ONE.



L'equip d'immunòlegs que ha publicat el seu treball sobre la diabetis tipus 1. / Germans Trias i Pujol

El procediment d'experimentació s'ha produït amb ratolins que estan en fase prediabètica, a punt de desenvolupar la malaltia. Se'ls ha extret les cèl·lules dendrítiques per modificar-les in vitro perquè aconseguissin captar cèl·lules beta en fase de mort cel·lular programada. Així, quan es tornen a reintroduir, generen al sistema immunitari tolerància cap a les cèl·lules beta, frenant la destrucció i prevenint també l'aparició de la diabetis tipus 1.

Aquest treball obre la porta a evitar el desenvolupament d'aquesta i també d'altres malalties autoimmunitàries en humans, ja que reeduca el sistema immunitari perquè eviti l'avenç de l'autodestrucció i restauri la tolerància cap als propis teixits. En l'experiment hi han col·laborat el Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) i l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, amb el finançament de l'Institut de Salut Carlos III.

Desenvolupen un fetge per a humans a partir de cèl·lules mare

05.07.2013 | 07:32

EFE | LONDRES Un equip de científics japonesos de la Universitat de Yokohama ha desenvolupat un fetge funcional per a éssers humans a partir de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPS), segons publicava ahir la revista científica Nature. Aquesta investigació, realitzada amb ratolins, podria suposar un gran avenç en la medicina regenerativa, un cop provada clínicament, perquè solucionaria l'escassetat de donants per curar malalties per insuficiència dels òrgans en fase terminal. Tot i que encara queda per comprovar, almenys en set anys, si aquestes tècniques podrien funcionar en humans, el treball aporta una gran demostració del potencial terapèutic d'aquest tipus de trasplantaments.



Carne sin remordimiento

La primera hamburguesa a partir de células madre ha costado cinco años de investigación y 248.000 euros

EL PAÍS | 7 AGO 2013 - 00:00 CET

Archivado en: Opinión · Células madre · Investigación científica · Alimentos · Ciencia
Bienes consumo



MARCOS SALFAGÓN

La llamada hamburguesa de laboratorio, creada a partir de células madre de vacuno, es un gran paso para el hombre y para las vacas. Lo del gran paso se entiende porque gracias a los esfuerzos de Mark Post y un equipo de científicos holandeses se podrá —en el futuro— fabricar carne y hacer frente de esta forma a la escasez mundial de alimentos; con un impacto medioambiental muy bajo, además. La producción de carne en el laboratorio es una de las pocas respuestas factibles para alimentar a una población que crece en progresión geométrica, como nos advirtió Malthus.

Pero estamos en la primera fase, la de la investigación culminada con éxito.

f 78

t 62

in 0

3

Enviar

Imprimir

Compartir

Por el momento, hay un problema de caja para los consumidores potenciales. La primera hamburguesa a partir de células madre ha costado cinco años de investigación y 248.000 euros. Un poco lento para un burger y un poco caro para los devoradores de fast food. Debemos esperar además que con células madre se puedan fabricar también chuletones, solomillos, entrecots, osobucos y rabo de toro: no todo va a ser comida rápida envuelta en papel y servida entre cartones.

También hay un problema serio con el sabor. Los críticos gastronómicos que probaron la hamburguesa sintética —cocinada por un chef de relumbrón, Richard McCowan— transmitieron impresiones animosas, pero caóticas: "Está cerca de la carne, aunque no es tan jugosa", "echo de menos sal y pimienta" o "el bocado tiene el tacto de una hamburguesa; lo que resulta distinto es el sabor". No aportan demasiada información; dicen lo mismo (falta el "parece cordero") que los encuestados a la salida de cualquier franquicia actual de hamburguesas. La solución consiste en que además de células madre de vaca utilicen células madre de madre o de Arguiñano para que den algo de sabor a la carne cultivada.

Falta por entender un aspecto crucial de esta revolución cárnica. El animal no sufre, no hay hecatombes vacunas ni el consumidor tiene que sentirse culpable por la sangre derramada de las bestias. Será, más o menos, como devorar vegetales o legumbres. Para los carnívoros conscientes, una decepción; para los veganos, un aliciente. ¿Que hubieran dicho Pedro Pícapiedra y Obélix?



Un corazón de ratón reconstruido con células madre humanas vuelve a latir

- El trabajo está en la línea con una futura creación de órganos
- Servirá para estudiar medicaciones y posibles terapias para infartos

EMILIO DE BENITO | Madrid | 13 AGO 2013 - 17:52 CET

pp 25

Archivado en: Células madre Investigación médica Cardiología Infarto miocárdio
Enfermedades cardiovasculares Genética Especialidades médicas Biología Investigación científica

Enviar video



LEE YANG ET AL (NATURE)

1.449
 491
 20
 9
 Imprimir
 Compartir

Fabricar corazones sería la mejor solución para muchos enfermos que aún dependen de un trasplante (solo en España se realizan unas 250 intervenciones de este tipo al año y aproximadamente otro número similar de personas pasa por las listas de espera en ese periodo, según la Organización Nacional de Trasplantes). Pero el órgano es muy complejo y su papel tan importante que los pasos hay que darlos con sumo cuidado. Investigadores de la Universidad de Pittsburgh publican hoy en *Nature Communications* un prometedor trabajo en esta dirección: la reconstrucción de un corazón a partir de uno de ratón al que se le han quitado las células hasta quedarse con su andamiaje, y que se sembró después con células madre de origen humano. Se trata solo de algo parcial, pero la estructura, a los 20 días de irrigarse con sangre, volvió a latir, lo que se considera el primer paso para un futuro órgano biosintético.

El trabajo sigue las pautas de lo que se ha hecho con otros órganos relativamente más sencillos, como una tráquea o un riñón o hígado. En España trabaja en la misma idea [Francisco Fernández Avilés](#). Para crearlo, se tomó un corazón y se le quitaron las células vivas mediante una especie de detergentes biológicos. El resultado fue una estructura inerte, el andamiaje que da la forma tridimensional al corazón. Por otro lado se tomaron células adultas humanas y se reprogramaron hasta convertirlas en un tipo de células madre (las iPS), que, a su vez, se derivaron en progenitores multipotenciales cardiovasculares, un tipo de material que es la base de los tres tejidos fundamentales de un corazón: los cardiomiocitos, células endoteliales y las de tejido muscular liso. A los 20 días, el complejo empezó a latir.



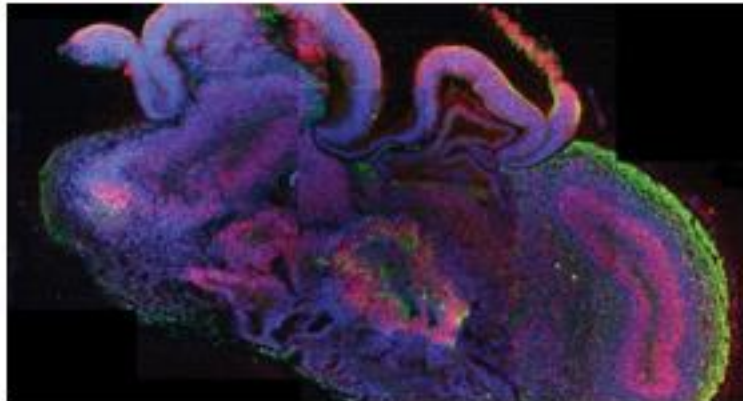
Creados microcerebros humanos a partir de células madre

- Científicos de Viena logran 'organoides' de 4 milímetros que desarrollan las capas del córtex
- Son un modelo sin precedentes para investigar el desarrollo neuronal

JAVIER SAMPEDRO | Madrid | 26 AGO 2013 - 18:16 CET

108

Archivado en: Investigación médica, Células madre, Especialidades médicas, Genética, España, Investigación científica, Biología, Enfermedades, Ciencias naturales, Ciencia, Medicina, Sociedad



Invágenes del microcerebro, con sus distintos tipos celulares. / MADELINE A. LANCASTER (NATURE)

3.398
 782
 32
 48

Enviar
 Imprimir
 Compartir

La tecnología de las células madre nos tiene curados de espanto en los últimos años con la generación en el laboratorio de intestinos, pituitarias, retinas humanas y hasta hamburguesas de vacuno listas para su consumo. La línea roja era hasta ahora el cerebro, el órgano que nos permite pensar, sentir y reconocernos en un espejo como un yo autoconsciente, y la estructura más compleja de la que tenemos constancia en este universo de proporciones inimaginables. Madeline Lancaster, Juergen Knoblich y sus colegas del Instituto de Biotecnología Molecular de Viena se saltan ahora esa frontera al cultivar en el laboratorio unos minicerebros humanos, u organoides cerebrales del tamaño de un guisante que desarrollan espontáneamente las estructuras y capas neuronales del córtex, la sede de la mente humana. ¿Puede crearse una mente en el tubo de ensayo?

La respuesta es: aún no. Los científicos de Viena ni siquiera admiten estar intentando nada parecido. Su intención es construir un sistema modelo del cerebro humano que permita estudiar con una precisión sin precedentes su proceso de desarrollo en el feto, y también los fundamentos de las enfermedades neurológicas. De hecho, en el trabajo que presentan en el artículo principal de Nature no solo demuestran la generación de minicerebros a partir de células madre embrionarias humanas, sino también la de minicerebros enfermos, obtenidos de células madre IPS —o reprogramadas— de pacientes de microcefalia, una dolencia hereditaria que devuelve el cerebro humano al tamaño del de un australopiteco o un chimpancé. Y lo que ocurre en esos organoides ofrece una clave importante de las causas profundas de esa enfermedad.

Los 'cerebroides' se han mantenido vivos de momento durante 10 meses



El CNIO consigue reprogramar células madre embrionarias dentro del cuerpo

- Su capacidad de diferenciación supera la conseguida en el laboratorio
- El trabajo sugiere la posibilidad futura de autorregeneración de tejidos lesionados

JAIME PRATS | Valencia | 11 SEP 2013 - 20:10 CET

Archivado en: Investigación médica, Células madre, CNIO, Shinya Yamanaka, Juan Carlos Izpisua, Genética, Centros Investigación, España, Investigación científica, Biología, Ciencias naturales



Facebook: 2.684
 Twitter: 811
 LinkedIn: 21
 RSS: 65
 Enviar, Imprimir, Guardar

Desde que en 2009 se consiguió reprogramar simples células adultas de la piel para transformarlas en células madre IPS o pluripotentes, tan versátiles como las células madre embrionarias, este procedimiento siempre se había realizado en el laboratorio.

Un equipo del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) ha demostrado, por vez primera, que el proceso de retrasar el reloj de las células adultas (reprogramarlas) para convertir las en IPS se puede provocar también en el organismo de un ser vivo adulto. Pero, además, estas células madre, que se han desarrollado en ratones, tienen mayor capacidad de diferenciación (de convertirse en distintos tejidos) que las obtenidas en laboratorio. Esta nueva técnica no tiene impacto terapéutico directo. Pero permite pensar en un futuro, aún lejano, en el que sean los propios órganos lesionados los que puedan producir células madre para regenerarse.

"Es un trabajo excepcional", reflexiona Juan Carlos Izpisua, director del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona. "Abre una nueva etapa para la medicina, la búsqueda de estrategias que nos permitan regenerar órganos y tejidos de una forma similar a los procesos naturales".

MÁS INFORMACIÓN

- "No todo son ventajas con las células madre embrionarias"
- "Las células madre IPS tienen memoria de su origen"
- Las células madre abren un nuevo fianco en la investigación del cáncer

El trabajo del grupo de Manuel Serrano, director del programa de Oncología Molecular del CNIO, lo publica Nature y parte de la técnica que le permitió al investigador japonés Shinya Yamanaka obtener células madre IPS en 2007 y el Nobel en 2012.

Yamanaka reprogramó las células adultas introduciendo en ellas cuatro

- Los científicos descubren riesgos inesperados en las nuevas células madre
- Creados microcerebros humanos a partir de células madre
- Una nueva alternativa para trasplantes: 'yemas' de hígado

genes característicos de la etapa embrionaria, de forma que, al activarse, devuelven a la célula a un estado prácticamente igual al de una célula embrionaria, convirtiéndola en la famosa IPS. Serrano ha usado la misma combinación de genes, el llamado coctel Yamanaka, pero le ha dado varias vueltas de tuerca, con unos resultados sorprendentes e inesperados.

El equipo del investigador español diseñó un ratón al que introdujo un gen artificial que, en respuesta a la administración de un antibiótico —tetraciclina— se activa y produce el mismo efecto que el coctel de las cuatro proteínas de Yamanaka.

La intención original de Serrano no era generar células madre IPS en el interior de los roedores, sino algo "mucho más prosaico", como trasladar a este diario. Buscaba una forma sencilla de obtener células madre embrionarias. Y la forma de conseguir las era extraer las células de los ratones con el genoma modificado, bañarlas en una placa de laboratorio con el antibiótico y generar fácilmente cultivos de células IPS.

REPROGRAMACIÓN CELULAR EN EL INTERIOR DE UN RATÓN

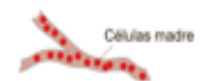
- 1 Se modifica genéticamente un ratón, inyectándole un virus con el gen que se desea incorporar al animal.
- 2 Durante una semana, se administra directamente un antibiótico al ratón para activar el gen artificial. Como consecuencia hay un proceso de reprogramación celular.



REPROGRAMACIÓN CELULAR

Células adultas se transforman en células madre embrionarias. La capacidad de diferenciación de estas células madre (transformarse en distintos tipos de células) es mayor que si se hubiesen obtenido en el laboratorio.

- A Se producen teratomas (estructuras compuestas de diversos tejidos).
- B Se observan células madre en el torrente sanguíneo del ratón.



IMPORTANCIA
Se abre la posibilidad futura de inducir la regeneración de órganos dañados





Pero en un momento dado, le surgió la duda. ¿Que sucedería si se administraba el antibiótico directamente al ratón modificado genéticamente y no a los cultivos de sus células? "Sinceramente, no confiábamos en que las células se fueran a reprogramar dentro del ratón", tralada el investigador. "No creíamos que funcionara", insiste. Pero funcionó.

Los ratones modificados de Serrano bebieron el antibiótico diluido en agua durante una semana. Al poner en marcha el mecanismo descrito por Yamanaka y adaptado por el CNIO, los investigadores observaron que células adultas de los ratones perdían sus características y adquirían rasgos de células embrionarias "que no existen en los organismos adultos", destaca Serrano.

Tras retroceder, desprogramarse y convertirse en células madre, las células se replicaban de forma descontrolada y desordenada en el interior del cuerpo de los roedores dando lugar a una especie de masa compuesta de diferentes tejidos (cerebral, muscular, óseo, intestinal...) de tejidos. Una especie de embrión desorganizado denominado teratoma.

La importancia de estas estructuras pseudoembrionarias que aparecían por decenas en el tórax y en el abdomen no está en su utilidad clínica. Ninguna terapia puede pasar por provocar teratomas. Lo relevante es que de esta forma quedaba patente la elevada capacidad de diferenciación de las células madre generadas en el interior de los ratones. Estas estructuras no solo contenían células derivadas del desarrollo del embrión (de las tres capas que lo conforman), sino incluso de tejidos externos al embrión, como es el caso de saco vitelino.

Además, los investigadores del CNIO detectaron células madre en el torrente sanguíneo de los ratones tratados

En ambos casos —tanto en los teratomas como en la sangre— las células madre obtenidas presentaban unos estadios embrionarios aún más tempranos que las células producidas mediante la técnica de Yamanaka. Es decir, habían retrocedido a un nivel más primitivo, por lo que presentaban una mayor facultad de diferenciación en diferentes tipos celulares. Presentaban características de embriones humanos de tan solo 72 horas de gestación y 16 células, que en la jerga se denominan rasgos totipotentes.

Estas características de indiferenciación tan elevadas "nunca se habían generado en el laboratorio", según los autores. "Estos datos nos indican que nuestras células madre son mucho más versátiles que las células IPS de Yamanaka", destaca Serrano. La contrapartida de esta facultad es que las células son más difíciles de controlar cuando llega el momento de convertirlas en tejidos concretos.

El objetivo de la medicina regenerativa consiste en curar órganos dañados a través de células sanas. La materia prima de este enfoque terapéutico son las células madre por su capacidad de convertirse en cualquiera de los más de 100 tipos celulares. Los especialistas aspiran a poder manipular estas células desprogramadas para convertirlas en células sanas de hígado, corazón o páncreas con las que tratar insuficiencias hepáticas, infartos o diabetes. O incluso desarrollar en el laboratorio órganos completos de repuesto para sustituir a los enfermos.

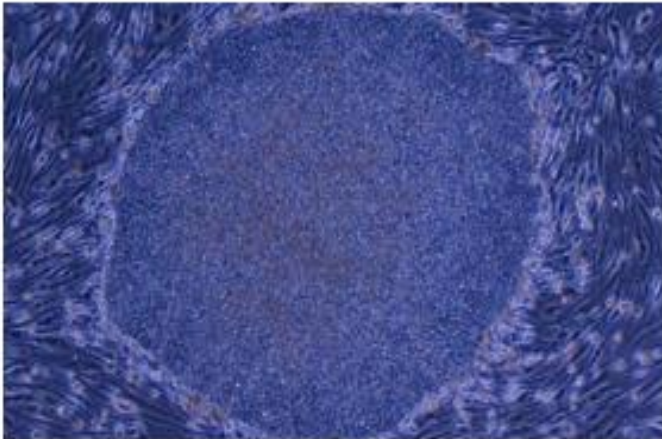


Via libre para probar en pacientes células madre contra el párkinson

- Un experimento japonés con macacos descarta el rechazo inmunológico y se ensayará en humanos en dos años
- No se trata aún de aliviar los síntomas

JAVIER SAMPEDRO | Madrid | 26 SEP 2013 - 20:49 CET 17

Archivado en: [Parkinson](#) [Células madre](#) [Investigación médica](#) [Animales laboratorio](#)
[Enfermedades degenerativas](#) [Premios Nobel](#) [Premios](#) [Enfermedades neurológicas](#) [Genética](#)



Las células madre iPS. Gerson el Nobel a Yamanaka. / REUTERS / CORDON PRESS

1.447
 712
 -42
 31
 Enviar
 Imprimir
 Contar

La gran promesa de la emergente medicina regenerativa es convertir las células madre derivadas de un paciente en tejidos que se le puedan trasplantar para tratar su enfermedad. La idea supera hoy una prueba crucial con la demostración, por científicos japoneses, de que las neuronas dopaminérgicas —cuya destrucción causa el párkinson— derivadas de células madre pueden trasplantarse al cerebro de los primates sin apenas rechazo inmunológico. Esto despeja el camino hasta el punto de que los ensayos clínicos con pacientes humanos de párkinson empezarán en dos años, según el responsable de la investigación.

"Nosotros, y también otros laboratorios en Estados Unidos y Europa, estamos proyectando un ensayo clínico con pacientes de párkinson", dice a EL PAÍS Jun Takahashi, investigador principal del Centro para la Investigación y Aplicación de las Células IPS, en Kioto. "Calculo que el ensayo empezará en un par de años". Takahashi es el coordinador del trabajo presentado en *Stem Cell Reports*. Otro de los firmantes es su jefe en Kioto, Shinya Yamanaka, último premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de las células IPS.

Las células IPS (*induced pluripotent stem cells*, o células madre de pluripotencia inducida) son la gran promesa de la investigación biomédica. Son unas células madre tan versátiles como las embrionarias —capaces de convertirse en cualquier tejido y órgano del cuerpo—, pero que se obtienen reprogramando, o *retrasando el reloj* de simples células de la piel u otro tejido del paciente. No solo eluden el uso de embriones humanos, sino que además son genéticamente idénticas al paciente. Los

En ensayos previos la respuesta inmunitaria arruinaba el trabajo

humanos, sino que además son genéticamente idénticas al paciente. Los trasplantes derivados de ellas no deberían, por tanto, generar rechazo inmunológico.

Pero las predicciones más razonables fallan a menudo en biología. En los últimos dos años, algunos experimentos con ratones habían arrojado un jarro de agua helada sobre esas expectativas. Varios tipos de trasplantes derivados de células madre IPS indujeron una fuerte respuesta inmunológica en el ratón receptor, pese a que el trasplante procedía de un ratón genéticamente idéntico a él. Por alguna razón que sigue sin estar del todo clara, las células IPS parecen generar rechazo en esos sufridos roedores de laboratorio.

Takahashi, Yamanaka y sus colegas muestran ahora que, pese a todas esas prevenciones, el proceso funciona en primates no humanos. Han utilizado ocho macacos (*Macaca fascicularis*) criados para este propósito, les han extraído unas pocas células de la piel o de la sangre y les han *retrasado el reloj* para convertirlos en células madre IPS. Esta es la receta por la que Yamanaka ganó el Nobel, basada en solo cuatro factores de transcripción, o genes que regulan a otros genes.

La falta de dopamina causa la enfermedad, y las células creadas lo solucionan

Después han usado un protocolo —a base de factores de diferenciación y otras moléculas con actividad biológica— que, paso a paso, va convirtiendo (o diferenciando, en la jerga) a las células madre IPS primero

en precursores de las neuronas, luego en neuronas y por último en neuronas dopaminérgicas, esto es, productoras del neurotransmisor dopamina. La destrucción de este tipo de neuronas en una parte del cerebro (la sustancia negra), y el consiguiente déficit de dopamina en los circuitos cerebrales normalmente alimentados por ellas, es la causa directa del párkinson.

Los científicos japoneses han trasplantado esas neuronas a los mismos ocho macacos de los que habían partido, pero en dos tipos de condiciones: trasplantes autólogos (al mismo mono del que provenían las células IPS) o heterólogos (a otro mono distinto). El trabajo está diseñado cuidadosamente para examinar la cuestión crucial del rechazo. Y el resultado es un fuerte rechazo inmunológico en los trasplantes heterólogos; y uno muy débil en los trasplantes autólogos. Es la mejor noticia que podía esperar el sector —y el Nobel Yamanaka— tras el último año de depresión por los experimentos con ratones.

El experimento no aborda si las neuronas dopaminérgicas trasplantadas a los macacos pueden o no aliviar los síntomas del párkinson: los monos no tenían párkinson y no había por tanto nada que aliviar. Lo que sí es específico del párkinson es el tipo de neuronas producidas y el lugar del cerebro en el que deberían ser trasplantadas si los pacientes fueran humanos. Los autores han utilizado seis inyecciones en el cuerpo estriado izquierdo del cerebro, cada una con 800.000 neuronas.



Científicos españoles obtienen piel artificial de células del cordón umbilical

• Investigadores de Granada idean una nueva estrategia para fabricar células epiteliales

JOSÉ MIGUEL MUÑOZ / JAIME PRATS | Granada / Valencia | 29 OCT 2013 - 18:11 CET

Archivado en: Investigación médica Células madre Granada Trasplantes Genética Andalucía España Investigación científica Biología Enfermedades Ciencias naturales Ciencia Medicina

f 439

t 208

in 12

13

Enviar

Imprimir

Guardar

Los procedimientos para generar piel en el laboratorio destinados a curar, por ejemplo, a grandes quemados, tienen, entre sus principales inconvenientes, el de ser lentos. Se pueden tardar semanas en obtener una superficie suficiente de tejido. De ahí los distintos trabajos que buscan nuevas fórmulas para obtener células epiteliales. Investigadores de la Universidad de Granada han presentado este martes un abordaje original en la obtención de este tejido, al recurrir, por vez primera, a unas células que se encuentran en el cordón umbilical: las células de la gelatina de Warthon.

En teoría estas células no deberían diferenciarse en células epiteliales. No son totipotentes como las embrionarias. Son células mesenquimales, y en condiciones normales generan células óseas, hematopoyéticas (precursores de la sangre) tejido conjuntivo, adiposo, muscular o cartilago; pero no piel. Sin embargo, como explica Antonio Campos, catedrático de Histología de la Universidad de Granada y uno de los responsables de la investigación, su equipo ha conseguido transformar estas células del cordón umbilical en epiteliales "y formar estratos y epitelios de piel y mucosa".

Las células de la gelatina de Warthon -sustancia que constituye la matriz del cordón umbilical- "una vez seleccionadas las más viables, tienen un gran potencial para diferenciarse y fabricar tejidos", añade Campos.

La técnica podría usarse para tratar grandes quemaduras, aunque deberá medirse primero el rechazo que pudiera provocar un trasplante de este tipo en el paciente

La piel se forma, básicamente, a partir de dos tejidos: la epidermis y la dermis. Los investigadores, como publican en la revista *Stem cells traslational medicine*, han utilizado como dermis (la capa que hace de soporte) un biomaterial realizado con fibrina y agarosa, diseñado y desarrollado por estos mismos

científicos, y como epidermis los epitelios cultivados con las células de Wharton del cordón umbilical. Según Campos, hasta ahora ningún grupo de investigación en el mundo había logrado construir piel artificial con células madre del cordón umbilical.

Actualmente, según explica Campos, a los quemados se les sustituye la piel afectada por piel artificial creada a partir de cultivos celulares de tejido obtenido del propio paciente. "Este proceso suele tardar unos 20 días; si tuviéramos piel creada con células del cordón umbilical almacenada en bancos de tejidos se podría aplicar inmediatamente", afirma el investigador.



Creados minirriñones humanos a partir de células madre

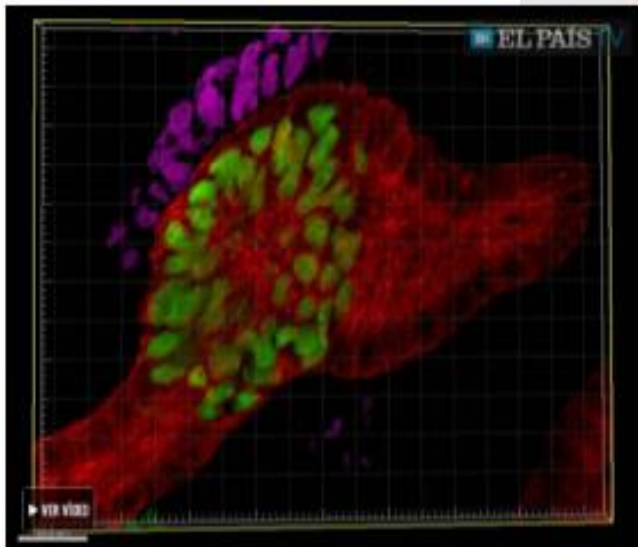
- La medicina regenerativa logra otro éxito tras las yemas de hígado y de cerebro
- El científico paciente

JAVIER SAMPEDRO | Madrid | 17 NOV 2013 - 19:03 CET

28

Archivado en: Células madre, Medicina regenerativa, Trasplante riñón, Juan Carlos Izpisua
 Trasplante, Enfermedades renales, Cirugía, Genética, Especialidades médicas, Tratamiento médico

Enviar video



Facebook 2,578
 Twitter 907
 LinkedIn 27
 StumbleUpon 24
 Enviar
 Imprimir
 Guardar

La investigación en medicina regenerativa está derribando barreras a buen ritmo 15 años después del descubrimiento de las células madre embrionarias humanas. Tras la generación de versiones en miniatura del hígado y el cerebro, le llega ahora el turno a los minirriñones humanos. No se trata ya de derivar tal o cual línea celular especializada a partir de células madre, sino de auténticos órganos en 3D, aunque en versión reducida o primordia, similar a la primera aparición de esas estructuras durante el desarrollo humano. Todavía es pronto para pensar en trasplantes, pero los nuevos minirriñones no solo abren esa posibilidad a medio plazo, sino que tienen fundamentales aplicaciones inmediatas en la búsqueda de tratamientos contra la enfermedad renal.

Juan Carlos Izpisua y sus dos equipos del Instituto Salk de California y el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona, en colaboración con el centro de bioingeniería CIBER-BBN y el Hospital Clínic de la misma ciudad, han logrado crear minirriñones humanos a partir de los dos principales tipos de células madre utilizados en investigación biomédica, las embrionarias y las IPS (o de pluripotencia inducida), que se obtienen retrasando el reloj de simples células de la piel. Publican sus resultados en *Nature Cell Biology*.

El objetivo final de la medicina regenerativa es obtener tejidos y órganos para trasplantes, y esta meca científica, con estar aún plagada de obstáculos formidables, sobrevuela la imaginación de cualquier investigador del campo. Izpisua reconoce abiertamente que el trabajo de su equipo "genera esperanzas de que un día podamos usar nuestras

propias células para regenerar nuestros órganos enfermos, solucionando con ello la escasez de órganos para trasplantes".

El avance hace posible reproducir dolencias renales en un laboratorio

Pero ese objetivo ni es el único ni será el primero en ver la luz de la práctica biomédica. Si las células de la piel se obtienen de un paciente de cualquier enfermedad renal, su conversión en

células madre IPS y posterior diferenciación producirá un minirriñón humano sobre el que se podrá investigar con todo el poder analítico de la biología molecular y celular contemporánea: sobre ese órgano de síntesis se podrá hacer todo lo que no se puede hacer con un paciente completo, por dolorosamente obvias razones éticas.

Pronto se derivará de ello un conocimiento profundo de las causas biológicas de las enfermedades renales. Y los científicos de La Jolla y Barcelona han probado la validez del principio al derivar minirriñones (el término técnico es *primordios renales*) de un paciente de enfermedad renal poliquística (PKD, por *polycystic kidney disease*), un daño genético progresivo de los riñones. Ese material se puede utilizar ya mismo para diseccionar las causas de esa dolencia incurable.

"Uno de los aspectos clínicos importantes del trabajo", dice uno de los autores, el nefrólogo del Hospital Clínic Josep María Campistol, "es que hace posible reproducir en el laboratorio enfermedades renales humanas y valorar distintas estrategias terapéuticas en modelos *in vitro*". Campistol dirige el Instituto de Nefrología y Urología de ese hospital barcelonés.

Los científicos esperan también que los minirriñones generados a partir de células madre IPS de pacientes sirvan para probar baterías de pequeñas moléculas —candidatos a fármacos— que puedan paliar la enfermedad en cuestión, por ejemplo destruyendo las células incorrectas, o estimulando las deseables, o corrigiendo alguna reacción bioquímica desencaminada. La utilización de minirriñones, esperan algunos investigadores, puede mejorar y acortar los procedimientos que debe superar un nuevo fármaco para llegar al ensayo clínico. Esto no es un argumento solo para el riñón, sino también para los otros minirriñones que ya se han creado o pronto lo serán.

Pero el riñón era un objetivo predilecto de los investigadores, y en particular de Izpisua. Las enfermedades de este órgano son muchas y muy extendidas, y a menudo tienen un mal pronóstico. El riñón apenas tiene capacidad para repararse o regenerarse a sí mismo, y muchos pacientes acaban en la cola de los trasplantes, en el caso de que puedan ingresar en ella. Los investigadores esperan que las células madre puedan ayudar.

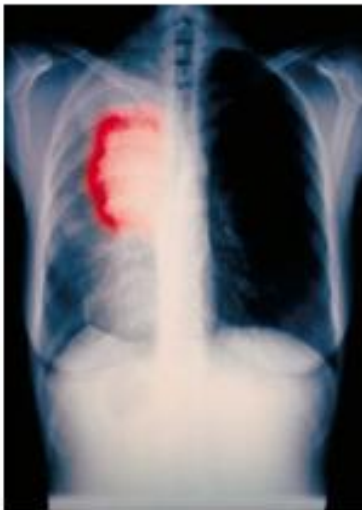


Convierten células madre humanas en células pulmonares funcionales

- El avance tiene potencial para el estudio de enfermedades pulmonar y la detección de fármacos
- Creados minirriones humanos a partir de células madre

EP | Madrid | 1 DIC 2013 - 20:32 CET

Archivado en: Células madre Medicina regenerativa Trasplante pulmón Trasplantes Cirugía Genética Especialidades médicas Tratamiento médico Biología Ciencias naturales Ciencia



Radiografía de un paciente fumador. / AGC FOTOSTOCK

Investigadores del Centro Médico de la Universidad de Columbia (CUMC, en sus siglas en inglés), en Nueva York, Estados Unidos, han logrado transformar células madre humanas en células de pulmón y vías respiratorias funcionales. El avance, publicado en *Nature Biotechnology*, tiene potencial significativo para el estudio de enfermedades pulmonar, la detección de fármacos, estudiar el desarrollo del pulmón humano y, en última instancia, generar tejido pulmonar para trasplante.

Según el líder del estudio, Hans-Willem Snoeck, profesor de Microbiología e Inmunología y afiliado con el Centro de Columbia para la Inmunología Tradicional y la Iniciativa de Células Madre en Columbia, destacó el "relativo éxito" en la transformación de las células madre

humanas en células del corazón, beta del páncreas, intestinales, del hígado y nerviosas, abriendo todo tipo de posibilidades para la medicina regenerativa. "Ahora somos finalmente capaces de hacer células pulmonares y de las vías respiratorias", afirmó, algo que considera "importante" porque los trasplantes de pulmón tienen un pronóstico particularmente malo. Aunque todavía faltan muchos años para cualquier aplicación clínica de este logro, entiende que se puede empezar a pensar en hacer trasplantes pulmonares autólogos, es decir, trasplantes que usan las propias células de la piel de un paciente para generar tejido pulmonar funcional.

La investigación se basa en el descubrimiento del doctor Snoeck en 2011 de un conjunto de factores químicos que pueden convertir células embrionarias (ES) o células madre pluripotentes inducidas (iPS) humanas en células del endodermo del intestino anterior, precursor de las células del pulmón y las vías respiratorias. Las células iPS humanas se parecen mucho a las células madre embrionarias humanas, pero se generan a partir de células de la piel, persuadiéndolas para ralentizar su desarrollo. Las células iPS humanas pueden ser estimuladas para diferenciarse en células especializadas, ofreciendo a los investigadores una alternativa a las células madre embrionarias humanas.

En el estudio actual, Snoeck y sus colegas encontraron nuevos factores que pueden completar la transformación de ES humanas o células iPS en células epiteliales de pulmón funcionales (células que cubren la superficie del pulmón). El equipo vio que las células resultantes expresan marcadores de al menos seis tipos de células epiteliales de pulmón y de las vías respiratorias, en particular los marcadores de las células epiteliales alveolares de tipo 2. Las células de tipo 2 son importantes porque producen surfactante, una sustancia fundamental para mantener los alveolos pulmonares, donde se produce el intercambio gaseoso, y que también participan en la reparación del pulmón después de lesiones y daños.

Los resultados tienen implicaciones para el estudio de diversas enfermedades pulmonares, como la fibrosis pulmonar idiopática, en las que se piensa que las células tipo 2 del epitelio alveolar juegan un papel central. "Nadie sabe qué causa la enfermedad y no hay manera de tratarla. Gracias a esta tecnología los investigadores serán capaces de crear modelos de laboratorio de fibrosis pulmonar idiopática para estudiar la patología a nivel molecular y hallar dianas para posibles tratamientos o curas", resalta Snoeck. Este experto adelanta que, a largo plazo, se podría utilizar esta tecnología para hacer un injerto autólogo de pulmón. "Esto implicaría tener un pulmón de un donante del que eliminar todas las células del pulmón y dejar solo su andamio y sembrar el andamio con nuevas células de pulmón derivadas del paciente, pudiendo evitarse así problemas de rechazo", desgranó Snoeck, que está investigando este enfoque en colaboración con científicos del Departamento de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Columbia.

f 697

t 307

in 3

9

Enviar

Imprimir

Compartir



5. CONCLUSIONS GENERALS DEL TREBALL

Un cop acabat el treball sobre el món de la biotecnologia en especial el de les cèl·lules mare, m'agradaria reflexionar sobre tot una mica en general.

Primer de tot em sento molt satisfeta amb el treball que he dut a terme durant tot aquest any, ha estat una gran experiència per a mi poder estar en un laboratori professional i aprendre de grans persones. Totes elles m'han ensenyat moltes coses les quals no en coneixia la seva utilitat o la seva existència i això m'ha fet agafar encara més ganes de voler lluitar pel que vull estudiar i en un futur fer el que he estat observant durant tot aquest any: el treball diari i constant dels científics, la seva valentia i motivació per aconseguir allò que desitgen ja sigui a nivell personal o a nivell d'equip d'investigació... és impressionant i dubto que qualsevol que no hi estigui pel mig s'ho pugui imaginar.

Una altra cosa que m'agradaria comentar és tot l'esforç i paciència que ha comportat tot aquest treball. Des d'un principi ja sabia que el tema no seria fàcil però tampoc tant difícil com quan vaig veure de què anava realment la cosa. En un principi em vaig trobar amb molts entrebancs per trobar laboratori i establir un tema i una part pràctica en concret. Molta gent em deia que el que volia fer era impossible i així se m'anaven tancant portes constantment. Vaig haver de buscar molts contactes de persones que estiguessin especialitzades en el tema fins que finalment vaig poder contactar amb el cap d'investigació de cèl·lules mare de l' IBEC, l' Àngel Raya. Un cop vaig començar amb la part pràctica, vaig adonar-me'n que havia de posar-me les piles i estudiar conceptes de biologia que ni a l' ESO ni al Batxillerat n'havia sentit parlar per tal de poder dur a terme l'experiment que seguia setmanalment amb l'estudiant de Màster, la Laia Gregori. Això va ser un gran esforç per a mi. Però en tot moment tenia present la frase que diu que tot esforç té la seva recompensa. I tal dit tal fet. Mentre estava al laboratori vaig poder visitar totes les instal·lacions, a més a més durant tot aquest temps he pogut fer un tastet de com és el món científic i també he après moltes coses que si no hagués fet aquest treball segurament no hagués tingut el suficient interès per aprendre-les. Una altra cosa que he après i que m'ha encantat han estat els protocols que hi ha dins d'un laboratori. D'altra banda, a l'IQS tot i que hi vaig estar menys temps, també hi vaig aprendre bastantes coses



que a nivell de protocols vindrien a ser els mateixos que a l' IBEC però clar, a cada lloc vaig seguir diversos experiments i això em va donar l'oportunitat de poder ampliar el meu coneixement científic.

Referent al treball en sí, la veritat és que no se m'ha fet gens pesat de fer. Crec que això és degut a que és un tema que m'apassiona i que no m'importaria seguir estudiant el que queda de la resta de curs ja que el trobo molt interessant. Per a mi haver de fer el treball de recerca a l'estiu no m'ha suposat cap molèstia ja que quan anava als laboratoris m'ho passava la mar de bé aprenent coses noves.

Veient tot l'esforç que suposa tot el treball i tot el que he aconseguit, m'agradaria dir a pròxims estudiants que vulguin fer un treball d'aquest tipus, que no ho deixin tot per perdut a la mínima que es trobin amb un entrebanc. Encara que hi hagi gent que els hi digui que no poden aconseguir allò que volen, que no els facin cas, que segueixin lluitant, perquè per lluitar no es perd res en canvi si jo per exemple hagués deixat de lluitar en el seu moment, ara me n' arrepentiría ja que accepto que l'oportunitat i l'experiència que he tingut ha estat gràcies a tot el meu esforç constant.

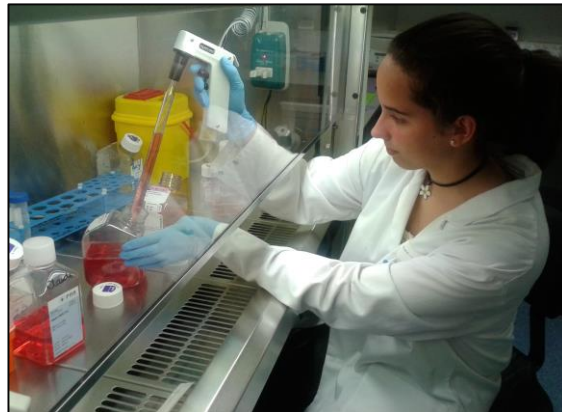
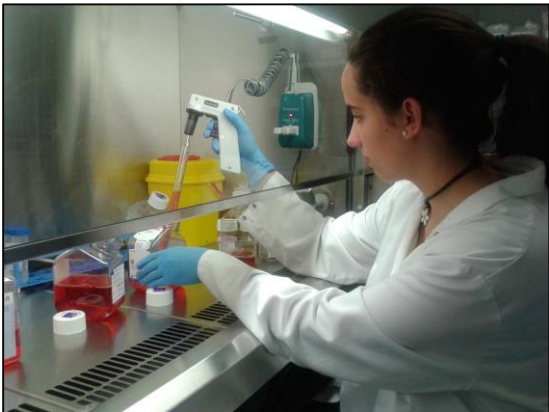
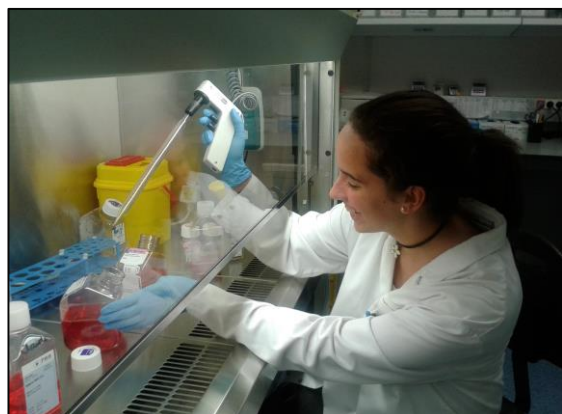
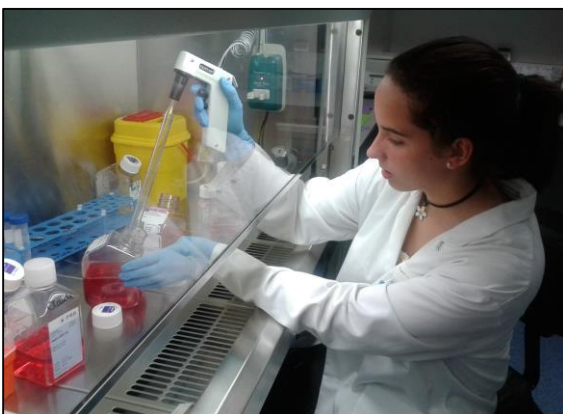


Figura 58, 59, 60 i 61 Jo treballant al laboratori





6. ANNEX : MATERIAL NECESSARI PER LA PART EXPERIMENTAL



- Material:

Alíquotes i Coatings.

- 171 ml KO-DMEM (Medi).
- 53 ml cHES + 10 μ M ROCK Inhibitor (Medi).
- 10 ml ACCUTASE (Per aixecar les cèl·lules).
- 76 ml EBm (Medi).
- 468 ml EBm + 468 μ l AA (Medi de diferenciació).
- 42 ml de Matrigel.
- 6 ml TRIzol (per l'extracció d'RNA).
- TBS (solució salina per a la immunofluorescència).
- TBS + 0'1% TRITON (solució salina + detergent utilitzat a la immunofluorescència).
- TBS + 3% DONKEY SERUM + 0'3% TRITON (bloqueja la mostra per a la immunofluorescència).
- Iodur de propidi (marca les cèl·lules mortes amb fluorescència vermella perquè tenen petits forats a la membrana cel·lular).
- H₂O estèril.
- H₂O MilliQ.
- H₂O MilliQ autoclavada.
- PBS (solució salina).
- PBS + 10% FBS (solució salina + sèrum de fetus bovins).
- TRIPSINA (desenganxa i separa les cèl·lules).
- COLLAGENASE solució 1 i 2.
- Primers.
- Anticossos (Per la immunofluorescència):
 - Primaris.
 - MOUSE.
 - ANTI-SIRPA.
 - CONTROL ISOTÍPIC.
 - Secundaris.
 - DONKEY.



- CLOROFORM.
- ISOPROPANOL.
- ETANOL 75%.
- SYBR GREEN.

- MIX A:
 - RNA (1µg de cada mostra).
 - Random Hexamers (10µl).
 - dNTPs (10µl).
 - DEPC H₂O (fins arribar a 100µl).

- MIX B:
 - 10X RT Buffer (20µl).
 - MgCl₂ (40µl).
 - DDT (20µl).
 - Rnasa OUT (10µl).
 - SS III RT (10µl).
 - TOTAL (100µl).

- MIX per RT-qPCR per cada mostra:
 - 594µl SYBR GREEN.
 - 415'8µl H₂O PCR.
 - 54µl cDNA de cada mostra: dies 0, 6, 8, 10, 13 i 23, abans del cell sorter (GFP+ i GFP-) i control positiu.

- Primers per A:
 - 59'4µl upstream + 59'4µl downstream GAP DH.
 - 59'4µl upstream + 59'4µl downstream Oct4.
 - 59'4µl upstream + 59'4µl downstream Mef2.
 - 59'4µl upstream + 59'4µl downstream Bry.
 - 59'4µl upstream + 59'4µl downstream cTnT.
 - 59'4µl upstream + 59'4µl downstream Tbx5.
 - 59'4µl upstream + 59'4µl downstream Nkx2.5.



- 59'4µl upstream + 59'4µl downstream Mlc2a.
- 59'4µl upstream + 59'4µl downstream GFP.

Estris.

- 2 plaques de 10 de KiPS 3F.7 Nkx2.5 GFP Neo #2 sobre Matrigel.
- 1 placa AGGREWELL.
- Centrífuga.
- Tubs de 15 i 50 ml.
- 3 Cell Strainer 37-40µm.
- Cambra de Neubauer.
- p1000 i puntes p1000.
- p200 i puntes p200.
- p20 i puntes p20.
- 5 plaques de 6cm de diàmetre per suspensió.
- Lupa.
- 6 plaques de 12WP.
- 2 cubres.
- Termociclador per RT-qPCR.
- Termoblock.
- Caixa de porexpan amb gel.



7. VOCABULARI CIENTÍFIC

- Antígens: Substància reconeguda com a estranya per l'organisme, capaç d'induir en aquest una resposta immunitària i la producció d'anticossos.
- Anticossos: Proteïna sèrica sintetitzada per les cèl·lules plasmàtiques en resposta a l'estimulació exercida per un antigen, amb el qual interacciona de forma específica.
- In vitro: Realitzar part d'un experiment en un medi artificial.
- Blastocist: Estat primerenc del desenvolupament embrionari en els animals.
- Mitosis: Procés de divisió de les cèl·lules somàtiques dels eucariotes, que consisteix bàsicament, en una divisió longitudinal dels cromosomes i en una divisió del citoplasma, i dóna com a resultat la constitució de dues cèl·lules filles amb igual dotació cromosòmica que la cèl·lula mare.
- Endoderma: Full embrionari intern format per cèl·lules que provenen del blastoderma.
- Ectoderma: Capa blastodèrmica més externa, formada en el procés de gastrulació a partir d'una part del blastoderma.
- Mesoderma: Full embrionari característic dels metazous triploblàstics, que apareix entre l'endoderma i l'ectoderma al final de la gastrulació, del qual deriven la dermis, el teixit conjuntiu, els ossos, la sang, els músculs, els òrgans urinaris, els genitals i l'epiteli del celoma.
- In vivo: Experiments físics, químics o farmacològics que tenen lloc dins d'un organisme viu, per oposició als que es duen a terme en un ambient artificial.



- Línia cel·lular: Cèl·lules o grup cel·lular que s'utilitza per treballar als laboratoris. Cada laboratori sol tenir una línia cel·lular que fan servir tots els científics que hi treballen per dur a terme algun experiment.
- Clonatge terapèutic: Procés experimental destinat a produir cèl·lules diferenciades que siguin genèticament idèntiques a les cèl·lules de determinats teixits d'un organisme concret.
- Meiosi: Procés de divisió cel·lular en què en una primera etapa se separen els cromosomes homòlegs i en una segona etapa les seves cromàtides per tal de produir gàmetes haploides.
- Mòrula: Ou segmentat la superfície del qual té l'aspecte d'una petita móra.
- Transdiferenciació: Té lloc quan una cèl·lula (que no és cèl·lula mare) es transforma en un altre tipus de cèl·lula o quan una cèl·lula mare ja diferenciada crea cèl·lules fora de la seva ruta de diferenciació ja establerta.
- Antisèptic: Destruïx els gèrmens infectius.
- Llinatges: Classes, diversos tipus.
- Transfecció: Introducció de material genètic extern a les cèl·lules eucariotes mitjançant plasmidis, vectors vírics o altres mètodes.
- Blastòmers: Cèl·lula formada durant la divisió de l'òvul fecundat, en els primers estadis del desenvolupament embrionari.
- Cardiomiòcits: Cèl·lules cardíques.
- Progenitor cardíac: Si no existeix aquest progenitor no es pot obtenir el procés següent de la part de diferenciació.



- Aggrewell: La seva aplicació és en la diferenciació dels cossos embrioides (EBs). S'utilitza només en cèl·lules mare embrionàries i cèl·lules IPS.
- Cell Sorter: Capacitat de separar les cèl·lules d'acord amb les seves propietats. Aquestes propietats es poden descriure com intracel·lulars o extracel·lulars.
- Immunofluorescència: Tècnica que permet identificar microorganismes en mostres clíniques i detectar la presència d'un anticòs específic en el sèrum.
- RT-qPCR: Tècnica per generar una gran quantitat de còpies d'ADN .



8. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

Aquest apartat és a on es donarà les referències que he utilitzat per tal de dur a terme el treball de recerca sobre les cèl·lules mare. He utilitzat tres tipus de referències: internet, el llibre de biologia i articles científics per guiar-me una mica en l'estructura.

• REFERÈNCIES D'INTERNET:

- Cèl·lules IPS:

<http://learn.genetics.utah.edu/content/tech/stemcells/ips/>

- Origen de les cèl·lules mare:

<http://www.slideshare.net/JoseMoi/historia-e-investigaciones-en-el-uso-de-las-celulas-madre>

- Tot el tema relacionat amb cèl·lules mare embrionàries i adultes:

<http://blocs.xtec.cat/parlamentjiovecientificbp/category/general/1-cel·lules-mare-embrionaries/>

<http://metode.cat/Revistes/Monografics/Gen-etica-i-estetica/Cellules-mare-embrionaries-i-medicina-regenerativa>

http://ca.wikipedia.org/wiki/Cice_biològic

<http://ca.wikipedia.org/wiki/Blastocist>

<http://www.sobrecelulasmadre.com>

<http://www.ecojoven.com>

<http://www.actionbioscience.org>

<http://www.unimedsc.wordpress.com>

<http://www.cmccaruij.jimdo.com>



- Tipus de cèl·lules mare segons la seva funció:

http://ca.wikipedia.org/wiki/Potència_cel·lular

- Mètodes d'obtenció de cèl·lules mare:

<http://www.slideshare.net/iescastulocnnc/celulas-madre-y-sus-aplicaciones-en-medicina>

- Aspectes legals, ètics i morals:

http://ca.wikipedia.org/wiki/controvèrsia_amb_les_cèl·lules_mare

<http://www.sevibe.es/celulas-madre/dudas-mas-frecuentes/legislacion-y-etica#2>

-Metodologia:

<http://www.iibce.edu.uy/SECIF/quees.htm>

<http://medpuj2012.wikispaces.com/file/view/l9.+Citometr%C3%ADa+de+flujido.pdf>

<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/citometria.htm>

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr>

<http://www.arrakis.es/~ibrabida/vigpcr.html>

[http://www.nanodrop.com/\(S\(petngc45u0kqafb3jhe0d3j\)\)/Library/lifescienceslab-13.pdf](http://www.nanodrop.com/(S(petngc45u0kqafb3jhe0d3j))/Library/lifescienceslab-13.pdf)

<http://www.microrao.com/micronotes/immunofluorescence.pdf>

- Altres:

<http://www.diec.cat>



<http://www.rae.es>

- **LLIBRES:**

- Llibre de biologia:

COSTA.M, BUENO.D, FORMIGA.M, GRAU.R, LLOBERA.M, LLORT.J.M, DE MANUEL.J, MOLINA.J, MONTSERRAT.P, PADROSA.T. (2010). *Biologia Conceptes Bàsics, Ciència i Tecnologia*. Barcelona: Editorial Teide.

- **ARTICLES:**

<http://www.elpuntavui.cat>

<http://www.elpais.com>