

CÈL·LULES MARE PLURIPOTENTS INDUÏDES: BASE PEL FUTUR DE LA RECERCA BÀSICA

Estudi de l'ús de les cèl·lules mare pluripotents induïdes en la síndrome de Brugada



PSEUDÒNIM: NUROA

“Ahora la ciencia nos ha presentado una esperanza llamada investigación con células madre, que pueden proporcionar a nuestros científicos con muchas respuestas que durante tanto tiempo fue más allá de nuestro alcance”

- Nancy Reagan

ABSTRACT

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have generated much research in recent years. These cells are a promising alternative to traditional stem cells, as they maintain similar characteristics. That means they can become any cell type but can be obtained from the same adult patient, which offers a solution for the biggest bioethical dilemma arising from stem cells. It is also possible to create cell types with the patient's genetic characteristics and generate large quantities of iPSCs for experimental purposes. This project has consisted of a preliminary study about Brugada syndrome involving iPSC as a cellular model. Specifically, it analyzed the temporal evolution of the sodium channel expression during the differentiation of the iPSC into cardiomyocytes, with the pursuit of examining and comparing these evolutions between the different patients. Its objective is to study the functional mechanisms of the disease, specifically the sodium channel, and its dysfunction due to a mutation in the SCN5A gene. For that, a protein analysis was elaborated using the Western Blot technique, as well as a genetic analysis of the ARN using the PCR technique.

Key words: iPSC, stem cells, cardiomyocytes, sodium channel, Brugada Syndrome

RESUM

En els últims anys les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC) han estat motiu de moltes investigacions. Aquestes són una alternativa prometedora a les cèl·lules mare tradicionals, gràcies al fet que presenten la capacitat de diferenciar-se en qualsevol altra cèl·lula i es poden obtenir a partir del mateix pacient. Així, la utilització de les iPSC podria esdevenir la solució al problema bioètic que durant els últims anys ha envoltat l'obtenció i experimentació amb cèl·lules mare. En aquest treball s'ha fet un estudi preliminar sobre la síndrome de Brugada, utilitzant les iPSC com a model cel·lular. Concretament es va realitzar un estudi preliminar del curs temporal de l'expressió del canal de sodi cardíac durant la diferenciació de les iPSC en cardiomiòcits, on es pretenia analitzar i comparar la seva evolució entre els pacients estudiats. Per tal d'analitzar els mecanismes de funcionament de la malaltia, en concret el canal de sodi i la seva disfunció en relació amb una mutació en el gen SCN5A. Per fer això es van elaborar unes anàlisis de proteïnes mitjançant la tècnica de Western Blot, com també es va portar a terme una anàlisi genètica d'ARN amb la tècnica de qPCR.

Paraules clau: iPSC, cèl·lules mare, cardiomiòcits, canal de sodi, síndrome de Brugada

ABREVIATURES

ADN: Àcid desoxiribonucleic

ARN: Àcid ribonucleic

BCA: Bicinchoninic acid

BrS: Síndrome de Brugada

BSA: Bovine Serum Albumin

CM: Cèl·lules mare

CMA: Cèl·lules mare adultes

CME: Cèl·lules mare embrionàries

C-Myc: Proto-oncogen MYC

ECG: Electrocardiograma

FIV: fecundació in vitro

HKG: housekeeping gen

H₂O mQ: Aigua milli-Q

iPSC o cèl·lules iPS: Del anglès "induced pluripotent stem cells"

iPSC-CM: De l'anglès "induced pluripotent stem cells differentiated in cardiomyocytes"

Klf4: factor 4 Kruppel-like

MSC: mort sobtada cardíaca

Na⁺: ió de sodi

K⁺: ió de potassi

mV: milivolts

O/N: overnight (tota la nit)

Oct-4: factor de transcripció d'unió octàmer 4

PA: Potencial d'acció

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

qPCR: PCR quantitativa

Sox2: SRY (regió determinant del sexe Y) quadre 2

SV: Virus Sendai

VF: fibril·lació ventricular

AGRAÏMENTS

No voldria començar aquest treball sense agrair a la Dra. Fabiana Scornik per guiar-me en l'estudi de l'expressió del canal de sodi i fer-me la proposta d'aquesta experimentació, sense la qual no hauria pogut fer aquest treball. A més, voldria donar-li les gràcies per tot el temps invertit a solucionar els meus dubtes sobre les tècniques i procediments. També mencionar la resta d'investigadors del centre que em van ajudar a dur a terme algunes de les tècniques i em van ensenyar els passos necessaris del procés d'obtenció de cardiomiòcits.

Al tutor de treball de recerca, pel suport mostrat durant aquests mesos i per resoldre tots els dubtes que he tingut en el procés.

Al Centre de recerca en Genètica Cardiovascular de l'IdIBGi per donar-me l'oportunitat de realitzar les meves pràctiques amb ells i proporcionar-me el material necessari.

Finalment, agrair al meu pare i la meva mare per tenir la paciència de llegir-se el meu treball a cada nova versió i escoltar totes les meves explicacions.

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
MARC TEÒRIC	3
1. BIOLOGIA CEL·LULAR	3
1.1. Teoria cel·lular	3
1.2. Estructura de la cèl·lula i diferenciació entre procariota i eucariota	3
2. CÈL·LULES MARE	6
2.1. Què són les cèl·lules mare?	6
2.2. Classificació de les cèl·lules mare	6
2.3. Diferenciació de les cèl·lules mare	9
2.4. Mètodes d'obtenció de cèl·lules mare	10
2.5. Aplicacions de les cèl·lules mare en la biomedicina	12
2.6. Dilemes bioètics de les cèl·lules mare	15
3. CÈL·LULES MARE PLURIPOTENTS INDUÏDES	18
3.1. Què són les cèl·lules iPS?	18
3.2. Descobriment de les iPSC	18
3.3. Obtenció d'iPSC	19
3.3.1. Reprogramació mitjançant factors de transcripció	20
3.3.2. Reprogramació mitjançant molècules petites	26
3.3.3. Tipus cel·lulars utilitzats per l'obtenció d'iPSC	26
3.4. Aplicacions de les iPSC	27
3.5. Les iPSC com a model d'estudi per el síndrome de Brugada	28
3.6. Avantatges i inconvenients de l'ús d'iPSC	28
4. EL COR	30
4.1. Cardiomiòcits	31
4.2 El canal de sodi	33
4.3. Síndrome de Brugada	36
PART EXPERIMENTAL	40
1. INTRODUCCIÓ	40
1.1. Mostres	41

2. ANTECEDENTS	43
3. ANÀLISIS DE PROTEÏNES	46
3.1. Extracció de proteïnes	46
3.2. Quantificació de proteïnes	47
3.3. Western Blot	52
3.3.1. Tècnica	52
3.3.2. Procediment	54
3.4. Resultats	64
3.4.1. Obtenció dels resultats	64
3.4.2. Anàlisi dels resultats	65
4. ANÀLISI GENÈTICA	72
4.1. Extracció i quantificació ARN	72
4.2. Quantificació d'ARN	74
4.3. Retrotranscripció	79
4.4. qPCR	81
4.4.1. Tècnica	81
4.4.2. Procediment	82
4.5. Resultats	84
4.5.1. Obtenció dels resultats	84
4.5.2. Anàlisis dels resultats	84
5. CONCLUSIONS PART PRÀCTICA	89
CONCLUSIÓ	90
WEBGRAFÍA	93
ANNEXES	96

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Cèl·lula eucariota animal.	5
Figura 2. Cèl·lula eucariota animal vista des del microscopi	5
Figura 3 Classificació CM segons l'origen i potencial	9
Figura 4. Fases de la diferenciació cel·lular	10
Figura 5: Mètodes de lliurament per a la reprogramació de iPSC	23
Figura 6. Estructura del cor.	31
Figura 7. Cardiomiocit	32
Figura 8. Canal de sodi i les proteïnes del seu canalosoma.	33
Figura 9. Fases d'un potencial d'acció cardíac ventricular.	34
Figura 10. Representació de les fases d'un PA i les corrents iòniques que intervenen, amb les subunitats que formen cada canal.	36
Figura 11. Tipus d'ECG per detectar la síndrome de Brugada.	38
Figura 12. Procés de diferenciació iPSC a cardiomiòcits amb canvis de cultiu.	44
Figura 13. Placa de 96 wells preparada per la quantificació de proteïnes.	49
Figura 14. Aparell Biotek Gen5 utilitzat per calcular la concentració de les mostres	50
Figura 15. Esquema del funcionament del gel sotmès a l'electroforesis.	53
Figura 16. Funcionament de la detecció de proteïnes en un mètode indirecte.	54
Figura 17. Mostra preparada pel Western Blot descongelada en un eppendorf.	56
Figura 18. Cubeta electroforesis preparada per carregar els gels del Western Blot.	57
Figura 19. Entrada de proteïnes al gel apilador per mitjà de electroforesis procés que provoca la separació de proteïnes segons el seu pes molecular.	59
Figura 20. Imatges del gel revelat, en la foto a. es pot observar el gel a simple vista, amb les línies de tinció del marcador, les fotografies b,c,d i e estan fetes amb el ChemiDoc en el mode Stain Free Gel i corresponen a les mostres 36, 35, 37 i 35.2, respectivament	59
Figura 21. Organització del muntatge del sandvitx per transferir les proteïnes del gel a la membrana.	60
Figura 22. Fotografia membrana per la normalització de la proteïna total (Stain Free Blot)	61
Figura 23. Membrana tallada segons l'àrea on es troba la proteïna d'interès	62
Figura 24. Anticòs primari utilitzat per la detecció de proteïnes.	63
Figura 25. Imatges Chemiluminescence que destaquen les proteïnes NAV 1.5 i TT en les mostres dels pacients.	64
Figura 26. Obtenció de les dades de Western Blot a través del programa BioRad.	65

Figura 27. Columna QIA shredder spin de purificació dins un tub recolector.	72
Figura 28. Aparell lector Nano Drop 1000 per calcular concentració de les mostres.	74
Figura 29. Exemple de gràfic eselectroscòpic per la quantificació d'ARN.	74
Figura 30. Chip priming station	76
Figura 31. Càrrega de mostres a la matriu (RNA nano Chip) del Bioanalyser	77
Figura 32. Centrifugadora per plaques utilitzada en el procés de retrotranscripció	80
Figura 33. Placa de 384 pous i placa de 96 pous descarregades per la qPCR	82

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Mostres dels pacients que van completar la diferenciació	47
Taula 2. Esquema placa quantificació proteïnes	48
Taula 3. Volums substàncies pels pous de la recta patró	48
Taula 4. Concentracions de proteïna amb mitjanes triplicats per fer recta patró	50
Taula 5. Taula amb els valors i càlculs necessaris per fer la recta patró.	50
Taula 6. Concentració de cada mostra a través de la quantificació de les proteïnes.	51
Taula 7. Quantitats de H ₂ O i Loading Buffer per una mostra segons la concentració	55
Taula 8. Quantitats de H ₂ O i Loading Buffer a afegir segons la seva concentració	55
Taula 9. Esquema de com s'organitzaven els gels en els Western Blot realitzats.	58
Taula 10. Es pot observar l'ubicació de les diferents proteïnes en la membrana	62
Taula 11. Valors de NAV1.5 normalitzada en segon Western del pacient Rb20235	66
Taula.12 Valors de NAV1.5 normalitzada en primer Blot del pacient Rb20235	67
Taula. 13. Valors de NAV1.5 normalitzada en el pacient Rb20236	68
Taula. 14. Valors de NAV1.5 normalitzada en el pacient Rb20237	69
Taula. 15. Valors de TT normalitzada en el segon Western del pacient Rb20235	70
Taula. 16. Valors de TT normalitzada en el primer Western del pacient Rb20235	70
Taula. 17. Valors de TT normalitzada en el pacient Rb20236	71
Taula. 18. Valors de TT normalitzada en el pacient Rb20237	71
Taula 19. Relació de les absorvàncies en diferents longituds d'ona i concentració	75
Taula 20. Concentracions inicials i dilució per obtenir una concentració de 300 ng/μl	75
Taula 21. Esquema de la matriu del bioanalyser i nomenclatura de cada casella.	76

Taula 22. Resultats bioanalyser indicant la qualitat de la mostra mitjançant el RIN	78
Taula 23. Volums de mostra i H ₂ O per preparar les mostres pel gDNA wipeout Buffer.	79
Taula 24. Volums de la preparació per la qPCR amb Taqman i retrotranscripció prèvia	81
Taula. 25. Evolució SCN5A normalitzat en el pacient 35, 36 i 37	84
Taula. 26. Evolució TNNT2 normalitzat en pacients 35, 36 i 37.	85
Taula. 27. Evolució SCN1B normalitzat en pacient 35, 36 i 37.	86

ÍNDEX DE GRÀFICS

Gràfic 1. Recta de tendència per quantificar les concentracions de proteïna	51
Gràfic 2. Evolució NAV1.5 normalitzada en el pacient Rb20235 segon Western	66
Gràfic 3. Evolució NAV1.5. normalitzada per TT en el pacient Rb20235 segon Western	66
Gràfic.4 Evolució NAV1.5. normalitzada en el pacient Rb20235 primer Western	67
Gràfic 5 Evolució NAV1.5 normalitzada per TT en pacient Rb20235 primer Western	67
Gràfic.6 Evolució NAV1.5. normalitzada en el pacient Rb20236	68
Gràfic.7 Evolució NAV1.5. normalitzada per TT en el pacient Rb20236	68
Gràfic.8 Evolució NAV1.5. normalitzada en el pacient Rb20237	69
Gràfic.9 Evolució NAV1.5. normalitzada per TT en el pacient Rb20237	69
Gràfic.10. Evolució TT normalitzada en el segon Western del pacient Rb20235	70
Gràfic.11. Evolució TT normalitzada en el primer Western del pacient Rb20235	70
Gràfic.12 Evolució TT normalitzada en el pacient Rb20236	71
Gràfic.13 Evolució TT normalitzada en el pacient Rb20237	71
Gràfic 14. Gràfic d'amplificació segon el gen analitzat	83
Gràfic 14. Evolució SCN5A normalitzat en el pacient Rb20235	84
Gràfic 15. Evolució SCN5A normalitzat en el pacient Rb20236	84
Gràfic 16. Evolució SCN5A normalitzat en el pacient Rb20237	84
Gràfic 17. Evolució TNNT2 normalitzat en el pacient Rb20235.	85
Gràfic 18. Evolució TNNT2 normalitzat en el pacient Rb20236.	85
Gràfic 19. Evolució TNNT2 normalitzat en el pacient Rb20237.	85
Gràfic 20. Evolució SCN1B normalitzat en el pacient Rb20235	86
Gràfic 21. Evolució SCN1B normalitzat en el pacient Rb20236	86
Gràfic 22. Evolució SCN1B normalitzat en el pacient Rb20237	86

INTRODUCCIÓ

Aquest treball de recerca és fruit de la meva passió per la biomedicina i la recerca, juntament amb la inquietud de veure el camí estudiantil i laboral que m'agradaria seguir. Tanmateix res d'això hagués sigut possible sense la proposta del centre de recerca IdIBGi (Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Josep Trueta), on tenia previstes les pràctiques d'estada a l'empresa, concretament al grup de recerca de GenCardio que investiga la síndrome de Brugada. En conseqüència, el tema d'aquest treball i la seva part pràctica estan lligats amb la proposta que em va fer la Dra. Fabiana Scornik, la meva tutora de pràctiques i investigadora del centre.

La pràctica del treball consisteix en l'anàlisi de l'evolució de l'expressió del canal del sodi en diferents estats temporals de diferenciació dels cardiomiòcits i la comparació d'aquesta entre pacients que pateixen i no la síndrome de Brugada. D'aquesta manera es poden analitzar com afecten les mutacions implicades en la síndrome de Brugada en una proteïna essencial del cor, com és el canal de sodi de les cèl·lules. Tot aquest estudi es realitza a partir de les cèl·lules iPSC obtingudes en un procés de caracterització a cardiomiòcits, les cèl·lules del múscul cardíac. Per aquesta raó vaig plantejar el treball entorn d'aquestes cèl·lules i la seva aplicació en la recerca bàsica, la qual consisteix en el coneixement del funcionament de l'organisme i els mecanismes de les malalties. Així doncs, el fet de haver tingut l'oportunitat de treballar en aquest projecte he pogut entendre que les iPSC són una tecnologia innovadora que és molt present en les investigacions actuals, gràcies a les nombroses aplicacions que poden tenir en un futur.

L'estructura del treball s'ha dividit en dos apartats diferenciats, el marc teòric i la part pràctica. En el primer bloc s'exposa la teoria aplicada en la pràctica, és a dir, s'exposen els fonaments teòrics de la biologia cel·lular, les cèl·lules mare, les cèl·lules mare pluripotents induïdes i el cor, endinsant-me en la síndrome de Brugada. La segona part consisteix en la descripció dels protocols i els passos que es van seguir durant la fase experimental al laboratori, juntament amb l'explicació detallada dels resultats obtinguts.

En iniciar aquest projecte s'han establert uns objectius a complir que es poden classificar segons si són personal o acadèmics. Pel que fa als propòsits personals

he volgut aprendre a realitzar diferents tècniques de laboratori i tan elaborar com redactar un projecte d'un àmbit científic. A més de comprendre i sintetitzar articles científics relacionats amb l'estudi.

Pel que fa als objectius acadèmics, aquests es centren en comprendre les característiques de les cèl·lules mare i la seva importància en la medicina actual. Així com analitzar els avantatges de les iPSC respecte a les cèl·lules mare tradicionals i estudiar-ne les aplicacions, sobretot les que estan lligades a les malalties cardiovasculars. Finalment, aprendre a realitzar una investigació científica, sigui experimental o completa.

La hipòtesi plantejada en aquest estudi és: " L'expressió del canal de sodi està afectada per les variants genètiques relacionades amb la Síndrome de Brugada". Per resoldre-la es van plantejar els següents objectius:

- Analitzar el curs temporal de l'expressió del canal de sodi durant la diferenciació de cardiomiòcits a partir de cèl·lules mare pluripotents induïdes.
- Comparar el curs temporal de l'expressió del canal de sodi cardíac, l'expressió de la subunitat $\beta 1$ del canal de sodi i el marcador de cardiomiòcits troponina T durant el procés de diferenciació de cardiomiòcits a partir d'iPSC.
- Comparar el curs temporal de l'expressió del canal de sodi entre els pacients estudiats, dividits entre afectats de la síndrome de Brugada, portadors de SNV (sense afectació de la malaltia) i pacients sans.

S'ha plantejat el projecte com un estudi preliminar, una versió a petita escala d'una investigació per estudiar-ne la seva viabilitat. De manera que s'ha utilitzat un disseny experimental seguint el mètode científic, on els passos i protocols estaven molt marcats. Els protocols van ser aportats pel mateix centre de recerca de GenCardio, on es varen realitzar les pràctiques del treball de recerca i les de l'estada a l'empresa. A més, la realització de les tècniques necessàries va ser supervisada per la tutora, la Dra.Fabiana.

La metodologia utilitzada en la recerca d'informació s'ha basat en comprendre i sintetitzar la informació tant d'articles científics com de webs científiques. D'aquesta manera es van poder complir els objectius proposats assolint uns resultats preliminars de la investigació.

MARC TEÒRIC

1. BIOLOGIA CEL·LULAR

1.1. Teoria cel·lular

La teoria cel·lular estipula quatre principis, els quals van ser declarats i ampliat per diferents científics al llarg del temps. El primer postulat de la teoria cel·lular expressa que tots els éssers vius estan constituïts per cèl·lules, de manera que la cèl·lula és la unitat estructural de tots els éssers vius. El segon, declara que la cèl·lula és capaç de realitzar tots els processos metabòlics necessaris per mantenir-se en vida, per tant, és la unitat funcional de qualsevol organisme. El tercer expressa que tota cèl·lula sorgeix d'una altra cèl·lula ja existent, és a dir, la cèl·lula és la unitat reproductora dels éssers vius. Finalment, la teoria es va ampliar amb el quart postulat, que explica que la cèl·lula conté tota la informació respectiva al control del seu funcionament i la síntesi de la seva estructura que transmet als seus descendents, cosa que implica que la cèl·lula és la unitat genètica de tots els organismes. En conclusió, la teoria cel·lular declara que la cèl·lula és la unitat fisiològica, morfològica, genètica i d'origen de tots els éssers vius.

1.2. Estructura de la cèl·lula i diferenciació entre procariota i eucariota

Les cèl·lules tenen una estructura bàsica comuna independent de la seva morfologia formada per les següents parts:

- Un embolcall que forma la membrana cel·lular la qual comunica o separa la cèl·lula de l'exterior i regula l'intercanvi de molècules del seu entorn
- Contingut cel·lular anomenat citoplasma on tenen lloc tots els processos químics
- L'ADN, material hereditari que codifica la informació genètica. Aquest material es pot trobar dins un nucli o dispersat en el citoplasma.

A través de l'estructura cel·lular i la complexitat d'aquesta es poden diferenciar dos tipus de cèl·lules les eucariotes i procariotes. També existeix un tercer tipus d'organització cel·lular, els virus, que tenen una estructura més simple. Aquests es

troben en el límit entre éssers vius i inerts, com a conseqüència de la falta d'un metabolisme propi, i presenten la necessitat d'infectar una cèl·lula hosta per realitzar les seves funcions vitals.

La principal diferència entre l'estructura cel·lular procariota i l'eucariota és l'absència d'una membrana nuclear en l'estructura procariota, que té la funció d'aïllar l'ADN de la resta de la cèl·lula. També es diferencien pel gran grau de complexitat de la cèl·lula eucariota respecte la simplicitat de la procariota, cal remarcar que les cèl·lules procariotes van ser les primeres en originar-se. Finalment, també existeixen diferències en relació al metabolisme, mida o forma de reproducció.

Pel que fa la cèl·lula eucariota, existeix una subclassificació que diferencia cèl·lules vegetals i animals. Aquests dos tipus corresponen al model de cèl·lula dels éssers del regne vegetal i animal respectivament, i es diferencien per l'existència d'una paret cel·lular rígida que cobreix la membrana citoplasmàtica en les cèl·lules vegetals i l'aparició d'uns orgànuls exclusius nomenats plastids.

Les cèl·lules eucariotes animals, de les quals nosaltres estem formats, segueixen la següent estructura.

Membrana plasmàtica o cel·lular: És una estructura semipermeable i flexible que envolta la cèl·lula. Té com a objectiu donar forma i protegir l'interior de la cèl·lula, alhora que controla el pas de substàncies de l'exterior a l'interior i viceversa.

El citoplasma: És el medi que es troba entre la membrana plasmàtica i el nucli, s'encarrega de donar forma i volum a la cèl·lula. En el citoplasma podem trobar-hi els orgànuls citoplasmàtics següents:

Reticle endoplasmàtic: Està format per cavitats tancades que estan limitades per una membrana; semblant a la membrana plasmàtica. La seva funció és sintetitzar i emmagatzemar lípids, proteïnes, etc. Es poden distingir dos tipus segon si tenen ribosomes a la membrana (r.e. rugós) o no (r.e. llis).

Aparell de Golgi: Està format per cavitats allargades i corbades que tenen com a funció sintetitzar els glúcids

Vesícules: Són cavitats esfèriques formades per l'aparell de Golgi, tenen com a finalitat de transportar substàncies a l'interior de la cèl·lula.

Lisosomes: Són unes vesícules que contenen enzims digestius. Són els encarregats de reciclar restes cel·lulars de rebuig, també tenen la capacitat de destruir virus i bacteris invasors.

Mitocondris: Tenen una forma allargada o esfèrica i la seva funció es proporcionar energia a la cèl·lula.

Ribosomes: Són uns orgànuls petits i esfèrics formats per dues unitats en les quals té lloc la síntesi de proteïnes.

Centrosoma: Està format per dos centríols i una centrosfera (material proteic més dens) del qual surten els asters (filaments prims). Intervenien en la divisió cel·lular.

El nucli: Conté la informació genètica capaç de dur a terme totes les funcions de la cèl·lula. Està format per un embolcall nuclear que l'envolta, el nucleoplasma, que és el medi intern (semblant al citoplasma), la cromatina (ADN) i el nuclèol (orgànul del nucli). La seva funció és organitzar la cèl·lula i encarregar-se de la divisió cel·lular

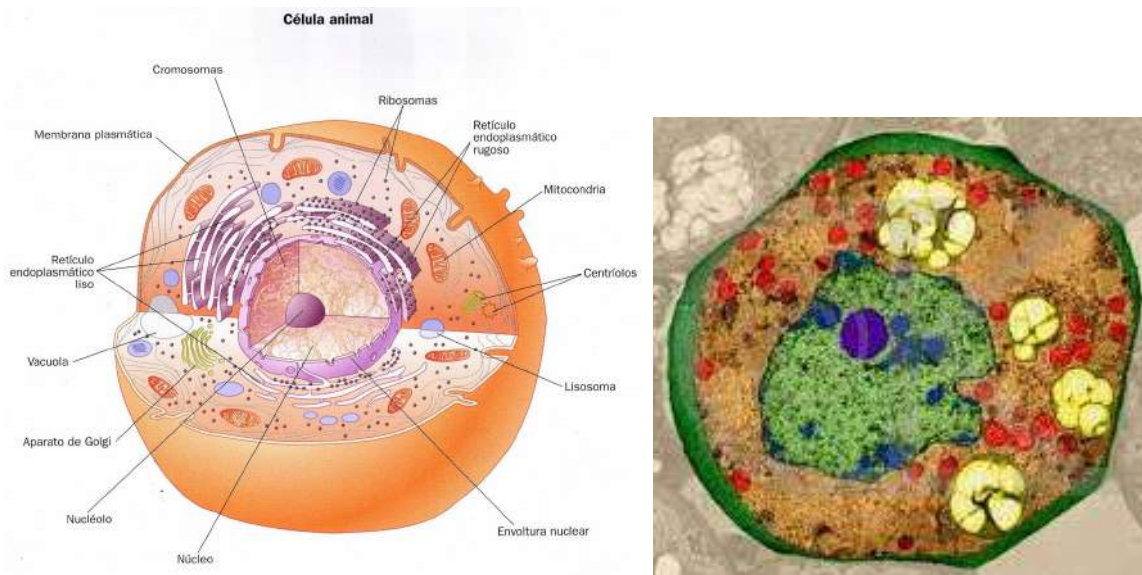


Figura 1. Cèl·lula eucariota animal. **Figura 2.** Cèl·lula eucariota animal vista des del microscopi
Font 1: Cèl·lula eucariota animal, Flickr (2015). Font 2: Estructura cel·lular, xtec.cat

2. CÈL·LULES MARE

2.1. Què són les cèl·lules mare?

Les cèl·lules mare (CM) tenen la capacitat de diferenciar-se en qualsevol tipus de cèl·lules i produir cèl·lules mares noves, a través de fraccionar-se i renovar-se autònomament. Quan es troben en les condicions adequades aquestes cèl·lules poden reproduir-se i formar cèl·lules filles amb les mateixes característiques d'autorenovació i diferenciació. Per aquest motiu, es considera que les cèl·lules mare són la matèria primera del nostre cos, ja que són les úniques cèl·lules que tenen la capacitat innata de regenerar qualsevol teixit, per això són tan importants en la medicina actual.

Les cèl·lules mare són presents en tots els organismes pluricel·lulars, principalment, es troben a la medul·la òssia, lloc on es reproduïxen. També es troben al líquid amniòtic, la sang del cordó umbilical i en els teixits del cos humà adult, en aquest últim cas s'anomenen cèl·lules mare adultes.

La funció principal de les cèl·lules mare és la regeneració de teixits, siguin ossis, cartilaginosa, dèrmica o muscular. Per altra banda, les cèl·lules mare que provenen de la sang poden ser útils pels tractaments de malalties immunitàries o del sistema sanguini.

2.2. Classificació de les cèl·lules mare

Les cèl·lules mare es poden classificar segons dos criteris diferents, el seu origen o el potencial de diferenciació. Segons l'origen es diferencien entre: CM adultes, CM embrionàries i CM perinatals.

Cèl·lules mare embrionàries (CME): Es troben en els embrions de més de quatre o cinc dies i són les que permeten desenvolupar tots els teixits i òrgans del fetus. Gràcies a la seva elevada capacitat de diferenciació poden generar qualsevol tipus de cèl·lula. Tot i que des del punt de vista dels investigadors són les més interessants, hi ha múltiples dilemes bioètics que les envolten i dificulten la seva utilització. Aquestes cèl·lules s'obtenen de la massa cel·lular interna del blastocist¹, i

¹ L'òvul fecundat que està en un moment de ràpida divisió cel·lular 5 dies després de la fecundació aproximadament

s'especialitzen en les diferents parts del cos, però si s'extreuen abans i es mantenen en un laboratori amb les condicions adequades poden retenir les seves propietats regeneratives. Actualment, es coneixen tres fonts per obtenir les CME:

- Embrions que no es van utilitzar en processos de fecundació in vitro.
- Embrions creats de cèl·lules somàtiques per tècniques de transfecció.
- Línies de CME, ja existents obtingudes de cultius cel·lulars.

Les CME són pluripotents, això significa que poden diferenciar-se en qualsevol tipus de cèl·lula del cos (excepte placenta o cordó umbilical), incloent-hi les altres cèl·lules mare. Aquesta propietat els permet regenerar i reparar teixits o òrgans danyats. A més, suponen una via d'investigació per estudiar el desenvolupament normal o l'aparició de malalties.

Cèl·lules mare adultes (CMA): Anomenades també somàtiques o òrgan-específiques, aquestes cèl·lules es poden extreure de les fonts de CM que hi ha en el nostre propi cos, com pot ser la medul·la òssia. Aquestes cèl·lules són més especialitzades que les cèl·lules mare embrionàries, és a dir, tenen una capacitat més limitada de generar diferents cèl·lules del cos, com a resultat, es dediquen a generar diferents cèl·lules per l'òrgan específic en el qual es troben. Les CMA estan ubicades en petites quantitats en zones específiques (nínxols de cèl·lules mare) dels teixits i parts de l'organisme. Allà es mantenen latents durant llargs períodes de temps fins que s'activen per reparar un teixit malmès o realitzar el cicle de renovació de les cèl·lules. Tanmateix, les CMA no s'autorenoven amb tanta facilitat com ho fan les embrionàries.

Cèl·lules mare perinatales: Són les cèl·lules mare que es troben en la sang i teixit del cordó umbilical i en el líquid amniòtic. Tenen la capacitat de diferenciar-se en cèl·lules especialitzades. Les que s'ubiquen en la sang del cordó són cèl·lules hematopoètiques i poden produir cèl·lules sanguínies sanes. Mentre que les que s'ubiquen al cordó umbilical són cèl·lules mesenquimals, poden regenerar i reparar qualsevol teixit. Les cèl·lules mare amniòtiques són molt actives, però tenen un potencial de diferenciació menor que les embrionàries.

Per altra banda, segons el potencial que tenen per generar diferents tipus de cèl·lules podem classificar-les en els següents tipus:

Totipotents: Són cèl·lules mare embrionàries, que s'originen quan l'òvul i l'espermatozoide s'uneixen per formar el zigot i durant les dues divisions cel·lulars posteriors. Poden generar qualsevol mena de cèl·lula, incloent-hi el trofoblast² de la placenta.

Pluripotents: Són capaces de diferenciar-se en pràcticament qualsevol classe de cèl·lula, excepte les totipotents i les extraembrionàries. Es troben a la massa cel·lular interna que es forma conjuntament amb el blastocist quan les cèl·lules totipotents es comencen a diferenciar, aproximadament al cap de quatre dies que es formen. Aquestes cèl·lules es poden diferenciar en tres capes de tipus cel·lulars diferenciats, és a dir, tres línies germinals: l'endoderma (capa interna) que forma l'aparell digestiu i respiratori, el mesoderma (capa mitjana) que forma els músculs, ossos i dermis, i l'ectoderma (capa externa) que forma l'epidermis, ulls, pèls, ungles i sistema nerviós. Tanmateix, no poden formar la placenta.

Cèl·lules pluripotents induïdes (iPSC): L'any 2006, el Dr. Shinya Yamanaka va aconseguir crear cèl·lules pluripotents (iPSC) a través de la reprogramació genètica en inserir quatre gens pluripotents de les cèl·lules mare a les cèl·lules somàtiques. Les iPSC són cèl·lules adultes que s'han programat genèticament en un laboratori perquè es comportin com cèl·lules mare embrionàries. Més endavant s'aprofundirà més sobre les iPSC, així com la seva obtenció, característiques i aplicacions més rellevants.

Multipotents: Es generen a partir de les CM pluripotents i es poden trobar en els teixits, per tant, han patit una primera diferenciació. Són capaces de diferenciar-se en un rang limitat de cèl·lules segons la seva ubicació, per exemple, les del sistema nerviós central poden produir neurones, astròcits i oligodendròcits. Aquest tipus de cèl·lules s'utilitzen en els trasplantaments de teixits, ja que tenen menys possibilitats de ser rebutjades.

Unipotents: Tan sols poden generar un tipus de cèl·lules específiques, per exemple les cèl·lules de la pell que es troben en constant renovació. Aquesta mena de cèl·lules s'originen a partir de les CM pluripotents.

² Capa cel·lular que envolta els blastòmers (cèl·lula amb nucli on es troba la informació genètica) i que té com a funció la nutrició.

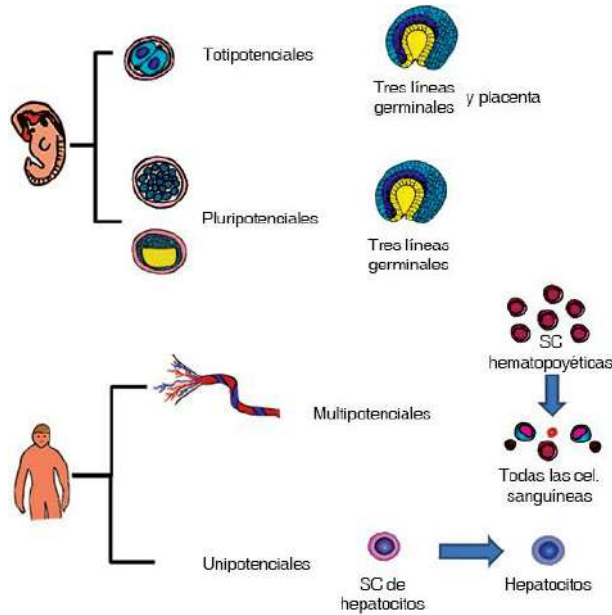


Figura 3 Classificació CM segons l'origen i potencial (les CME a dalt i les CMA a baix)

Font: *Generalidades y aplicaciones de las células madre*, Scielo (2013)

2.3. Diferenciació de les cèl·lules mare

La diferenciació cel·lular consisteix en un procés a través del qual les cèl·lules no especialitzades, que són més joves i immadures, adquireixen característiques individuals i funcions específiques, és a dir, es converteixen en cèl·lules especialitzades. La diferenciació de les cèl·lules embrionàries comporta una reducció del seu potencial, és a dir, perden la seva capacitat de generar diferents tipus de cèl·lules en especialitzar-se. Cada pas de la diferenciació es controla a través de combinacions de substàncies químiques i senyals genètics. A mesura que avança el procés de la diferenciació, les cèl·lules van reduint la seva plasticitat, el seu nivell de potencial i capacitat de diferenciar-se, de manera que passen de ser cèl·lules totipotents a pluripotents i multipotents (organoespecífiques), fins a acabar sent cèl·lules especialitzades amb una funció concreta en un teixit o òrgan determinat. La diferenciació ocorre a través del silenciament de diferents gens durant el desenvolupament de la cèl·lula, fet que comporta que la plasticitat de la cèl·lula es redueixi i s'acabi convertint en una cèl·lula especialitzada amb una expressió gènica específica. A mesura que es produeix la diferenciació, les cèl·lules experimenten per uns canvis funcionals, adquirint les funcions que fan les cèl·lules en les quals es diferenciaran. Aquest procés pot presentar cert grau de reversibilitat.

Tanmateix, amb les intervencions genètiques adequades poden ser reprogramades per transformar-se en altres tipus cel·lulars, aquest és el cas de les cèl·lules mare pluripotents induïdes.

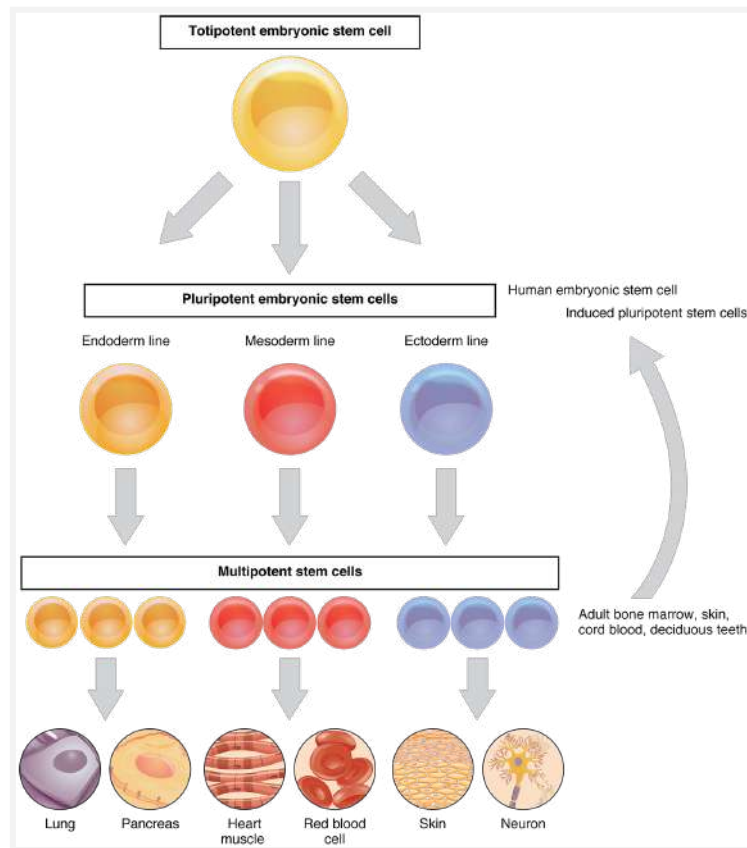


Figura 4. Fases de la diferenciació cel·lular

Font: Neural Stem Cell images, Pngwing

2.4. Mètodes d'obtenció de cèl·lules mare

Es poden obtenir cèl·lules mare mitjançant diverses vies. En primer lloc, es poden aconseguir a través d'embrions, també se'n poden extreure directament de l'organisme o mitjançant cèl·lules pluripotents induïdes.

A través dels embrions podem obtenir CME. Per fer això s'han de fabricar embrions que creixeran i es desenvoluparan en un laboratori durant 5 o 7 dies fins que es transformin en un blastocist. Un cop s'ha assolit això, es destrueix l'embrió i s'extreuen les cèl·lules de la massa cel·lular interna que es cultiven per donar lloc a les cèl·lules mare embrionàries. Es poden obtenir embrions mitjançant tres tècniques diferents:

Mitjançant reproducció sexual: Es realitza una fecundació induïda a través de la reproducció assistida. Les tècniques utilitzades són la fertilització in vitro o l'ICSI (microinjecció aspèrmica). Amb la reproducció sexual l'embrió rep la meitat de la informació genètica d'ambdós progenitors. Actualment, hi ha pocs països que permeten obtenir CME a partir d'embrions. En alguns casos els embrions s'obtenen de l'excedent de les tècniques de reproducció assistida i no han utilitzat tots els embrions, mentre que d'altres països permeten fecundacions in-vitro per tal d'obtenir embrions destinats a la investigació.

Mitjançant transferència nuclear: Consisteix en una reproducció asexual que permet crear embrions a partir de l'ADN de tan sols un donant. Així i tot, aquest mètode encara està en fase d'investigació. Seguint aquesta metodologia l'embrió es forma a partir de qualsevol cèl·lula somàtica o nucleada corporal. El nucli d'una cèl·lula somàtica s'implanta en un òvul no fecundat al qual se li ha extret el nucli amb tots el seu material genètic. L'òvul, ja reconstruït, s'estimula i comença a desenvolupar-se com a embrió, ja que segueix les instruccions que li donen els cromosomes del seu nucli sense importar d'on prové. A través d'aquest procés es clona una mateixa cèl·lula, aconseguint així un embrió genèticament idèntic al donant.

Mitjançant la partenogènesi: Consisteix en una reproducció asexual que està en fase d'investigació i permet crear embrions a partir d'un òvul. Mitjançant l'aplicació d'uns estímuls químics, elèctrics o tèrmics, que causen que l'òvul es comporti com si s'hagués fecundat i pot formar un embrió.

Un cop s'ha obtingut l'embrió es realitza una clonació. Existeixen dues tècniques de clonació, tot i que per obtenir CME amb fins acadèmics només se n'utilitza una, el clonatge terapèutic.

Clonatge reproductiu: Té com a finalitat implantar l'embrió clonat a l'úter d'una femella. Aquesta pràctica està prohibida en l'ésser humà, però s'han obtingut resultats per clonatge reproductiu en animals, com és el cas de l'ovella Dolly que es va fer per transferència nuclear.

Clonatge terapèutic: L'embrió es cultiva al laboratori en unes condicions concretes per assegurar-se que assumeix un grau de desenvolupament òptim (blastocist) que

ens permeti aïllar i cultivar les cèl·lules de la massa cel·lular interna, que és una font de cèl·lules mare embrionàries. Les CME que s'obtenen a través del clonatge terapèutic mitjançant la transferència nuclear són CME genèticament idèntiques a l'individu que ha subministrat la cèl·lula somàtica. Si el receptor del trasplantament és el seu propi donant, es podria anul·lar la possibilitat d'un rebuig immunològic en els trasplantaments.

En el nostre cos hi ha diferents fonts de cèl·lules mare, com poden ser teixits o òrgans. D'aquesta manera podem obtenir CM d'humans a partir de:

Fetus: Els teixits i òrgans que s'obtenen dels fetus que han patit un procés d'avortament poden proporcionar CME germinals, a partir de la cresta gonadal de fetus de 5-10 setmanes, o CMA, a partir de restes de teixits fetals.

Líquid amniòtic: Conté cèl·lules mare fetals mesenquimàtiques que són semblants a les CME i tenen un gran potencial en l'àrea d'investigació.

Cordó umbilical: Mitjançant una punció a la vena del cordó umbilical durant els quinze minuts després del part, es poden aconseguir cèl·lules mare adultes. En el seu teixit també es poden obtenir CMA, però encara està en fase d'investigació.

Individus adults: A través de teixits i òrgans diferenciats d'individus adults es poden obtenir CMA. Alguns d'aquests teixits són la medul·la òssia, la sang, el cervell, els músculs esquelètics, la polpa dental, la còrnia i la retina, el fetge, l'epiteli de la pell, i del sistema digestiu, el pàncrees i el teixit adipós. La seva obtenció no presenta dilemes ètics i es poden extreure d'individus vius donants, o morts, a través de l'autòpsia.

Una altra alternativa per obtenir CM són les cèl·lules iPSC, les quals s'explicaran amb més profunditat en el llarg del treball.

2.5. Aplicacions de les cèl·lules mare en la biomedicina

En el món de la investigació i medicina s'ha generat un gran interès pels estudis amb cèl·lules mare, que poden ajudar en diverses àrees. Els seus possibles usos són:

Comprendre millor el desenvolupament de les malalties i afeccions: es podran entendre els mecanismes bàsics a través de l'observació de la maduració de cèl·lules mare per formar altres cèl·lules de diferents teixits.

Aplicacions directes en la medicina regenerativa: La utilització de CM diferenciades per substituir o regenerar teixits i òrgans malmesos. Aquesta aplicació podria ser de molta utilitat en pacients amb lesions a la medul·la espinal, la malaltia de Parkinson, la diabetis tipus 1, les malalties cardíaques, el càncer, l'osteoartritis i l'Alzheimer, entre d'altres. A més, gràcies a la seva capacitat regeneradora podrien ser emprades en trasplantaments.

Per analitzar la qualitat dels nous medicaments amb seguretat i eficàcia: Pot tenir un gran impacte en el desenvolupament de fàrmacs. Les cèl·lules mare s'han de programar per especificar-se en el teixit sobre el qual actua el medicament, les proves pretenen indicar si existeix algun efecte sobre les cèl·lules o no. Tot i això, aquesta tècnica encara es troba en fase experimental.

Trasplantament de cèl·lules mare: Consisteix a utilitzar la capacitat regeneradora de les cèl·lules mare per reparar teixits. Per exemple, podríem fer servir cèl·lules mare del teixit danyat quan es produeix un atac de cor perquè aquestes reparin l'òrgan. Les nostres pròpies cèl·lules mare tenen una capacitat limitada per realitzar aquest procés, però en trasplantar milions de cèl·lules mare podem incrementar la seva capacitat.

Tot i això, encara existeixen diferents reptes i riscos que s'han de solucionar i valorar abans de posar en pràctica aquestes teràpies, com la formació de tumors o el rebuig immunitari.

Actualment, l'única teràpia definitiva que utilitza cèl·lules mare que s'està duent a terme és el trasplantament de medul·la òssia. Les cèl·lules mare sanguínies de la medul·la òssia s'utilitzen com a element terapèutic en el seu trasplantament i s'utilitzen per renovar la medul·la òssia danyada. La medul·la òssia és un teixit esponjós que es troba en l'interior de certs ossos com les crestes ílíaques (ossos del maluc), l'estèrnum o el crani. La medul·la conté cèl·lules mare hematopoètiques que formen cèl·lules sanguínies, ja siguin glòbuls blancs (defensa contra infeccions), glòbuls vermells (transport d'oxigen al cos) o plaquetes (coagulació de la sang).

Aquest tipus de trasplantament es fan servir en tractaments contra alguns càncers, com la leucèmia, limfoma, mielodislàsia o mieloma múltiple. També s'investiga el possible ús en tractaments de malalties autoimmunitàries, que afecten la producció de cèl·lules a la medul·la òssia i en la tolerància d'òrgans trasplantats.

A través de l'aïllament de cèl·lules mare sanguínies pures es poden transferir el nombre necessari de cèl·lules per renovar la medul·la òssia i regenerar el sistema sanguini. Les cèl·lules mare s'injecten al torrent sanguini amb un catèter venós central, en un procés similar al de transfusió sanguínia, de manera que no s'acostuma a necessitar cirurgia. Llavors les cèl·lules mare viatgen a través de la sang fins a la medul·la òssia. Abans de fer aquest trasplantament els pacients de càncer es veuen sotmesos a tractaments de quimioteràpia o radioteràpia per destruir qualsevol mena de cèl·lula cancerosa, aquest procés també destrueix el que queda de medul·la òssia sana per així forçar el creixement de noves cèl·lules mare.

Es coneixen tres tipus de trasplantament de medul·la òssia:

Autotrasplantament: S'utilitzen les cèl·lules mare del pacient extretes abans que se sotmetés al tractament de quimioteràpia o radioteràpia. Aquestes es congelen fins que el pacient acaba la quimioteràpia. Seguidament, s'injecten al pacient per activar la producció de cèl·lules sanguínies normals. Aquest tipus de trasplantament es denomina trasplantament de rescat.

Al·lotrasplantament: S'empren cèl·lules mare d'un altre donant, aquest ha de ser parcialment compatible en termes genètics de manera que hi hagi les menors complicacions possibles en el tractament i evitar un rebuig.

Trasplantament de sang del cordó umbilical: Aquest és un tipus d'al·lotrasplantament en el qual s'usen les cèl·lules mare que s'extreuen del cordó umbilical d'un nounat normalment es congelen per fer-les servir en un futur. Com que les cèl·lules de la sang del cordó umbilical són més immadures no és necessari que la comptabilitat sigui tan exacte, per altra banda, en haver-hi un nombre menor de cèl·lules, els hemogrames sanguinis poden trigar més temps a recuperar-se.

Per minimitzar els efectes secundaris del trasplantament s'utilitzen les cèl·lules mare més compatibles amb les del pacient. La compatibilitat s'analitza mitjançant exàmens sanguinis espacials, normalment els germans i parents propers tenen més

possibilitats de ser compatible, en cas que aquests no puguin ser donants també existeixen registres nacionals de medul·la òssia que permeten obtenir medul·la òssia de donants compatibles. El factor que afecta la compatibilitat de dos individus són el conjunt de proteïnes que es troben a la superfície de la cèl·lula que s'anomenen antígens del grup leucocitari humà A (HLA). Com més gran sigui el nombre d'antígens HLA compatibles més possibilitat hi ha que un pacient accepta-hi les cèl·lules mare del donant.

Les cèl·lules mare es poden recollir a través de dos possibles processos. El primer és la recol·lecció de medul·la òssia, que consisteix en una cirurgia menor en la qual s'extreu medul·la de la part posterior dels ossos del maluc, la quantitat extreta dependrà del pes del pacient a qui es doni aquesta medul·la òssia. El següent procés s'anomena leucocitafèresis. En aquest procés el pacient rep diverses injeccions per desplaçar les cèl·lules mare de la medul·la òssia fins a la sang que després s'extraurà a través d'una via intravenosa. A continuació se separen els glòbuls blancs dels glòbuls vermells, que es retornen al donant. Aquest tipus de trasplantament presenta alguns riscos. Per una banda, el donant pot patir una sèrie de símptomes causats pel trasplantament de medul·la òssia com són: dolor toràctic, reducció de la pressió arterial, febre, calfreds, sufocació, sabor estrany a la boca, mal de cap, ronxes, nàusees o dificultat per respirar. D'altra banda, el pacient també pot desenvolupar certes complicacions que depenen de factors com l'edat, la seva salut, la comptabilitat del donant o el tipus de trasplantament de medul·la òssia que s'ha efectuat. Les complicacions inclouen: anèmia, sagnat a diferents parts del cos, cataractes, insuficiència d'un empelt³, infeccions i inflamació o malaltia empelt-contra-hoste (EICH)⁴.

2.6. Dilemes bioètics de les cèl·lules mare

En les últimes dècades, la bioètica s'ha convertit en un aspecte indispensable en el desenvolupament de la ciència. Per tant, no és d'estranyar que es produeixin diversos debats ètics entorn les cèl·lules mare, el seu ús i obtenció. A més a més, en ser un tema que avança tan ràpidament, la legislació encara està en procés

³ Les noves cèl·lules no s'estableixen dins del cos i no comencen a produir cèl·lules mare

⁴ afecció en la qual les cèl·lules del donant ataquen el seu propi cos.

d'adaptació, per la qual cosa els investigadors s'han d'anar ajustant a les normes i lleis segons es publiquen.

L'any 1998 es van produir els primers cultius amb cèl·lules mare embrionàries d'humans, aquestes línies cel·lulars haurien de ser "immortals" si es mantenen congelades en les condicions adequades. És per això, que les CME han generat diferents dilemes bioètics pel fet de la destrucció d'embrions poc desenvolupats per la seva obtenció. Els embrions utilitzats per fer aquest tipus d'experiments deriven de clíniques de reproducció assistida on els embrions es conserven congelats, ja sigui perquè en les tècniques de fecundació in vitro se solen utilitzar més embrions dels necessaris o perquè han sigut donats pels seus progenitors, en ser fecundats. Un dels fets que es plantegen és si cal considerar aquests embrions en un estat poc avançat, la fertilització de l'òvul, una vida humana amb tots els seus drets. Com que l'embrió és l'inici de la vida humana alguns especialistes opinen que es pot considerar una vida, mentre que d'altres argumenten que el grau de desenvolupament no és prou alt. En el moment en què es va començar a realitzar la FIV, la legislació no admetia cap altre destí pels embrions humans generats mitjançant aquesta tècnica que la seva transferència a un úter amb una finalitat reproductiva. Tanmateix, amb l'inici de l'experimentació amb CM es van obrir les discussions sobre altres vies possibles per aquests embrions.

També hi ha altres dilemes que presenten les CM, encara que no tenen tant ressò com l'anterior. Com el fet que únicament les persones amb més recursos econòmics solen tenir accés a aquest tipus de tractaments experimentals, o si no, tenen accés de manera més ràpida, ja que acostumen a tenir més accés a aquest tipus d'informació. A més, hi ha gent que es nega a rebre tractaments amb CM o no volen que s'apliqui en menors d'edat. Paral·lelament, hi ha cert personal sanitari que es nega a participar en tractaments que utilitzin CM o facin servir materials derivats d'elles. En últim lloc, també hi ha el problema del consentiment informat, ja que els sanitaris s'han d'assegurar que el pacient conegui i compregui tots els riscos i efectes derivats d'aquests tractaments, com que també reconegui el fet que encara és un terreny molt desconegut.

Tanmateix, d'ençà que es van començar aquest tipus d'experimentació fins ara hi ha hagut molts avenços en aquest camp, fet que provoca que els dilemes ètics canviïn

i que la legislació s'hagi de renovar constantment. Un d'aquests avenços és la creació de cèl·lules mare pluripotents induïdes, en aquest cas permet la possibilitat d'haver d'evitar destruir embrions per l'obtenció de cèl·lules semblants a les CM.

3. CÈL·LULES MARE PLURIPOTENTS INDUÏDES

3.1. Què són les cèl·lules iPS?

En els darrers anys s'ha estat investigant la possibilitat de crear cèl·lules mare a partir de cèl·lules diferenciades adultes, a través d'un procés anomenat reprogramació. Gràcies a aquest procés s'obtenen les cèl·lules mare pluripotents induïdes, anomenades també cèl·lules iPS o iPSC (de l'anglès *induced pluripotent stem cells*).

Les cèl·lules mare pluripotents induïdes són cèl·lules somàtiques, derivades de la pell o cèl·lules sanguínies, que a través de l'enginyeria genètica s'han programat per comportar-se com cèl·lules mare embrionàries i adquirir el seu nivell de pluripotencialitat, per tant, la capacitat de diferenciar-se en qualsevol tipus de cèl·lula. Aquesta reprogramació s'aconsegueix induint la sobreexpressió de certs factors de transcripció (en concret els factors de Yamanaka: KLF4, SOX2, OCT4 i cMYC) que pretenen desdiferenciar les cèl·lules perquè tornin a adquirir plasticitat.

Obtenir les iPSC de cèl·lules ja diferenciades permet eliminar les qüestions ètiques que estan implicats en l'obtenció de cèl·lules mare a través d'embrions. També, és una font il·limitada de qualsevol classe de cèl·lula que es pugui necessitar per finalitats terapèutiques. A més, en els trasplantaments, si s'obtenen iPSC del mateix pacient s'eliminen els problemes derivats del rebuig immunològic. Per tant, les iPSC tenen un gran ventall d'aplicacions per tractar diferents malalties, convertint-se en una eina essencial per la medicina regenerativa.

3.2. Descobriment de les iPSC

L'any 1962, un investigador britànic, John B. Gurdon, va descobrir que l'especialització de les cèl·lules és reversible. Gurdon va demostrar que es podien obtenir granotes clonades en substituir un nucli cel·lular immadur d'una cèl·lula de l'òvul de la granota pel nucli d'una cèl·lula intestinal madura. També va observar que l'ADN de la cèl·lula madura somàtica encara conservava la informació genètica necessària per desenvolupar tota la resta de cèl·lules de la granota, de manera que a més de retenir la informació genètica es podia revertir la diferenciació amb una manipulació artificial. El 1987 un altre grup d'investigadors liderats per Davis va

demostrar que es podia convertir directament fibroblasts⁵ de ratolí en mioblasts⁶ mitjançant l'expressió forçada del gen de diferenciació miogènica 1 (Myod1).

Aquests dos descobriments, la transferència somàtica nuclear i la reprogramació directa, van establir la base per les posteriors investigacions sobre la inducció de la pluripotència. De manera que el 2006 un grup d'investigació liderat per Yamanaka van descobrir que activant certs gens en les cèl·lules somàtiques es podia revertir la seva diferenciació i adquirir un estat amb més pluripotencial. És a dir, com les cèl·lules madures, en aquest cas fibroblasts de ratolí, es podien reprogramar per convertir-se en cèl·lules mare immadures, que tenien un comportament similar a les CME. Yamanaka va utilitzar un retrovirus per induir i forçar l'expressió dels quatre factors de transcripció utilitzats per activar els gens necessaris, aquests factors es coneixen com a factors de Yamanaka i són Oct4, Sox2, Klf4 i c-Myc. Les cèl·lules obtingudes es van anomenar cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC). El 2007 aquest mateix grup va fer servir la mateixa metodologia per reprogramar fibroblasts humans aconseguint les primeres iPSC humanes. El mateix any, un altre grup liderat per Yu va poder reprogramar fibroblasts humans, però a través d'uns altres factors de transcripció coneguts com: Oct4, Sox2, Nanog i Lin28.

Des de llavors s'han generat amb èxit iPSC de diferents espècies (ovelles, porcs, vaques, etc.), tot i que generalment es continua fent ús iPSC humanes o de ratolí. També s'han generat iPSC a partir de diferents tipus de cèl·lules somàtiques. Els avenços relacionats amb l'estudi i generació d'iPSC suposen una gran eina que ofereix moltes oportunitats per entendre els mecanismes de certes malalties i descobrir nous tractaments.

3.3. Obtenció d'iPSC

La reprogramació d'una cèl·lula somàtica a una iPSC amb característiques similars a les CME, les quals tenen la capacitat de diferenciar-se en una gran varietat de tipus cel·lulars, i proliferar durant un temps indefinit sense perdre les seves característiques, suposa un gran avenç per la medicina regenerativa presentant moltes aplicacions terapèutiques. Des del descobriment de les iPSC s'han investigat

⁵ Fibroblast: cèl·lules que contribueix a la formació del teixit connectiu, un material fibrós que suporta i connecta teixits i òrgans.

⁶ Mioblast: Célula indiferenciada de las fibras musculares.

diversos mètodes per obtenir-les de la manera més eficient possible, a continuació s'anomenaran els mètodes més comuns.

3.3.1. Reprogramació mitjançant factors de transcripció

Els factors de transcripció són proteïnes que regulen la transcripció dels gens, és a dir, controlen com es copien en ARN les bases nitrogenades de l'ADN durant el procés de transcripció per la posterior producció de proteïnes. Serveixen per controlar la producció de proteïna de certs gens, ja que si els gens no es transcriuen en una cèl·lula, aquesta no pot produir proteïna. Els factors activadors promouen la transcripció, augmentant la producció de proteïna, mentre que els repressors la disminueixen. També tenen la capacitat "d'apagar i encendre" certs gens en parts específiques del cos, a través de potenciadors i silenciadors que són conjunts de receptors on s'uneixen els factors de transcripció. A més, aquests factors permeten que les cèl·lules facin operacions lògiques i combinin diferents fonts d'informació per "decidir" expressar un gen.

Durant els estudis dels grups de Tada, Cowan i Yu es va observar que hi ha certs factors en les CME dels humans que permetien la inducció de la desdiferenciació de la cèl·lula somàtica, és a dir recuperar la seva capacitat potenciadora induint l'expressió d'alguns gens marcadors de pluripotencialitat com l'Oct4 i el Nanog. Shinya Yamanaka el 2006 va començar una identificació dels factors que induïen a aquesta desdiferenciació a través d'una anàlisi de 24 factors que van permetre identificar quatre gens: Oct4, Sox2, c-Myc i Klf4. Es va demostrar que aquests gens eren suficients per reprogramar fibroblasts de ratolins, i més tard també d'humans, i generar unes cèl·lules amb un fenotip similar a les CME, conegudes com a iPSC.

El procés de reprogramació es realitza a través de la introducció de diferents factors de transcripció a cèl·lules somàtiques, anomenats Factors de Yamanaka, però també hi ha diferents variacions, els factors que se solen introduir en combinacions diferents inclouen Oct4, Sox2, Klf4, Lin28 i c-Myc. Aquests factors reconeixen seqüències concretes d'ADN i activen o aturen la seva transcripció unint-se a elements d'ADN pròxims als seus promotors o regions més aïllades. Les noves combinacions estudiades tenen com a objectiu eliminar els factors potencialment perillosos com el c-Myc, ja que s'ha demostrat de la seva desregulació pot provocar una inestabilitat genòmica i desencadenar l'aparició de càncer. S'han trobat

evidències què aquest factor pot ser prescindible per la reprogramació, tot i que l'eficiència del procés es veuria reduïda. Per aquest motiu es busquen combinacions que eliminin el c-Myc i mantinguin l'eficiència. Paral·lelament, també s'ha observat que es poden substituir els factors Sox2 i Klf4 mitjançant l'addició de certs compostos en el medi de cultiu.

La regulació de l'estat de pluripotencial de la cèl·lula es mesura mitjançant els factors Oct4, Sox2 i Nanog. Aquests factors de transcripció formen una xarxa d'interaccions a través de la formació d'heterodímers⁷ que actuen sobre els grups promotors⁸ dels gens diana. D'aquesta manera indueixen l'expressió dels gens que promouen la pluripotència i inhibeixen aquells que actuen en la diferenciació, a més regulen la seva pròpia expressió.

Seguidament, explicaré les propietats i característiques de cadascun dels factors de Yamanaka:

Oct4 (Pou5f1): És un element clau pel manteniment de la pluripotència i té un gran paper en el desenvolupament embrionari inicial. La seva deficiència en embrions és letal, ja que encara que hi ha formació del trofoblast, la massa cel·lular interna del blastocist no es desenvolupa. Per contra, si els nivells d'Oct4 són molt elevats indueixen a la diferenciació, per tant, quan s'estan reprogramant les cèl·lules els nivells d'expressió d'aquest factor han d'estar estrictament regulats, de manera que no diferenciïn la cèl·lula abans d'hora.

Sox2: Està involucrat en la regulació del desenvolupament embrionari i la determinació de la funció de la cèl·lula. El Sox2 es necessita per mantenir la renovació de CME cèl·lules neuronals indiferenciades. També coopera amb Oct4 per formar un heterodímer que presenta la funció d'activador o repressor de la transcripció que indueix a l'expressió de Nanog, un gen que està implicat en el manteniment de la pluripotència. També regulen altres gens com Fgf4, osteopontina i Lefty. Tanmateix, a diferència d'Oct4, es pot expressar també en etapes més avançades del desenvolupament, com en les CM neuronals. Diferents anàlisis apunten que Oct4, Sox2 i Nanog són gens mestres en la regulació de la

⁷ Heterodímers: molècules formades per dos components diferents i unides per un enllaç químic, com les proteïnes o polipèptids

⁸ Grups promotors: regions d'ADN que controlen la iniciació de la transcripció d'un tros concret d'ADN/ARN, per tant, promouen la transcripció d'un gen

pluripotència, així i tot, en els factors de Yamanaka el factor Nanog no és necessari per a la reprogramació de les iPSC, ja que l'expressió d'Oct4 ja induïx l'expressió de Nanog. A més, aquest està més relacionat amb la capacitat de reprogramació que la de pluripotència.

Klf4: El seu paper està relacionat amb la inhibició de p53, un gen que produeix una proteïna que controla la divisió i destrucció de les cèl·lules. D'aquesta manera controla el cicle cel·lular i contraresta l'acció de c-Myc en la inducció de l'apoptosi (tipus de mort cel·lular) i la diferenciació. El Klf4 té un paper doble com oncogen⁹ i antioncogen¹⁰. Té dominis tant en l'activació transcripcional com amb la repressió.

c-Myc: És un potent oncogen i un dels més freqüentment irregulars en el càncer humà. Està implicat en la replicació de l'ADN, la proliferació cel·lular, la inhibició de la diferenciació cel·lular i la metastasi. Tot i no ser imprescindible per la reprogramació cel·lular, té una gran influència en l'eficiència del procés. Es creu que el seu paper pot estar relacionat amb la inducció del programa cel·lular necessari per a l'autorenovació i la inducció de modificacions epigenètiques que bloquegen la diferenciació i promouen la de-diferenciació.

Sistemes de reprogramació

Per induir les cèl·lules a la pluripotència s'han d'introduir els factors de transcripció en les cèl·lules dianes. Per fer això s'utilitzen diferents sistemes amb variacions en la seva eficiència, taxa d'aneuploïdia (anormalitats en el nombre de cromosomes) i seguretat. Se'n poden diferenciar dos tipus segons la naturalesa viral (vectors virals i no virals) o segons la capacitat d'integració en el genoma de la cèl·lula (sistema integratiu o no integratiu).

⁹ Oncogen: gen anormal o activat que prové de la mutació d'un al·lel d'un gen normal. Participa en el creixement de les cèl·lules.

¹⁰ Antioncogen: gen que produeix una proteïna supressora de tumors que controla la multiplicació cel·lular)

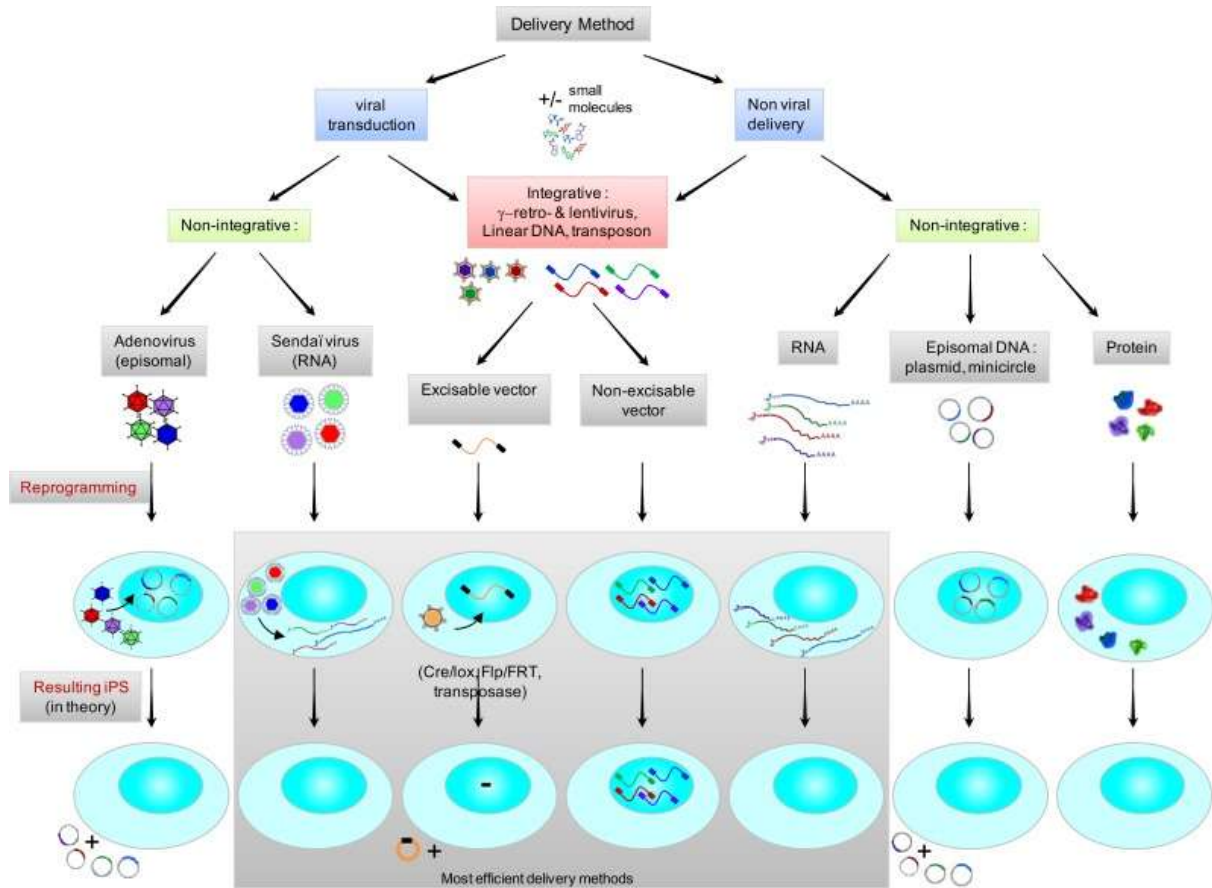


Figura 5: Mètodes de lliurament per a la reprogramació d'iPSC.

Font: *Technological Overview of iPSC Induction from Human Adult Somatic Cells*, NIH (2013).

A continuació explicaré alguns dels mètodes més utilitzats:

Mètodes integratius: En un mètode integratiu l'ADN extern es manté dins el genoma de les noves iPSC. Hi ha diferents mètodes d'aquest tipus, que poden ser virals o no:

Retrovirus: És un mètode viral que es va fer servir per crear les primeres iPSC (per part de Takahasi i Yamanaka) i actualment és dels més utilitzats per realitzar aquest procés. Tanmateix, durant la integració dels vectors retrovirals es poden produir alteracions cromosòmiques en la cèl·lula influïent en les línies cel·lulars i les seves propietats. A més, s'ha vist que les iPSC aconseguïdes fent ús d'aquest mètode mostren major taxa d'aneuploidia (desequilibri en el número de cromosomes causat per l'absència o l'excés de cromosomes supernumeraris). Els vectors retrovirals permeten el lliurament de gens al genoma de les cèl·lules en divisió i solen silenciar-se en les

cèl·lules immadures, cosa que permet que les iPSC es reprogramin totalment.

Lentivirus: Com que els retrovirus tan sols poden transfectar¹¹ les cèl·lules que es troben en divisió, els lentivirus resulten una opció alternativa per augmentar l'eficiència de procés. Perquè, al contrari que els retrovirus, els lentivirus poden transfectar les cèl·lules que estan en divisió i les que no. També presenten una capacitat de clonació lleugerament major. Malauradament, els lentivirus suposen una preparació més llarga i complicada, a més, no eliminen els problemes d'alteracions genètiques en les línies iPSC generades i, fins i tot, podrien induir tumors. Els vectors de lliurament lentivirals solen derivar del VIH.

ADN lineal: La transfecció d'ADN lineal mitjançant lipomes o electroporació és una bona alternativa en cas de no voler utilitzar vectors virals. En comparació amb els anteriors, l'eficiència d'aquest mètode és menor, ja que la quantitat de cèl·lules que reben el conjunt sencer de factors de reprogramació és menor. Aquest sistema és més senzill que els anteriors, però a causa de la baixa eficiència i la baixa quantitat de cèl·lules transfectades requereix moltes cèl·lules donants, fet que afegeix més dificultats al procés. A més a més, molts clons obtinguts amb aquest mètode presenten nivells intermedis de reprogramació cel·lular. No obstant això, el principal avantatge d'aquest sistema és l'eliminació de l'ADNc¹² en la reprogramació, fet que pot millor el potencial de diferenciació i reduir el potencial oncogènic.

Mètodes no integratius: Són utilitzats amb l'objectiu de minimitzar o eliminar les alteracions en el genoma de les iPSC, sorgits dels mètodes integratius, mantenint l'eficiència del procediment. Alguns d'aquests mètodes són els vectors lentivirals extraïbles, vectors virals no integratius com el virus Sendai o l'adenovirus, les

¹¹ Transfectar: introducció de material genètic extern en cèl·lules eucariotes mitjançant plasmidis o altres eines resultant en la infecció de la cèl·lula per part d'un virus

¹² L'ADN complementari (ADNc) és una molècula d'ADN d'una doble cadena, en què una constitueix una seqüència totalment complementària a l'ARN missatger a partir del qual s'ha sintetitzat

proteïnes recombinants, els vectors episomals o els vectors sintètics d'ARNm. A continuació explicaré més detalladament alguns d'aquests.

Adenovirus: Els adenovirus utilitzen les cèl·lules de l'hoste per replicar el seu propi genoma i, així, poder-se reproduir. A diferència dels retrovirus, els adenovirus no incorporen el seu genoma en l'ADN de l'hoste. Per tant, no presenten els mateixos problemes. En comptes d'incorporar els transgens en el genoma de l'hoste, cosa que implica que s'han d'extirpar, els gens s'expressen directament en el genoma viral. L'eficiència de la reprogramació és molt baixa, no obstant les iPSC creades a partir d'aquest mètode són pluripotents. A més, no es detectà genoma viral en les iPSC ni tampoc la formació de cap tumor, fet que suposa una reducció de l'amenaça de tumorigènesis en les iPSC.

Virus Sendai: La utilització del virus Sendai (SV) és un dels mètodes més segurs i eficients per la reprogramació cel·lular, ja que és eficaç en cèl·lules difícils de reprogramar i pot obtenir iPSC sense alteracions genòmiques. El SV és un virus embolcallat d'ARN monocatenari, que té com a principal característica la capacitat d'infectar un ampli nombre de cèl·lules de diferents espècies. Això és degut a la presència d'àcid siàlic, mecanisme utilitzat pel SV per infectar cèl·lules, que es troba en molts tipus cel·lulars. A més, com que els vectors d'ARN viral es mantenen en el citoplasma i, per tant, no s'integren en el genoma de la cèl·lula hoste, la informació genètica no es veu alterada. Així i tot, aquest mètode també inclou inconvenients com la dificultat per provar altres factors de reprogramació a causa de la dependència d'un kit comercial, l'eliminació lenta de l'ARN de SV i la manca de SV de grau clínic per a la reprogramació.

Proteïnes: Recentment, alguns estudis han suggerit que potser no es necessita utilitzar material genètic per la reprogramació de les iPSC. Un dels mètodes possibles és la transducció de proteïnes, un mètode en el qual es creen proteïnes que fusionen cadascun dels transgens en una seqüència peptídica que penetra la membrana cel·lular. Gràcies a l'eliminació del material genètic en la reprogramació cel·lular és possible eliminar el risc de

tumorigènesis i expressió genètica distorsionada per culpa la reactivació de transgens.

3.3.2. Reprogramació mitjançant molècules petites

Un dels principals problemes en la utilització clínica de les iPSC és la baixa eficiència en què s'obtenen i la manipulació genètica que requereixen per la inducció de l'expressió ectòpica¹³ dels factors de reprogramació. Per aquesta raó s'estan començant a enfocar investigacions en la utilització de "molècules petites" per substituir la utilització dels virus i així augmentar l'eficiència de la generació d'iPSC.

Les molècules petites són compostos orgànics amb un pes molecular baix i una mida d'ordre 1nm que poden regular un procés biològic. Un exemple és BIX-01294, un inhibidor de G9a histona metiltransferasa (enzim capaç d'unir-se a l'ADN per impedir la transcripció de gens situats en un lloc concret). Aquesta molècula augmenta l'eficiència de la reprogramació de les cèl·lules transduïdes tan sols amb els factors Oct4 i Klf4 a nivells similars als obtinguts amb els factors de Yamanaka. Per augmentar l'eficiència de la reprogramació amb els factors tradicionals, fins a arribar a un augment de 200 vegades més, s'han utilitzat les següents molècules en diferents combinacions: SB431542 (inhibidor d'un dels receptors de TGFβ, que és inhibidor de creixement), PD03252901 (inhibidor de la via MEK-ERK relacionada amb la diferenciació i proliferació), i Thiazovivin (augmenta la supervivència cel·lular després de la tripisinizació¹⁴). Per altra banda, l'àcid valproic (VPA) que és un inhibidor de les deacetilasas de les histones¹⁵ permet aconseguir reprogramar fibroblasts sense utilitzar c-Myc o només fent servir Oct4 i Sox2.

De manera que els estudis realitzats actualment emprant molècules petites permetran en un futur desenvolupar protocols per obtenir iPSC més eficientment. A més, s'eliminaran els factors de risc aconseguint una aplicació clínica més segura .

3.3.3. Tipus cel·lulars utilitzats per l'obtenció d'iPSC

Actualment, els tipus cel·lulars més utilitzats per la reprogramació són els fibroblasts, aquests van ser els primers a ser reprogramats i a més són molt

¹³ Expressió ectòpica: expressió genètica en un teixit en el qual el gen no se sol expressar

¹⁴ Tripisinizació: procés per separar les cèl·lules adherents a un substrat de cultiu

¹⁵ Deacetilasas de les histones: són un tipus d'enzims implicats en l'eliminació dels grups acetil dels residus de lisina a les histones, incrementant així la càrrega positiva de les histones i, per tant, l'afinitat d'aquestes per l'ADN. Aquest increment de la unió condensa l'estructura de l'ADN, impedit la transcripció

accessibles, fàcils de mantenir i creixen ràpidament. Un altre dels llinatges més usats són les cèl·lules sanguínies. Així i tot, s'han fet servir altres cèl·lules per la generació d'iPSC com: queratòcits (que semblen presentar grans avantatges), cèl·lules de sang del cordó umbilical, hepatòcits, cèl·lules d'orina, cèl·lules amniòtiques, cèl·lules mare neurals, melanòcits, limfòcits, cèl·lules derivades del teixit adipós i cèl·lules B pancreàtiques.

3.4. Aplicacions de les iPSC

En els últims anys les iPSC han esdevingut molt importants en la investigació científica a causa de les múltiples aplicacions que tenen, ja que es poden fer servir tant en investigació com en aplicacions clíniques. Actualment, són una realitat en el desenvolupament de fàrmacs i l'estudi de malalties, tanmateix, encara es necessita investigar més per poder-les aplicar a la medicina regenerativa i sobretot en els trasplantaments.

Primerament, cal destacar que les iPSC són un gran recurs per la recerca bàsica, que està orientada al coneixement sobre el nostre organisme i els mecanismes de funcionament de les malalties. A partir de les iPSC s'han iniciat estudis sobre malalties o parts del cos, que abans eren difícil investigar per culpa de la falta de recursos. Aquestes cèl·lules es poden utilitzar com a model de malalties humanes per entendre com apareixen i evolucionen, de manera que aquests coneixements es puguin aplicar posteriorment per crear un tractament o fàrmac. Pel que fa als fàrmacs, en l'actualitat ja s'usen les iPSC com a model in vitro per desenvolupar i testar medicaments específics.

Una altra de les grans aplicacions de les iPSC és la medicina regenerativa, tot i que és un àmbit en desenvolupament que promet molts avenços fa falta bastanta investigació per poder-hi aplicar aquestes cèl·lules. Per això la majoria de recerca és molt experimental o se'n pretén fer ús en un futur més llunyà. Les iPSC podran, per exemple, ajudar als investigadors a aprendre a programar cèl·lules per la reparació de teixits a través d'investigar les estratègies que fan servir aquestes cèl·lules per a desenvolupar-se. Alguns estudis actuals en aquest àmbit són: la utilització de CM neuronals derivades d'iPSC en un model de lesió medul·lar (Dra. Victoria Moreno al CIPF de Valencia) o la regeneració de fibrosi de teixits pulmonars danyats a través de CM pulmonar derivat d'iPSC (Dra. Ana Belen Álvarez Palomo del Banc de Sang i

Teixits de Barcelona). A més, les iPSC també poden ser de gran utilitat en els trasplantaments, ja que els teixits derivats d'aquestes cèl·lules s'originaran a partir de les mateixes cèl·lules del pacient, fet que permetrà eliminar el rebuig immunològic.

Actualment, un dels majors problemes de les iPSC és la possibilitat que esdevingui en cèl·lules canceroses, ja que els factors emprats en la seva reprogramació tenen tendència a formar tumors. Això dificulta la seva aplicació en humans, i per tant la recerca segueix oberta per augmentar el coneixement d'aquestes cèl·lules i poder-ne eliminar les dificultats.

3.5. Les iPSC com a model d'estudi per el síndrome de Brugada

En un cas ideal, l'estudi electrofísic i molecular d'una malaltia, sobretot si és genètica i s'origina a partir d'una mutació, s'hauria de fer en les mateixes condicions en les quals sorgeix la malaltia, és a dir, les condicions del pacient afectat. No obstant, per l'estudi de malalties cardiovasculars com la síndrome de Brugada, l'obtenció de biòpsies cardíques suposa un risc massa elevat pels pacients. Així, l'estudi d'aquestes malalties acostuma a utilitzar tècniques in vitro amb models d'expressió heteròloga. Un exemple són les cèl·lules embrionàries de ronyons o cèl·lules d'animals, en els que es determina la mutació específica. A pesar d'això, aquests models presenten inconvenients com la falta de components importants en els canals iònics cardíacs, els quals poden ser necessaris per recrear de manera exacta la mutació. És per això, que amb el descobriment de les cèl·lules pluripotents induïdes s'ha obert una nova via d'investigació de les malalties cardiovasculars. Amb les iPSC es poden desenvolupar estudis en cèl·lules humanes que presenten la mutació investigable sense posar en risc el pacient. Per tant, aquestes cèl·lules representen un gran canvi en l'estudi dels mecanismes de les malalties, la recerca de noves teràpies o la medicina regenerativa, entre d'altres.

3.6. Avantatges i inconvenients de l'ús d'iPSC

L'ús d'iPSC presenta grans avantatges respecte a la utilització de cèl·lules mares, però com qualsevol avanç científic també cal tenir en compte els seus inconvenients.

En relació amb els avantatges, en primer lloc, l'ús d'iPSC redueix la necessitat d'experimentar sobre animals, ja que presenta un model alternatiu sobre el qual provar l'eficàcia i els efectes secundaris de tractaments o fàrmacs. Paral·lelament, elimina el problema ètic relacionat amb la de la destrucció d'embrions per obtenir-les, perquè l'obtenció d'iPSC segueix un altre procediment que no necessita embrions. En addició, redueix el rebuig immunitari que pot produir en un trasplantament, ja que les cèl·lules provenen de la mateixa persona. Com també, proporciona una font abundant de cèl·lules mare per l'estudi de malalties, o perquè les iPSC tenen una gran capacitat de divisió i, per tant, una ràpida expansió. Cal afegir que són molt útils en el desenvolupament de fàrmacs o estudis experimentals. Com també aporten coneixement sobre el procés de reprogramació, que es pot aplicar a teràpies de medicina regenerativa. Finalment, podrien ser útils per a la teràpia cel·lular i gènica.

Pel que fa als inconvenients, tot i que molts grups d'investigació treballen sobre aquest camp, encara no hi ha suficients estudis que demostrin que la utilització d'iPSC en humans sigui beneficiosa i segura. Cal recordar que l'ús de virus per introduir els gens embrionics a les cèl·lules pot desenvolupar tumors (almenys és el que s'ha observat en els estudis amb ratolins) i que els factors de pluripotència també poden derivar en un creixement incontrolat de les cèl·lules i generar tumors. Per acabar, les tècniques que es fan servir per aconseguir i diferenciar les iPSC són molt lentes i poc eficaces, ja que aquestes cèl·lules presenten un gran índex de variabilitat aleatòria. Per tant, encara es necessita molta recerca bàsica per millorar les línies cel·lulars, fer més eficient el mètode i reduir el risc d'ús de les iPSC en humans.

4. EL COR

El sistema cardiovascular està format per l'aparell circulatori i el cor. El cor és el múscul que bombeja sang rica en oxigen i nutrients, mentre que subministra a tots els teixits del cos a través dels vasos sanguinis, a l'hora que també té la funció d'eliminar el diòxid de carboni i altres residus que generen les cèl·lules. La sang es manté en un moviment unidireccional dins el nostre cos formant un circuit tancat. De manera que les aurícules (conegudes també com a atris) reben la sang que retorna al cor, mentre que els ventricles bombegen aquesta cap a la resta del cos. El viatge d'anada, quan la sang està oxigenada i conté nutrients, el fa per les artèries, en canvi, quan la sang torna al cor, quan els teixits ja n'han extret els nutrients, ho fa a través de les venes.

Aquest viatge està controlat per uns estímuls elèctrics desencadenats pel sistema de conducció, el qual està format per diverses cèl·lules que són capaces de crear un estímulo elèctric i determinar la freqüència cardíaca. El sistema de conducció pot augmentar o disminuir el ritme cardíac segons les necessitats del nostre cos i es regula per l'acció de certes hormones o bé com a resposta a estímuls nerviosos en el plec cardíac (nervis situats a la base del cor). De manera que el cicle cardíac es divideix en dues fases, la sístole en la qual el cor es contrau per enviar la sang a la resta del cos, i la diàstole que consisteix en la relaxació del múscul cardíac per poder-se emplenar de sang.

El nostre cor està format per tres capes:

- El pericardi: una làmina que envolta l'exterior del cor
- El miocardi: el múscul cardíac que impulsa la sang
- L'endocardi: una capa que recobreix el seu interior

L'interior del cor es divideix en 4 cavitats. Les dues superiors són les aurícules, conegudes com a dreta i esquerra, mentre que les inferiors s'anomenen ventricles, dret i esquerra. També hi ha 4 vàlvules, dues de les quals són auriculoventriculars, la tricúspide i la mitral, és a dir, separen una aurícula d'un ventricle, mentre les altres són ventricle artèria, la pulmonar i aòrtica, que separen un ventricle d'una artèria. Les vàlvules tenen com a funció controlar el flux sanguini que travessa el cor.

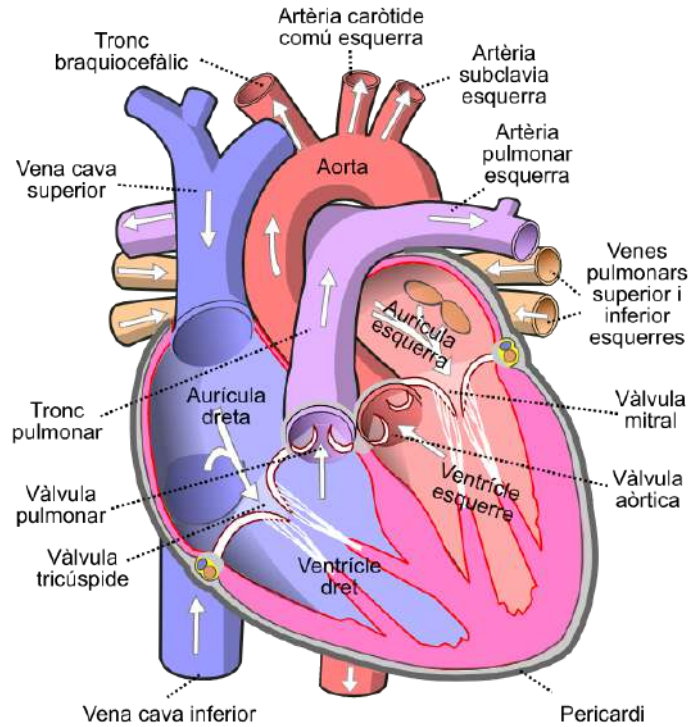


Figura 6. Estructura del cor.
 Font: Cor. (2022, September 5). Wikipedia.

4.1. Cardiomiòcits

El múscul cardíac està format per cèl·lules musculars cardíques entrelaçades, aquestes s'anomenen cardiomiòcits. El seu objectiu és bombejar la sang mitjançant la contracció i distensió dels ventricles cardíacs, les fases de sístole i diàstole del cor. El múscul cardíac, com els músculs esquelètics, té un patró estriat format per bandes fosques i clares, tanmateix, els cardiomiòcits són més estrets i curts que les cèl·lules musculars esquelètiques. Els cardiomiòcits són mononuclears, tenen un sol nucli, i ramificats. A més contenen moltes mitocòndries per obtenir l'energia necessària per realitzar la funció contràctil. Una característica única del múscul cardíac és la presència de discs intercalats entre els cardiomiòcits, que tenen com a funció permetre que es transmeti la força contràctil d'un cardiomiòcit a l'altre. Una altra característica és la presència del sarcòmer que representa la unitat contràctil bàsica i forma les miofibril·les.

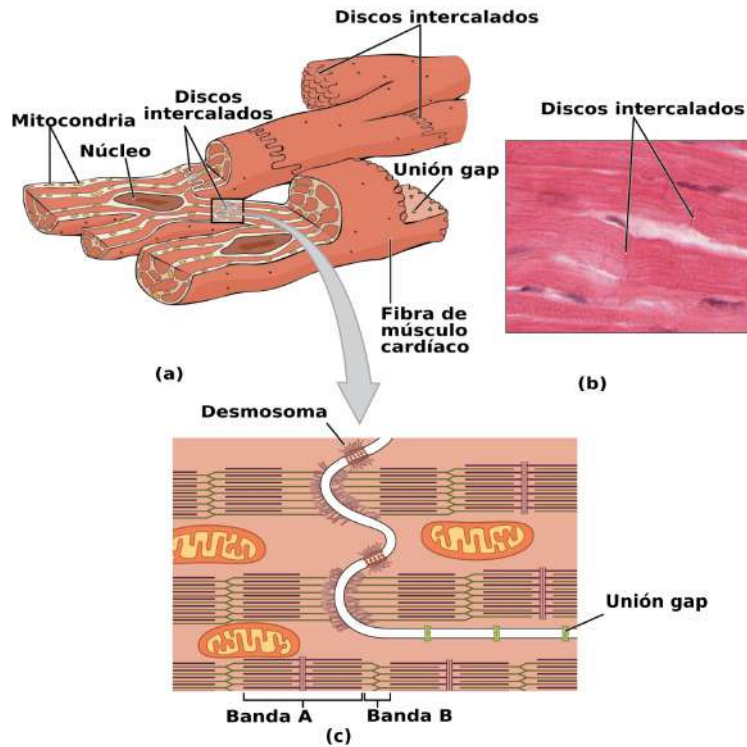


Figura 7. Cardiomiòcit.
Font: Cardiomiocito. (2022, February 28). In Wikipedia.

Existeixen tres tipus de cardiomiòcits:

- Auriculars: Se situen en les aurícules. Juntament amb els ventriculars s'encarreguen de la contracció muscular.
- Ventriculars: Es troben en les parets dels ventricles.
- Conducció i excitació: Tenen poca capacitat contràctil i s'organitzen el nòdul sinoauricular (NSA). Aquestes cèl·lules funcionen com a marcapassos cardíac, ja que estan especialitzades en la conducció del potencial d'acció i l'excitació dels altres cardiomiòcits.

Hi ha quatre tipus principals de proteïnes en els cardiomiòcits:

- Sarcomèriques: S'encarreguen de generar la contracció muscular.
- Citoesqueletiques: El seu objectiu és mantenir l'estructura dels cardiomiòcits.
- Desmosomals: S'encarreguen de mantenir units els cardiomiòcits entre ells.
- Canals iònics: Són els que generen l'activitat elèctrica.

4.2 El canal de sodi

La part experimental del projecte estarà centrada en el canal de sodi i l'evolució de la seva expressió. Per això, tot i que hi ha altres canals iònics, s'explicarà tan sols aquest.

El canal de sodi (Canal de Na⁺) voltatge-dependent és un tipus de canal iònic que s'obre i es tanca depenent del potencial elèctric o voltatge de la membrana cel·lular. Els canals de sodi són proteïnes transmembrana que permeten el pas de ions de Na⁺ a través de la membrana. El canal de Na⁺ està compost per la subunitat α , Na_v1.5, la qual està codificada pel gen *SCN5A* i per una o més subunitats β , Na_v β 1-4, codificades pels gens *SCN1B-SCN4B*.

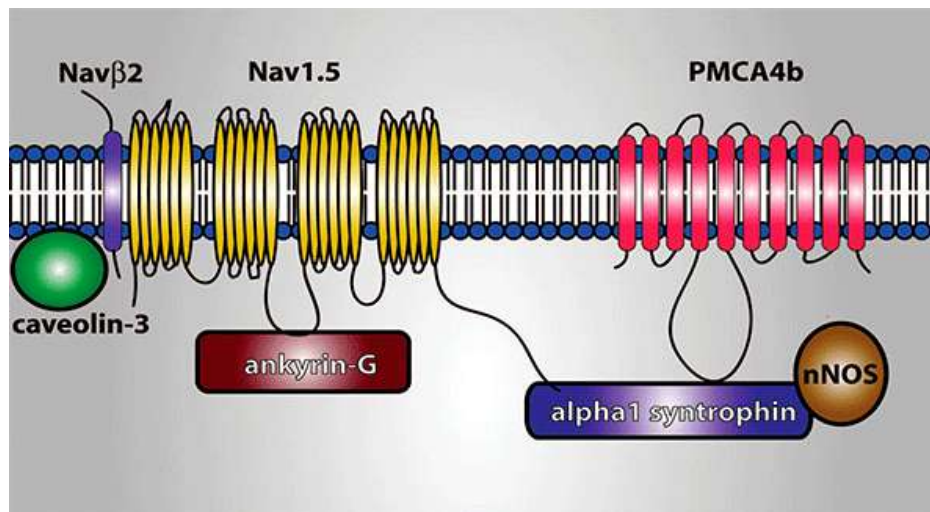


Figura 8. Canal de sodi i les proteïnes del seu canalosoma.
Font: Canales de sodio. (s.d), Itaca

La seva funció és iniciar la fase ràpida de despolarització, fase 0, del potencial d'acció, és a dir, començar el procés que resulta en la contracció del cor. A més, determinen l'excitabilitat i velocitat de conducció del potencial d'acció (PA). A part, també és receptor d'anestèsics locals, antisèptics i fàrmacs antiarrítmics del grup 1. Un potencial d'acció consisteix en una ona que conté una descàrrega elèctrica i viatja per la membrana cel·lular, de manera que modifica la distribució de la seva càrrega elèctrica. Els cardiomiòcits són cèl·lules excitable, això significa que generen potencial d'acció (PA) associat a una resposta contràctil en trobar-se amb un estímul. El PA provoca en els cardiomiòcits un canvi reversible del potencial de la membrana cel·lular, el qual ocorre quan s'activen de manera seqüencial diversos

corrents iònics generats per la difusió¹⁶ d'ions segons el grau electroquímic. És a dir, durant la despolarització, l'interior de la cèl·lula es carrega positivament, en canvi, la repolarització cel·lular implica que la cèl·lula es carregui de manera negativa (potencial de membrana de -85 a -80mV¹⁷). En estat de repòs els cardiomiòcits tenen un potencial de membrana negatiu, però quan s'exciten es produeix una despolarització i el seu potencial puja fins a superar el llindar, generant així una diferència de potencial, anomenada potencial d'acció.

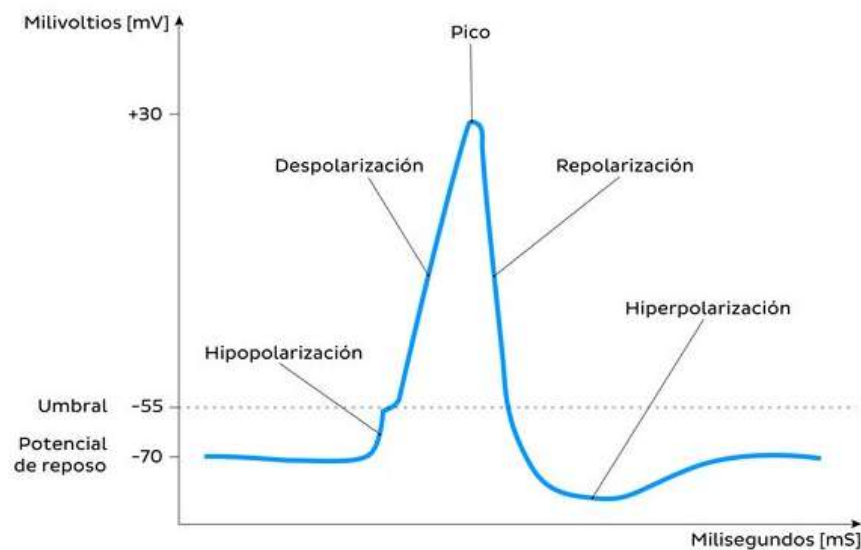


Figura 9. Fases d'un potencial d'acció cardíac ventricular.
Font: Torres, A. Potencial de acción (març de 2022). Kenhub.com

Durant el PA cardíac els canals de sodi poden adoptar tres estats, un conductor, conegut com a obert, i dos no conductors, coneguts com a tancat i inactiu. Poden transitar gràcies a un procés voltatge-temps dependent anomenat gating del canal. Els potencials d'acció es divideixen en 3 fases:

- Despolarització: el potencial d'excitació obre els canals de Na⁺ i entren els ions de Na⁺, l'interior de la cèl·lula es torna electropositiva.
- Sobreexcitació: fase de positivitats extrema, en el qual el potencial s'apropa a l'equilibri hidroquímic del sodi.

¹⁶ Flux net de ions en el qual les partícules es mouen d'una regió amb concentració alta a una regió amb concentració baixa per aconseguir una distribució uniforme

¹⁷ Voltatge de membrana en mil·livolts

- Repolarització: la permeabilitat de Na^+ disminueix quan es tanquen els seus canals i s'obren els canals de potassi provocant la sortida de ions de K^+ , de manera que disminueix l'electropositivitat de la cèl·lula.

El potencial d'acció cardíac segueix el següent procés. Durant la diàstole, moment de relaxació del múscul cardíac, el canal es troba tancat en un estat de repòs. Quan comença la despolarització, fase 0, l'interior de la membrana té una càrrega positiva, augmenta la permeabilitat de la membrana, permetent l'entrada de Na^+ durant un o dos mil·lisegons, fet que genera un ràpid corrent de sodi (INA). Aquesta permeabilitat resulta de l'activació, obertura, dels canals de Na^+ . Seguidament, el canal s'inactiva, passant d'estar obert a inactiu, i es para l'entrada de Na^+ . En el procés anomenat reactivació del canal, aquest passa d'un estat inactiu a tancat per permetre l'obertura en el proper batec. El temps en què el canal es manté inactiu pertany al període refractiu absolut del cor, un interval de temps en el que la cèl·lula no es pot excitar. També és possible que a vegades el canal passi d'un estat obert a un tancat, això s'anomena desactivació del canal.

Pel que fa la repolarització cardíaca podem distingir diverses fases. Primer, es produeix una ràpida repolarització gràcies a l'activació del corrent transitori, corrent de ràpida activació. Seguidament, es produeix un equilibri amb dos corrents d'entrada. Un corrent de sodi (Na^+), a través dels pocs canals que no s'han inactivat totalment a la fase 0, generant així un corrent lent de sodi. Un corrent de calci (Ca^{2+}), entra a l'interior de la cèl·lula provocant la contracció de la cèl·lula cardíaca i l'increment de concentració de Ca^{2+} , de manera que s'inactiva el seu canal evitant l'entrada excessiva de calci a la cèl·lula. La repolarització s'accelera per la inactivació dels corrents d'entrada de Na^+ i Ca^{2+} .

Durant aquesta fase s'activen tres corrents de sortida de potassi. El primer representa la rectificació interna, que determina el final de la repolarització i el nivell de potencial de membrana durant la diàstole. La rectificació implica un corrent de sortida de potassi (K^+) en potencials més positius o un corrent d'entrada en potencials negatius per aconseguir el potencial d'equilibri de K^+ . Després de la despolarització els canals de K^+ es tanquen. El segon corrent de K^+ es genera quan els canals activats disminueixen els nivells d'ATP¹⁸ de la cèl·lula. El tercer corrent de

¹⁸El trifosfat d'adenosina (ATP) és un nucleòtid, format per una base nitrogenada unida al carboni un d'un sucre, dedicat a l'obtenció d'energia cel·lular.

K^+ està generada pels canals acoblats a proteïnes G i activats per acetilcolina o adenosina.

Quan la fase de repolarització de la cèl·lula es completa, el potencial de membrana es manté estable fins que la cèl·lula es torna a despolaritzar. La fase existent entre dos potencials d'acció, despolarització-polarització de la cèl·lula, s'anomena fase 4 i correspon a la diàstole.

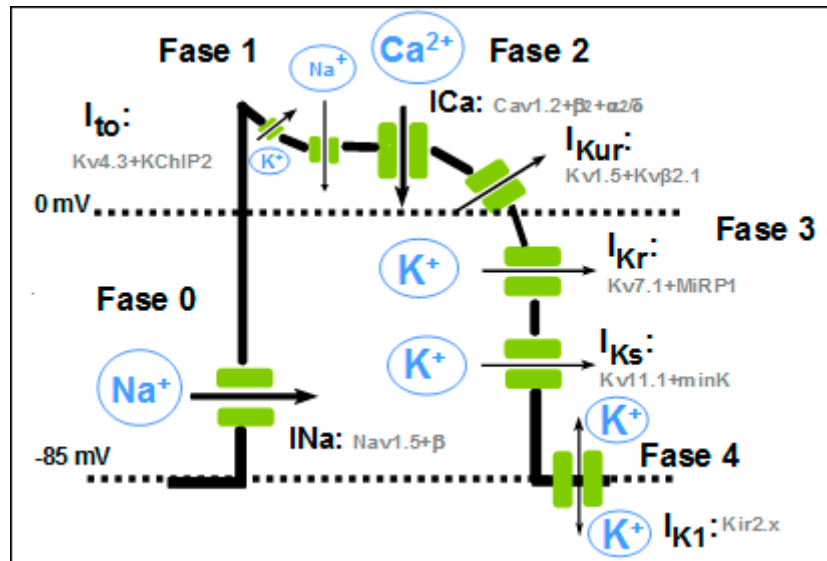


Figura 10. Representació de les fases d'un PA i els corrents iònics que intervenen, amb les subunitats que formen cada canal.

Font: Potencial de acció cardíaco (s.d.), Itaca.es

4.3. Síndrome de Brugada

La síndrome de Brugada (BrS) és una canalopatia cardíaca hereditària rara, és a dir, un trastorn de l'excitabilitat de la membrana muscular associada al canal de sodi que es transmet d'una generació a l'altra que té molt poca presència en la població. Aquesta malaltia està caracteritzada per intervals de conducció prolongats i l'elevació del segment ST¹⁹ de l'electrocardiograma. La síndrome de Brugada pot provocar un batec irregular, els ventricles bateguen més de pressa i de manera irregular, fet que evita que la sang circuli correctament. Per això la BrS predisposa un alt risc de mort cardíaca sobtada (MSC), taquicàrdia ventricular polimòrfica secundària o fibril·lació ventricular en un cor que estructuralment és normal.

¹⁹ Període isoelèctric en el qual els ventricles es troben entre un estat de despolarització i repolarització, aquest segment connecta el complex QRS de l'ona T en un electrocardiograma.

Aquesta malaltia es va detectar per primer cop el 1992 com un "bloqueig de la branca dreta del segment ST amb una persistent síndrome d'elevació i causa la mort sobtada". Tot i que la malaltia té una prevalença baixa (1-5 per 10.000 a Europa i els Estats Units) es considera responsable d'un 4-21% dels casos de MSC.

Els símptomes de BrS són molt diferents d'un pacient a l'altre, des d'uns que pateixen MSC fins a persones asimptomàtiques. Els indicis de la malaltia solen aparèixer durant l'edat adulta. Normalment, s'associa amb síncope, palpitations, marejos, arrítmies ventriculars malignes i MSC, la qual se sol produir durant el son o en repòs. Tan sols alguns dels individus amb BrS pateixen un esdeveniment arritmogènic a l'any. El primer signe de la malaltia sol ser la MSC avortada, tot i que hi ha bastants pacients que es diagnostiquen després de la síncope o que són asimptomàtics fins que se'ls diagnostica durant un cribratge genètic familiar. El 20-50% dels pacients d'aquesta malaltia tenen antecedents familiars que han patit MSC. Cal afegir que la BrS és de 8 a 10 vegades més freqüent en homes, per diferències d'ions d'expressió del canal i nivells hormonals.

Els criteris de diagnòstic de BrS es basen en anomalies en l'electrocardiograma, sense necessitat de cap evidència d'arrítmies perjudicials. No obstant la majoria dels individus amb BrS tenen un cor amb una estructura normal, s'han descrit certes alteracions menors en l'estructura del ventricle. Les tres anomalies en l'ECG que s'utilitzen per diagnosticar la BrS són:

- Tipus 1: Elevació del segment ST ≥ 2 mil·límetres a la dreta derivacions precordials (V1-V3) seguida d'una ona T²⁰ recta o còncava
- Tipus 2: Elevació menor (≥ 1 mm) del segment ST seguida per una ona convexa
- Tipus 3: Petita elevació del segment ST (≤ 1 mm)

Tant el tipus 2 com el 3 són tan sols suggeridors de la malaltia i es realitza un altre test per trobar l'ECG del tipus 1. També es recomana als familiars propers del pacient que se sotmetin a un cribratge clínic, per poder detectar la malaltia de manera prematura, ja que al ser hereditària normalment més d'un membre de la família pot patir-la.

²⁰ L'ona T representa la repolarització dels ventricles en una electrocardiografia.

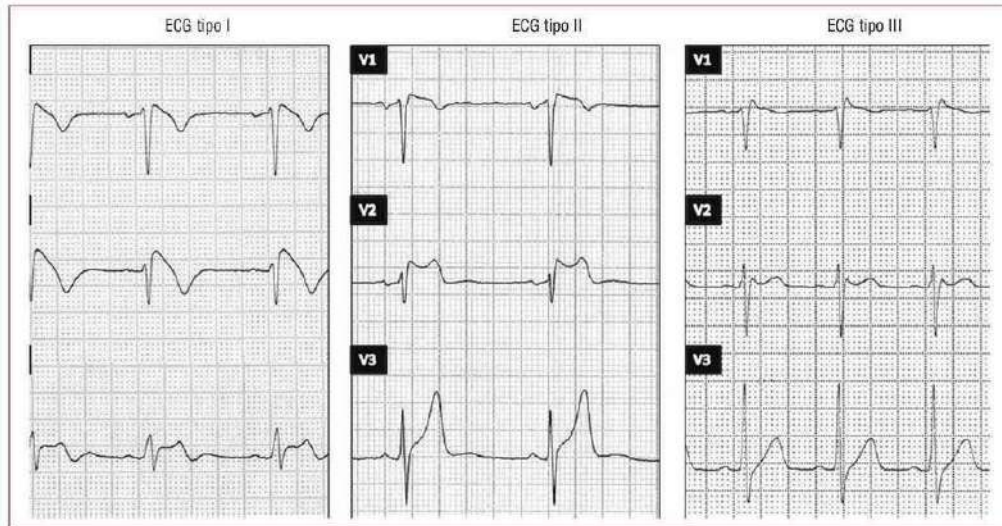


Figura 11. Tipus d'ECG per detectar la síndrome de Brugada.

Font: Benito, B., Brugada, J., Brugada, R., & Brugada, P. (2009). Síndrome de Brugada. *Revista española de cardiología*

Pel que fa a les teràpies, de moment la implantació d'un desfibril·lador per a pacients d'alt risc és l'única que s'ha demostrat com a eficient, tanmateix, té un gran cost i pot comportar complicacions. Per tant, encara es necessiten teràpies farmacològiques que redueixin l'arrítmia i previnguin la MSC mitjançant el reequilibri del corrent iònic.

La síndrome de Brugada sol ser causada per una pèrdua de funció dels canals de sodi. La reducció del corrent de Na^+ provoca la disminució de la despolarització en la fase 0 de l'AP, alentint la conducció elèctrica auricular i ventricular. Actualment, hi ha dues hipòtesis proposades que expliquen l'elevació del segment ST, característica típica de la síndrome de Brugada. Ambdós descriuen un desequilibri a l'AP, en la repolarització o despolarització, depenent de quina hipotes, que causaria l'elevació d'aquest segment.

La malaltia presenta una herència autosòmica dominant. Aproximadament el 35% dels casos de la BrS són causats per "missense mutations", que consisteixen en errors en el codi de l'ADN en els que una de les bases nitrogenades es canvia per una altra. Una altra causa són les "nonsense mutations", en les quals hi ha una alteració en una base de l'ADN que comporta una terminació prematura de la síntesi de la proteïna, per tant, no està assegurat que funcioni correctament. També per petites insercions o dilatacions de nucleòtids. Entre un 20 i 25% dels pacients de la síndrome de Brugada tenen una mutació en el gen *SCN5A*.

Actualment, hi ha més de 400 variants genètiques identificades en aquest gen, senyal de l'heterogeneïtat genètica d'aquesta síndrome. Les mutacions poden estar localitzades a qualsevol lloc del gen *SCN5A*, és a dir, no hi ha cap punt concret on s'originin. La majoria de mutacions en el gen *SCN5A* detectades en pacients comporten la pèrdua de la funció del canal de sodi, un pic reduït del corrent de Na^+ o l'alteració de les propietats del canal. La pèrdua de funció del canal es pot produir pels següents mecanismes:

- Disminució de l'expressió de la proteïna $\text{Na}_v1.5$ generada pel gen *SCN5A*. Això pot ser conseqüència de la degradació prematura de la proteïna o la impossibilitat d'aquesta d'interactuar amb subunitats β i proteïnes reguladores essencials pel tràfic a la membrana cel·lular.
- L'existència de canals no funcionals, que haurien d'arribar a la membrana i conduir petites quantitats de ions de sodi i gens.
- Canals amb les propietats de gating alterades, cosa que comporta una activació o inactivació no exitosa tot i que el canal arribi a la membrana. Això causa que el corrent de sodi es redueixi.

Paral·lelament al *SCN5A* hi ha més de 20 gens diferents que també poden relacionar-se amb la BrS, encara que les mutacions d'aquests no apareixen tan sovint. Alguns d'aquests són: altres canals iònics, subunitats β o moduladors de $\text{Na}_v1.5$. Així i tot, tan sols el gen *SCN5A* està reportat com un gen de diagnòstic definitiu.

PART EXPERIMENTAL

1. INTRODUCCIÓ

La part pràctica d'aquest treball consisteix en l'estudi preliminar del curs temporal de l'expressió del canal de sodi cardíac durant la diferenciació de les iPSC en cardiomiòcits. La hipòtesi a estudiar és si l'expressió del canal de sodi està afectada per les variants genètiques relacionades amb la síndrome de Brugada. Aquest estudi es considera preliminar, ja que en tenir un temps reduït per realitzar tots els experiments pertinents no s'han fet rèpliques, per tant, totes les conclusions i resultats seran preliminars i s'hauria de tornar a repetir el procés, fent més rèpliques, perquè aquest sigui conclouent. L'estudi consisteix en dues proves: la determinació de l'expressió de proteïnes per Western Blot i la determinació de l'expressió d'ARN per la reacció de la polimerasa en cadena quantitativa (qPCR). Tota l'experimentació s'ha realitzat en els laboratoris del grup de GenCardio de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI) amb el seguiment tutorial de la Dra. Fabiana Scornik.

En aquesta pràctica es pot observar l'ús que es fa de les cèl·lules iPS en el món de la investigació. Gràcies al model cel·lular de les iPSC es pot estudiar el funcionament de malalties cardiovasculars, que solien ser una àrea on hi havia poca recerca a causa de la seva dificultat. A través d'elles es pot observar com actuen les cèl·lules dels pacients de la síndrome de Brugada, en aquest precís estudi, i quins són els mecanismes que no funcionen correctament. Això és essencial per conèixer com actua la malaltia i, en un futur, poder tractar-la. Conèixer els mecanismes interns de les malalties cardiovasculars, solia ser una tasca molt difícil, ja que no es pot experimentar amb cardiomiòcits humans, per tant, les iPSC, en aquest cas diferenciades en cardiomiòcits, ofereixen l'alternativa ideal per poder avançar en aquest àmbit de la medicina.

Els objectius d'aquest estudi són els següents:

- Analitzar el curs temporal de l'expressió del canal de sodi durant la diferenciació de cardiomiòcits a partir de cèl·lules mare pluripotents induïdes.

- Comparar el curs temporal de l'expressió del canal de sodi cardíac durant el procés de diferenciació de cardiomiòcits a partir d'iPSC amb l'expressió de la subunitat $\beta 1$ del canal de sodi i amb el marcador de cardiomiòcits troponina T.
- Comparar el curs temporal de l'expressió del canal de sodi entre els pacients estudiats, alguns afectats de la síndrome de Brugada, d'altres portadors de SNV (sense afectació de la malaltia) i els pacients sans.

Per fer això es van realitzar dos experiments sobre les línies cel·lulars que s'expliquen a l'apartat següent. La primera consistia en la quantificació i determinació de proteïnes en els diferents dies de la diferenciació de cadascuna de les línies a través d'un Western Blot. En aquest experiment es van analitzar els següents marcadors, en aquest cas proteïnes: $Na_v1.5$ (canal de sodi), Troponina T, Beta 1. El següent experiment va consistir en la quantificació i determinació d'ARN en els diferents moments temporals de la diferenciació de cada de línia mitjançant la tècnica de qPCR. En aquest cas es van analitzar els següents gens: *SCN5A* (canal de sodi), *TNNT2* (Troponina-T), *SCN1B* (Beta 1), *PPIA* (gen housekeeping, de control). El material utilitzat per realitzar aquests experiments es troba en l'annex 1.

1.1. Mostres

Les mostres sobre les quals es va realitzar l'experimentació pertanyien a tres pacients diferents. Les mostres eren de cardiomiòcits derivats d'iPSC, obtinguts a partir d'iPSC específiques dels pacients, les quals havien sigut reprogramades a partir de fibroblasts obtingut del cultiu de biòpsies de pell de cada pacient. Tot el procés de la biòpsia i reprogramació, el van fer un laboratori extern associat al grup de recerca de GenCardio. Pel que fa al procés de diferenciació i recollida dels cardiomiòcits, la van fer altres investigadors en aquest laboratori. Tot i que, no es va realitzar aquest procediment durant l'experimentació, es va poder observar com es duia a terme i se'm van explicar els passos. Per tant, es detallarà el procés en l'apartat d'antecedents.

En un principi la recollida de les mostres en procés de diferenciació i, per tant, els punts temporals analitzats en l'experimentació, eren els dies 4, 8, 12 i 16 de la diferenciació. Però a causa d'alguns inconvenients algunes de les mostres estan recollides el dia 14 en comptes del 16 o el dia 5 en lloc del 4.

En relació amb els pacients, s'ha treballat sobre una família de quatre membres, però per simplificar el procés només es va experimentar amb tres línies. Dos dels pacients estudiats, el pacient Rb20235 (o pacient 35) i el pacient Rb20236, tenien el SNV, variació de la seqüència d'ADN produïda en alterar-se un nucleòtid en la seqüència del genoma. El pacient Rb20237, per altra banda, no presentava aquesta variació, per tant, funciona com a control. El pacient 37, en conseqüència, no patia la síndrome de Brugada. Tanmateix, el pacient 36 n'era portador i tenia el SNV, però no patia la síndrome, possiblement perquè a més de ser portador del SNV patia un polimorfisme²¹, fet que potser va evitar que tingués la síndrome. Per altra banda, el pacient 35, que tenia també el SNV, sí que mostrava característiques fenotípiques de la síndrome de Brugada, encara que de moment no tenia conseqüències clíniques.

Prèviament, en un estudi diferent, es va seqüenciar la regió de codificació *SCN5A* dels individus per confirmar la presència del SNV investigat en els portadors i la seva absència en el no portador. El SNV investigat és el *SCN5A_c.4573G>A*, aquest gen comporta un canvi d'aminoàcids d'una valina a una metionina, això canvia la hidropatia d'hidròfoba forta a moderada, i manté neutre la polaritat. Pel que fa a les proteïnes, el SNV es localitza en un bucle citoplasmàtic de $Na_v1.5$, regió la qual conté la "porta" d'inactivació del canal. Segons diferents informes es podria considerar que aquest SNV seria possiblement un patògen i podria arribar a modificar les propietats del canal de sodi.

²¹ El polimorfisme genètic és la variació genètica que no té efectes adversos en l'individu. Es produeix de manera minoritària i implica dues o més variants en una seqüència d'ADN particular.

2. ANTECEDENTS

Abans de començar les anàlisis i l'experimentació d'aquest treball, es van preparar les cèl·lules amb les quals es va treballar. Aquest procés consisteix en la diferenciació de les iPSC en cardiomiòcits i l'extracció d'aquestes en diferents punts temporals de la seva diferenciació. Tot i que aquest procés el van realitzar altres investigadors del grup, més endavant s'explicarà en què consisteix més detalladament seguint les explicacions que se'm va oferir i els protocols de GenCardio.

La diferenciació d'iPSC fins a cardiomiòcits es realitza en un període trenta dies, a partir de llavors les cèl·lules ja han assolit un nivell suficient de maduresa per poder-les fer servir com a model cel·lular i avaluar els canals iònics. Dos dies abans de començar la diferenciació, les iPSC se sembren en un medi de cultiu (mTeSR1) amb un inhibidor, que ajuda a augmentar la supervivència de les colònies i evitar l'apoptosi de les cèl·lules. L'endemà es torna a canviar el medi a mTeSR1 en absència de l'inhibidor per permetre el creixement cel·lular abans de començar la diferenciació.

El dia que comença el procés de diferenciació es considera el dia 0. A partir d'aquest moment els medis que es fan servir contenen suplementes específics que es renoven cada 24 hores per induir les iPSC a la diferenciació. El dia 0 el medi es canvia a un medi de CHIR99021, que s'encarrega d'augmentar l'eficiència de la diferenciació. El dia 1 es canvia a un medi amb heparina, suplement que promou la producció robusta i constant dels cardiomiòcits. Del dia 2 al 5 els medis es canvien a medi amb heparina i IWP2 cada 24 hores, ambdós suplementes ajuden a inhibir la ruta WNT, que dificulta la diferenciació i promou l'apoptosi. El dia 6 es canvia el medi a un amb heparina. El dia 7 es torna a canviar, aquest cop a un medi amb heparina i insulina. El dia 8 es canvia el medi a un amb només insulina. Durant els dies 7 i 10 les cèl·lules haurien de començar a bategar, si el dia 14 encara no han bategat, es considera que les cèl·lules no s'han diferenciat i s'han d'eliminar.

Els dies 10, 12 i 14 es canvia el medi a un que no contingui glucosa cada dos dies. Aquest medi s'utilitza per fer una selecció entre les cèl·lules que s'ha diferenciat en cardiomiòcits i les que no, ja que els cardiomiòcits són capaços de sobreviure en un

medi sense glucosa, en canvi, altres tipus cel·lulars no. Aquest procés s'anomena etapa d'inanició.

A partir del dia 16 fins al 30 comença el procés de maduració. Cap de les mostres fetes servir en aquest experiment va passar per aquesta fase, ja que es van recollir abans d'arribar-hi. En la figura 12 es poden veure les etapes del procés de diferenciació i els canvis de medi que es realitzen, en color rosa es mostren els dies on s'extreuen les mostres per aquest experiment.

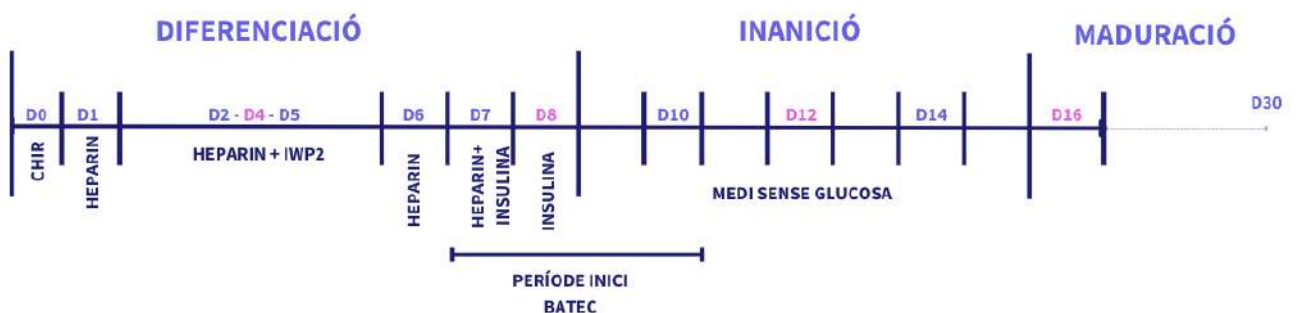


Figura 12. Procés de diferenciació ipSC a cardiomiòcits amb els canvis de cultiu corresponents.
 Font: Elaboració pròpia

Les mostres utilitzades en aquest estudi es van recollir els dies 4, 8, 12 i 16, tanmateix, a causa d'algunes complicacions en algunes línies es van haver de recollir el dia 5, en comptes del 4, i el dia 14, en comptes del 16. Per recollir les cèl·lules es va seguir el següent procediment:

1. Preparar i rotular els microtubs d'1,5 per l'anàlisi de proteïnes i 1,2 per l'anàlisi genètica.
2. Netejar les mostres vigilants de no aixecar-les per poder fer una foto i veure si bateguen.
3. Treure el medi anterior.
4. Agregar 500µL de PBS fred a cada pou, en aquest moment el batec és molt lent, ja que les cèl·lules es comencen a congelar. El PBS no conté ions divalents, els quals ajuden a les cèl·lules a adherir-se a la placa, per això facilita que les cèl·lules s'aixequin.

5. Aixecar les cèl·lules amb un *scraper*.
6. Amb una micropipeta de 1000µl recollir 3 pous preparats per fer l'anàlisi d'ARN i 3 pel de proteïnes i posar-los en els microtubs preparats. Es repeteix el procediment amb totes les mostres.
7. Posar els microtubs a la microcentrifugadora durant 5 minuts, això fa que les mostres cel·lulars es quedin al fons del tub mentre que l'excés de líquid puja, facilitant així la seva extracció.
8. Extreure el líquid sobrant amb una micropipeta, sense tocar les cèl·lules
9. Posar les mostres a congelar a -80 °C

Un cop les mostres es troben congelades a -80°C en tubs pellets estan preparades perquè es realitzin les anàlisis de proteïnes i genètic.

3. ANÀLISIS DE PROTEÏNES

La primera part del procés experimental consisteix en l'anàlisi de proteïnes per observar l'evolució de l'expressió del canal de sodi a través de la seva proteïna ($\text{Na}_v 1.5$), i comparar-la amb la proteïna de la subunitat $\beta 1$ del canal i la del marcador de cardiomiòcits troponina T.

3.1. Extracció de proteïnes

L'extracció de proteïnes de les cèl·lules de cardiomiòcits s'ha realitzat segons el procés descrit

1. Preparar una solució de lisis buffer (Annex 2). S'agafen 500 μL (5 mL) d'una solució ja preparada al 2% SDS, 10% glicerol i 50mM Tris-HCl a pH 6.8. Se suplementa amb un inhibidor de proteases (11836170001, cOmplete Mini EDTA-Free, Roche) i foteases (04906837001, PhosSTOP, Roche), la proporció és una pastilla per 10 mL, per tant, s'agafa mitja pastilla. Posar la solució de lisis a l'agitador, perquè es barregi bé, evitant crear espuma.
2. Descongelar les mostres en una galleda amb gel, per evitar un sobreescalfament.
3. Afegir el buffer, preparant anteriorment, a les mostres amb unes micropipetes. Pels pellets petits, els que tenen menys quantitat de cèl·lules i proteïnes, afegim 200 μL , als mitjans 250 μL i als grans 300 μL .
4. Passar les mostres pel sonicador, en posició 1, perquè s'homogeneïtzin. Abans d'introduir cada mostra netejar amb aigua desionitzada i un paper (Kimitech Delicate Task Wipers) la vareta per evitar la contaminació de les mostres. Per evitar degradar les mostres, se sonica lentament durant 5 segons, es deixa uns 3 segons de marge, i es torna a sonicar. Repetir el procediment durant 20 segons màxim per evitar un sobreescalfament de la mostra, i en conseqüència la seva degradació. Si és necessari, després de deixar la mostra en gel durant una estona, es torna a sonicar per acabar d'homogeneïtzar .

5. Un cop la solució és homogènia, quan ja no queden trossos per dissoldre de cèl·lules que podrien modificar els resultats, retornar les mostres a la cambra frigorífica a -80°C

3.2. Quantificació de proteïnes

Un cop realitzada l'extracció de proteïnes podem fer-ne la quantificació. Això ens permetrà saber la concentració de proteïna que tenim de cada mostra, i podrem saber si en tenim prou per fer el Western Blot i per fer els càlculs necessaris per realitzar aquesta tècnica.

De les mostres dels pacients es van fer 3 rondes per cadascun d'ells amb els quatre punts de diferenciació. Tanmateix, no totes aquestes rondes es van arribar a diferenciar, ja que en algunes les mostres no batien entre els dies 7 i 10 i, per tant, es van descartar. Les rondes en les quals es van diferenciar les mostres fins a arribar a tots els punts temporals són les que es van fer servir per l'anàlisi. Es poden trobar en el següent quadre:

Pacients		
Rb20235	Rb20236	Rb20237
35 Ronda 3 dia 4	35 Ronda 1 dia 4	35 Ronda 3 dia 5
35 Ronda 3 dia 8	35 Ronda 1 dia 8	35 Ronda 3 dia 8
35 Ronda 3 dia 12	35 Ronda 1 dia 12	35 Ronda 3 dia 12
35 Ronda 3 dia 14	35 Ronda 1 dia 16	35 Ronda 3 dia 14

Taula 1. Mostres dels pacients que van completar la diferenciació i es van utilitzar en l'experiment
Font: Elaboració pròpia

Per realitzar la quantificació de proteïnes s'han seguit els següents passos:

1. Organitzar la placa de 96 pous on posarem les diferents mostres mitjançant un petit esquema (Taula 2). Les files A i B es destinen a la recta patró mentre que a les altres es destinen a les mostres. De cada mostra es fa un triplicat, i a les mostres dels cardiomiòcits es farà una anàlisi amb concentració estàndard i una repetició amb mitja dissolució

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 BSA			1 BSA			2 BSA			3 BSA		

B	5 BSA	7 BSA	9 BSA	10 BSA
C	35D4	35 D8	35 D12	35 D14
D	35D4 ½ dis.	35D8 ½ dis.	35 D12 ½ dis.	35 D14 ½ dis.
E	36D4	36 D8	36 D12	36 D16
F	36D4 ½ dis.	36D8 ½ dis.	36D12 ½ dis.	36 D16 ½ dis.
G	37 D5	37 D8	37 D12	37 D14
H	37 D5 ½ dis.	37 D8 ½ dis.	37 D12 ½ dis.	37 D14 ½ dis.

Taula 2. Esquema placa quantificació proteïnes
Font: Elaboració pròpia

2. Carregar les 2 files (A i B) que serviran per fer la recta patró amb el volum indicat de "Bovine Serum Albumin" (BSA) i H₂O seguint les quantitats indicades (Taula 3), de manera que el volum total de cada pou és 25µL. S'addicionarà un BSA de 2µg/µL amb dilució 1:5, la seva composició és 44µL de BSA+176µL H₂O mQ²², de manera que obtenim 220 µL de BSA 0,4g/L

BSA (µg)	BSA (µL)	H ₂ O mQ (µL)
0	0	25
1	2,5	22,5
2	5	20
3	7,5	17,5
5	12,5	12,5
7	17,5	7,5
9	22,5	2,5
10	25	0

Taula 3. Volums substàncies pels pous de la recta patró
Font: Elaboració pròpia

3. Carregar els triplicats de les mostres i H₂O amb un volum total de 25µL per pou, en una dilució de 4/25, és a dir, 4µL mostra +21 µL de H₂O. Per això es prepara una solució mare on posem 6µL de mostra i 144µL de H₂O i afegim 25µL d'aquesta dissolució a cada pou. Fem volum sobrant, en aquest cas 1µL més de la mostra necessària, per tenir-ne excés en cas d'equivocació.

²² Aigua milli-Q: aigua amb una gran puresa iònica

4. Afegir 200µL de reactiu bicinchoninic acid (BCA) 1:50 a tots els pous de la placa. El BCA ens serveix de referència, ja que a partir de la seva absorbància en diferents ones es crearà una recta patró (amb el nivell d'absorbància en el volum marcat). Aquesta recta permetrà saber la quantitat de proteïna que hi ha en les mostres analitzades, tenint en compte les dilucions fetes i extrapolant la longitud d'ona corresponent al volum de BCA
5. Passar la placa pel shaker i deixar 30 minuts a l'estufa a 37°C. Això fa que els components que s'han posat a la placa reaccionin de manera que es pugui llegir el seu senyal lumínic, que depèn de la concentració de proteïnes en la mostra. La següent imatge (Figura 12) mostra la placa un cop incubada, es pot observar com a simple vista el canvi de color, fet que ens permet intuir si la concentració és més a aviat alta o baixa.

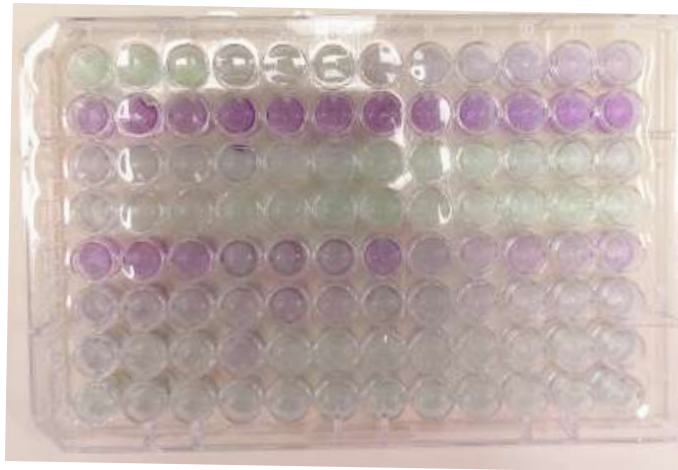


Figura 13. Placa de 96 wells preparada per la quantificació de proteïnes.
Font: Elaboració pròpia

6. Passar la placa pel programa Biotek gen5, en concret es posen les següents instruccions: Read now → new → read → Abs, endpoint→ $\lambda=562$ i 96 wells. El que fa la placa és “enviar” uns rajos de llum que travessen els pous de la placa, i segons la llum que deixa traspasar el pou podem saber la concentració de la mostra.



Figura 14. Aparell Biotek Gen5 utilitzat per calcular la concentració de les mostres.
 Font: Agilent BioTek synergy HTX Multi-mode reader. (s/d). New Route.

7. Exportar l'Excel que genera el programa. Fer les mitjanes dels triplicats i inserir el gràfic de dispersió amb línia de tendència lineal, equació i R^2 .

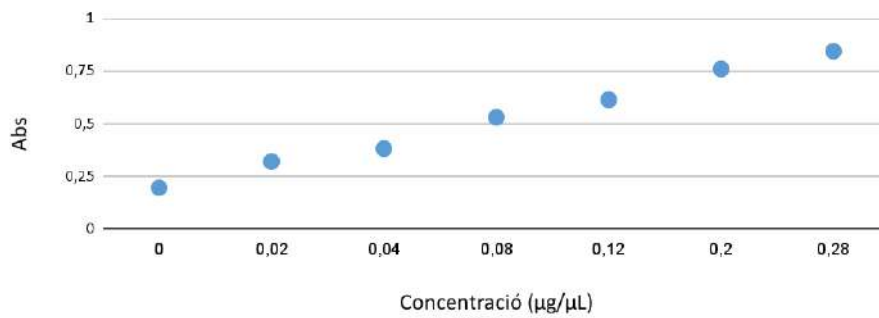
CONCENTRACIONS PROTEÏNA: RESULTATS DE LA PLACA 2													mitjanes dels triplicats per fer la línia de tendència	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	0,183	0,161	0,251	0,359	0,252	0,359	0,42	0,379	0,355	0,507	0,563	0,531	A1-3	0,1983
B	0,6	0,607	0,643	0,743	0,767	0,781	0,854	0,845	0,844	0,899	0,95	0,859	A4-6	0,3233
C	0,597	0,704	0,591	1,055	0,966	0,868	1,044	1,096	0,945	0,952	0,953	0,93	A7-9	0,3847
D	0,447	0,417	0,448	0,47	0,47	0,47	0,852	0,731	1,032	0,7	0,815	0,841	A10-12	0,5337
E	2,368	0,725	0,603	2,512	1,009	0,959	0,994	0,902	0,966	0,741	0,901	0,914	B1-3	0,6167
F	0,081	0,09	0,084	0,084	0,085	0,087	0,083	0,085	0,092	0,086	0,112	0,083	B4-6	0,7637
G	0,082	0,084	0,087	0,085	0,089	0,084	0,08	0,083	0,087	0,083	0,085	0,085	B7-9	0,8477
H	0,081	0,082	0,086	0,084	0,08	0,085	0,084	0,086	0,079	0,084	0,084	0,086	B10-12	0,9027

Taula 4. Concentracions de proteïna amb mitjanes dels triplicats per fer la recta patró.
 Font: Elaboració pròpia

Recta patró		Standard curve		
0	0,198	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	μg	Abs
0,5	0,323	0	0	0,198
1	0,385	0,02	0,5	0,323
2	0,534	0,04	1	0,385
3	0,617	0,08	2	0,534
5	0,764	0,12	3	0,617
7	0,848	0,2	5	0,764
	0,90266	0,28	7	0,848

Taula 5. Taula amb els valors i càlculs necessaris per fer la recta patró.
 Font: Elaboració pròpia

Línia de tendència lineal de la concentració standard



Gràfic 1. Recta de tendència lineal per quantificar les concentracions de proteïna de les mostres.
Font: Elaboració pròpia.

8. Quantificar les concentracions de proteïna a partir de l'equació de la recta, i corregir-la pel volum de la mostra carregat i per la dilució prèvia abans de carregar la mostra. Com s'ha pogut veure en la taula 4 alguns dels pous tenien una concentració molt més elevada que la resta del triplicat, això podria ser conseqüència d'un error de pipetatge o de procediment. Aquests valors no es tenen en compte per realitzar la mitjana. Els resultats de la quantificació es poden veure en la Taula 6, en la columna de dilució corregida.

Sample	Triplicates			Dilution	Average Absorvance	µg/µl	Dilution corrected
35D4 R3	0,597	0,704	0,591	1:25	0,631	0,153	0,96
35D8 R3	1,055	0,966	0,868	1:25	1,011	0,323	2,02
35D12 R3	1,044	1,096	0,945	1:25	1,070	0,350	2,19
35D16 R3	0,952	0,953	0,93	1:25	0,953	0,297	1,86
36D4 R1	0,447	0,417	0,448	1:25	0,432	0,065	0,40
36D8R1	0,47	0,47	0,47	1:25	0,470	0,082	0,51
36D12R1	0,852	0,731	1,032	1:25	0,792	0,225	1,41
36D16R1	0,7	0,815	0,841	1:25	0,758	0,210	1,31
37D4 R3		0,725	0,603	1:25	0,725	0,196	1,22
37D8 R3		1,009	0,959	1:25	1,009	0,323	2,02
37D12 R3	0,994	0,902	0,966	1:25	0,948	0,295	1,85
37D16 R3	0,741	0,901	0,914	1:25	0,821	0,238	1,49
		m =	2,2370				
		n =	0,2875				

Taula 6. Concentració de cada mostra obtinguda a través de la quantificació de les proteïnes.
Font: Elaboració pròpia

3.3. Western Blot

Un cop realitzada la quantificació de proteïnes s'ha fet una anàlisi de les proteïnes utilitzant la tècnica del Western Blot. Es van realitzar dues rondes, però a la segona en veure que l'anticòs de la proteïna de la subunitat $\beta 1$ no funcionava correctament no es va analitzar aquesta proteïna.

3.3.1. Tècnica

El Western Blot és una tècnica de laboratori utilitzada en l'estudi de proteïnes que serveix per detectar una proteïna específica a partir d'una mostra de sang o teixit, en aquest cas a partir d'una mostra de fibroblast, el teixit de la pell. Aquest mètode implica córrer el material de la mostra en un gel i fer servir l'electroforesi en gel per separar les diferents proteïnes segons el seu pes molecular. Seguidament, es transfereixen del gel a la superfície d'una membrana la qual s'exposa a un anticòs (o varis) específics de la proteïna estudiada, unió que detectem amb un marcador radioactiu o químic. D'aquesta manera es pot detectar la presència d'una única proteïna en una mostra biològica i arribar a tenir una idea d'algunes de les seves característiques, a través d'una quantificació comparativa. Aquesta tècnica és en una eina molt útil en l'estudi de la biologia cel·lular i molecular, la bioquímica o la immunologia.

Com ja s'ha mencionat breument en el paràgraf anterior la tècnica de Western Blot es divideix en diferents fases:

1. Preparació de la mostra
2. Electroforesis
3. Transferència
4. Immunotinció
5. Detecció de les bandes

En primer lloc, cal destacar que per preparar de manera adequada el Western Blot la mostra cal ser tractada correctament. Un cop extreta la proteïna, mitjançant un mètode químic o mecànic segons el tipus de proteïna, es realitza una lisis química, normalment amb detergents, ja que la seva estructura permet trencar la membrana cel·lular i solubilitzar les proteïnes. Tanmateix, durant la ruptura cel·lular s'alliberen enzims de proteases que poden degradar la proteïna estudiada, per tant, cal evitar

durant la preparació de la mostra qualsevol degradació. Això es pot aconseguir fent el procés en fred i amb l'addició d'inhibidors de proteases. En segon lloc, voldria recalcar que els gels utilitzats per fer l'electroforesi estan fets d'acrilamida polimeritzada i reticulats per Bis en presència de persulfat d'amoni i TEMED. El gel que es va emprar en aquesta pràctica era un gel comercial de gradient que consisteix en diverses capes de diferents percentatges d'acrilamida. Això és molt útil quan s'estan analitzant diferents proteïnes en un mateix gel, ja que d'aquesta manera tant les proteïnes petites com les grans es poden separar eficientment en el mateix medi. Sota les condicions desnaturalitzant i de reducció, les proteïnes amb una càrrega negativa en sotmetre's en un camp elèctric migren a l'elèctrode positiu. Com que el SDS iguala la càrrega de totes les proteïnes, la seva migració depèn del pes molecular de cada proteïna, en conseqüència les molècules menys pesades migren més de pressa que les que tenen un pes molecular més gran.

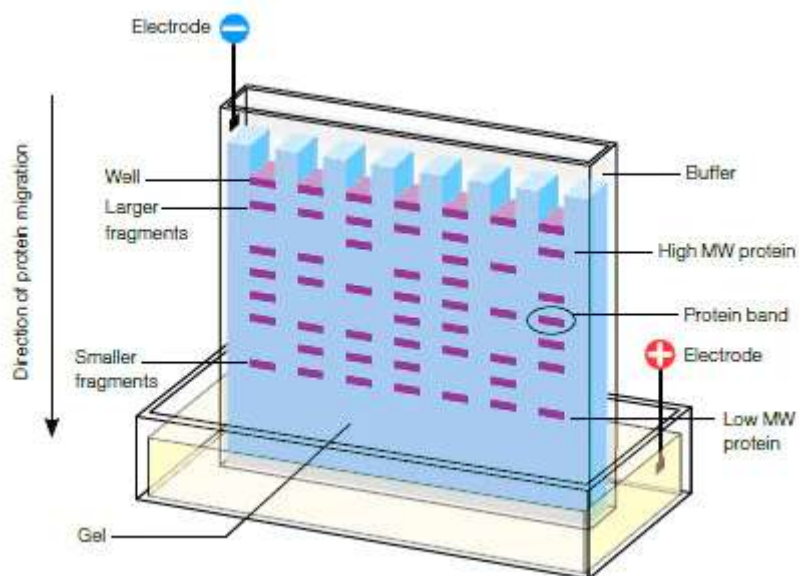


Figura 15. Esquema del funcionament del gel sotmès a l'electroforesi en el qual es veuen les bandes de les proteïnes amb diferents pesos moleculars.

Font: *Introducción a Western Blot.* (s/d) AllScience.

En últim lloc, els mètodes s'utilitzen per a la detecció de proteïnes poden ser directes o indirectes. En els directes es fa servir només un anticòs primari conjugat amb un marcatge detectable posteriorment, com pot ser un enzim, biotina o molècula fosforescent. Per contra, els mètodes indirectes emparen dos anticossos, un anticòs primari i un secundari (contra l'espècie del primer anticòs) que està conjugat amb un marcatge detectable. Aquest últim cas, que és el que s'utilitza en

l'experimentació és el més usat, ja que el senyal produït és més àmplia i es detecta millor.

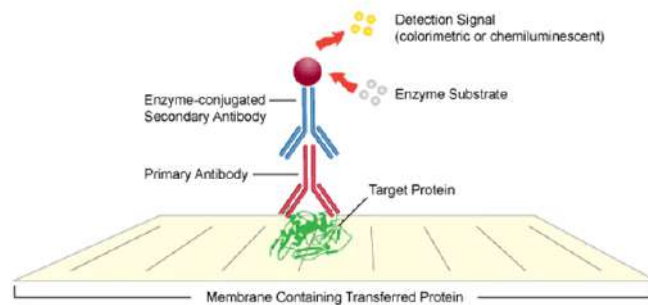


Figura 16. Funcionament de la detecció de proteïnes en un mètode indirecte en el qual un anticòs primari detecta la proteïna alhora que aquest és detectat per un anticòs secundari conjugat amb un enzim que emet un senyal detectable.

Font: *Introducción a Western Blot.* (s/d) AllScience.

3.3.2. Procediment

1. Preparar una solució amb la mostra de les proteïnes amb aigua mQ (que fa que la mescla sigui més líquida i corri millor pel gel del Western) i Laemmli Sample Buffer 4X suplementat amb un 10% de β -mercaptoetanol. El β -mercaptoetanol permet que la mescla sigui luminescent i es puguin llegir els resultats del western, a més, deixa una coloració blava. Com que el β -mercaptoetanol és tòxic aquesta dissolució es farà en una campana d'extracció, tot el material que toqui el mercaptoetanol es llençarà en un contenidor de residus tòxics. Un cop feta la solució, barrejar les mostres per agitació mitjançant un *vortex mixer* i centrifugar-les per evitar que quedi cap sòlid no dissolt. A continuació, s'afegeix la taula (taula 7) amb les quantitats de cada substància que vam posar a cada mostra, segons la seva concentració, per així poder carregar el gel amb la mateixa concentració a totes les mostres. Primer vam calcular per una mostra i llavors vam multiplicar les quantitats per 2,5 per fer-ne excés.

x1 mostra					
Mostra	µg/µL concentració	15 µg	H ₂ O	Loading Buffer 4x (µl)	Volum final (µl)
35 D4 R3	0,96	15,63	3,13	6,25	25
35 D8 R3	2,02	7,43	11,32	6,25	25
35 D12 R3	2,19	6,85	11,90	6,25	25
35 D14 R3	1,86	8,06	10,69	6,25	25
36 D4 R1	0,4	37,50	0,00	12,5	50
36 D8 R1	0,51	29,41	8,09	12,5	50
36 D12 R1	1,41	10,64	8,11	6,25	25
36 D16 R1	1,31	11,45	7,30	6,25	25
37 D5 R3	1,22	12,30	6,45	6,25	25
37 D8 R3	2,02	7,43	11,32	6,25	25
37 D12 R3	1,85	8,11	10,64	6,25	25
37 D14 R3	1,49	10,07	8,68	6,25	25

Taula 7. Quantitats de H₂O i Loading Buffer per una mostra segons la concentració pel Western Blot.
Font: Elaboració pròpia

x2,5 mostra						
Mostra	µg/µL concentració	15 µg	H ₂ O	Loading Buffer 4x (µl)	Volum final (µl)	Volum cargar (µl)
35 D4 R3	0,96	39,06	7,81	15,63	62,50	25
35 D8 R3	2,02	18,56	28,31	15,63	62,50	25
35 D12 R3	2,19	17,12	29,75	15,63	62,50	25
35 D14 R3	1,86	20,16	26,71	15,63	62,50	25
36 D4 R1	0,4	93,75	0,00	31,25	125,00	50
36 D8 R1	0,51	73,53	20,22	31,25	125,00	50
36 D12 R1	1,41	26,60	20,28	15,63	62,50	25
36 D16 R1	1,31	28,63	18,25	15,63	62,50	25
37 D5 R3	1,22	30,74	16,14	15,63	62,50	25
37 D8 R3	2,02	18,56	28,31	15,63	62,50	25
37 D12 R3	1,85	20,27	26,60	15,63	62,50	25
37 D14 R3	1,49	25,17	21,71	15,63	62,50	25

Taula 8. Quantitats de H₂O i Loading Buffer a afegir a 2,5 mostres segons la seva concentració per preparar-les pel Western Blot.
Font: Elaboració pròpia

Un cop preparades les mostres es congelen a -80°C O/N per seguir amb el procediment el dia següent.

2. Treure les mostres del congelador i descongelar-les a temperatura ambient, en una gradeta per eppendorfs (figura 14). Un cop descongelades passar les mostres pel vòrtex i centrifugar-les perquè la mescla quedi homogènia altre cop.

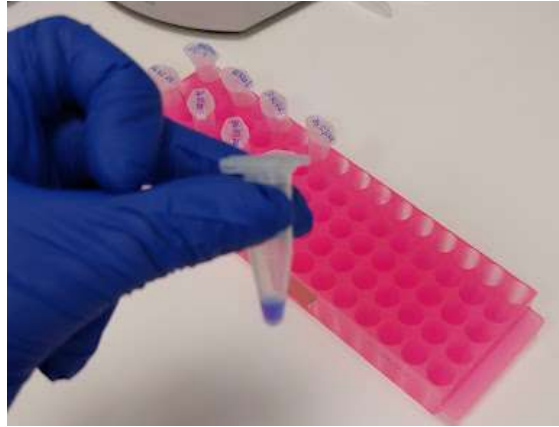


Figura 17. Mostra preparada pel Western Blot descongelada en un eppendorf.
Font: Elaboració pròpia

3. Incubar les mostres 5 minuts a 95° en un escalfador de bloc, per desnaturalitzar les proteïnes. Un cop passats els 5 minuts tornar a passar-les pel vòrtex i la centrifuga.
4. Preparar l'estructura pel gel del Western Blot (TGX Stain Free pre-cast Gels). Primer s'ha de treure la pinta del gel prefet i procurar que quedin les columnes ben col·locades. A continuació es posen cadascun dels gels a un costat diferent de la cubeta electroforesis (figura 15). Seguidament, introduir l'Electrolyte Buffer x1 (composició a l'annex 2) a la cubeta, que permet que la càrrega elèctrica arribi a tota a la cubeta, gràcies a la seva composició conductora. Comprovar que està ben tancada de manera que no vessa líquid.

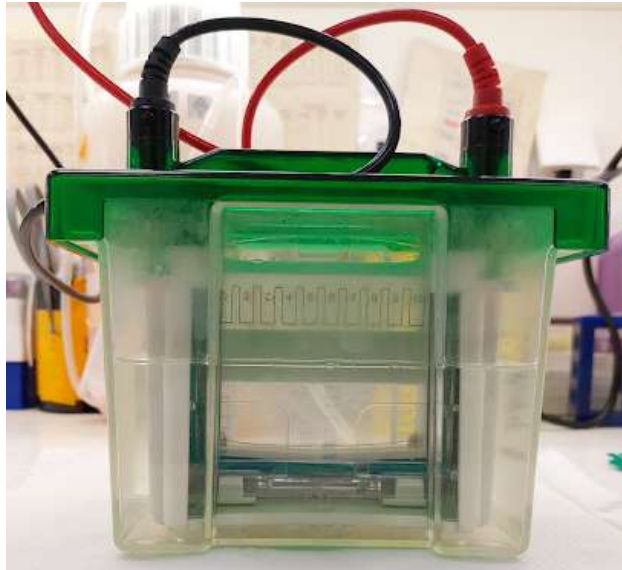


Figura 18. Cubeta electroforesis preparada per carregar els gels del Western Blot.
Font: Elaboració pròpia

5. Carregar gels, és a dir, posar amb una micropipeta cada mostra a la columna corresponent. S'introdueixen 12 μ L del marcador molecular i 25 μ L de cada mostra, excepte la 36D4 i 36D8 que es posen 50 μ L. S'ha d'anar molt amb compte en carregar el gel, ja que és fàcil trencar-lo amb la punta de la micropipeta si no la col·loquem bé. Paral·lelament, s'introdueixen les solucions lentament per no fer bombolles dins la columna. A més, en aquest cas en haver de carregar 50 μ L en algunes mostres s'ha de procurar no vessar la mostra, ja que el límit de capacitat del gel és d'aquest mateix volum.

A continuació es pot observar una taula amb l'esquema de com es va carregar cada gel (taula 8). La M es refereix al marcador de proteïnes que consisteix en una mostra amb diferents pesos moleculars coneguts, indicats amb diferents colors, que serveixen com a referència. La resta de columnes es carreguen amb les mostres. Es van realitzar dos Westerns amb dos gels cadascun que s'organitzen de la següent manera:

- Gel 1: En el primer Western s'analitzen tres proteïnes del pacient 35, dues de les quals tenien un pes molecular molt similar, la Troponina T (TT) i la Subunitat β 1 (B1). De manera que es va fer una anàlisi de cadascuna d'elles, i dues anàlisis de la proteïna del canal de sodi ($\text{Na}_v1.5$).

- Gel 2: S'analitzen les mateixes proteïnes que al gel 1, i de la mateixa manera, però amb el pacient 36.
- Gel 3: En el segon Western Blot es van analitzar tan sols les proteïnes TT i Na_v1.5, ja que es va veure que l'anticòs de B1 no funcionava del tot i no es detectava bé la proteïna. Per tant, es va poder fer una repetició completa de la mostra amb les dues proteïnes analitzades. En aquest gel s'analitza la mostra del pacient 35.
- Gel 4: S'analitzen les mateixes proteïnes que al gel 3 però amb la mostra del pacient 36.

ORGANITZACIÓ MOSTRES									
Gel 1 (TT, NAV1.5 i B1)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M	35.4	35.8	35.12	35.14	M	35.4	35.8	35.12	35.14
Gel 2 (TT, NAV1.5 i B1)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M	36.4	36.8	36.12	36.16	M	36.4	36.8	36.12	36.16
Gel 3 (TT i NAV1.5)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M	35.4	35.8	35.12	35.14	M	35.4	35.8	35.12	35.14
Gel 4 (TT i NAV1.5)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M	37.5	37.8	37.12	37.14	M	37.5	37.8	37.12	37.14

Taula 9. Esquema de com s'organitzaven els gels en els Western Blot realitzats.
 Font: Elaboració pròpia

6. Acabar d'emplenar la cubeta amb Electrolyte Buffer x1, perquè puguin córrer els gels. Connectar el cablejat i comprovar que els elèctrodes estan ben col·locats. Finalment, córrer el gel a 80 V durant 15 minuts, permetent l'entrada de proteïnes al gel i després pujar a 180 V durant 45 minuts perquè se separin les proteïnes (Figura 17).

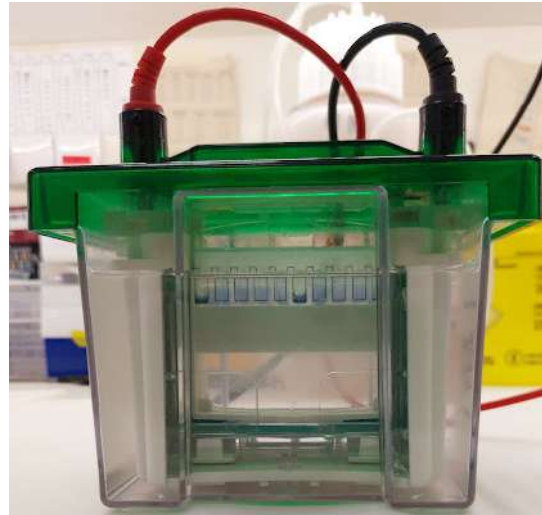


Figura 19. Entrada de proteïnes al gel apilador per mitjà d'electroforesis procés que provoca la separació de proteïnes segons el seu pes molecular.
Font: Elaboració pròpia

7. Desmuntar el gel i activar-lo amb ChemiDoc MP (BioRad) per revelar el gel. Seguidament, fer una fotografia al gel amb el ChemiDoc, programa automàtic 45s d'ultraviolat, evitant saturacions, taques a la fotografia. A continuació, es pot observar una imatge del gel a simple vista i les extreïtes amb el ChemiDoc (Figura 18).

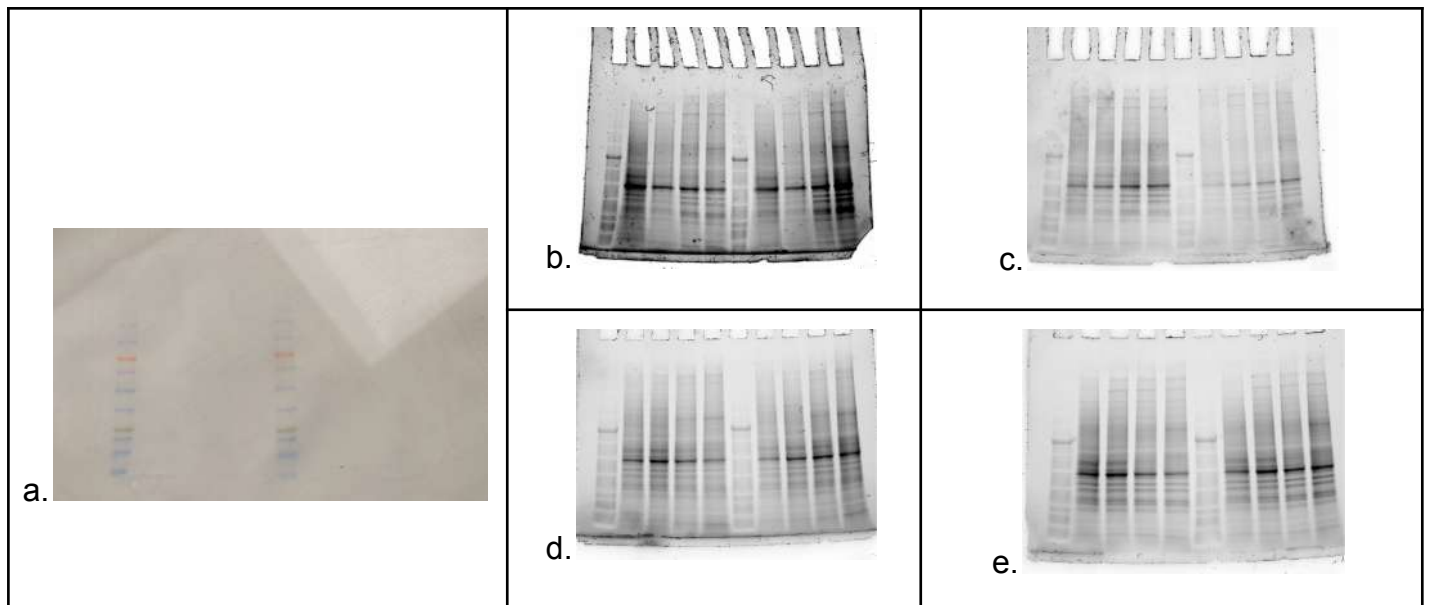


Figura 20. Imatges del gel revelat, en la foto a. es pot observar el gel a simple vista, amb les línies de tinció del marcador, les fotografies b,c,d i e estan fetes amb el ChemiDoc en el mode Stain Free Gel i corresponen a les mostres 36, 35, 37 i 35.2, respectivament.
Font: Elaboració pròpia

- Muntar el “sandvitx”. Preparació de diferents capes perquè les proteïnes i el marcador es transfereixin del gel a la membrana. Primer cal activar la membrana amb PVDF, ja que és hidròfoba. Aquesta se submergeix durant 20 segons en metanil 100%. Després es posa en Transfer Buffer 1X (composició a l'annex 2) durant uns quinze o vint minuts en agitació, cal que la membrana quedi ben coberta de la solució per evitar que s'assequi. Un cop activada la membrana es munten la resta de les capes. Per fer això es mullen 6 papers de filtre i 2 esponges amb Transfer 1x i es col·loquen en l'ordre indicat per la Figura 19. Al col·locar-ho cal passar un rodet delicadament abans de posar l'última esponja per eliminar les bombolles que hagin pogut aparèixer.

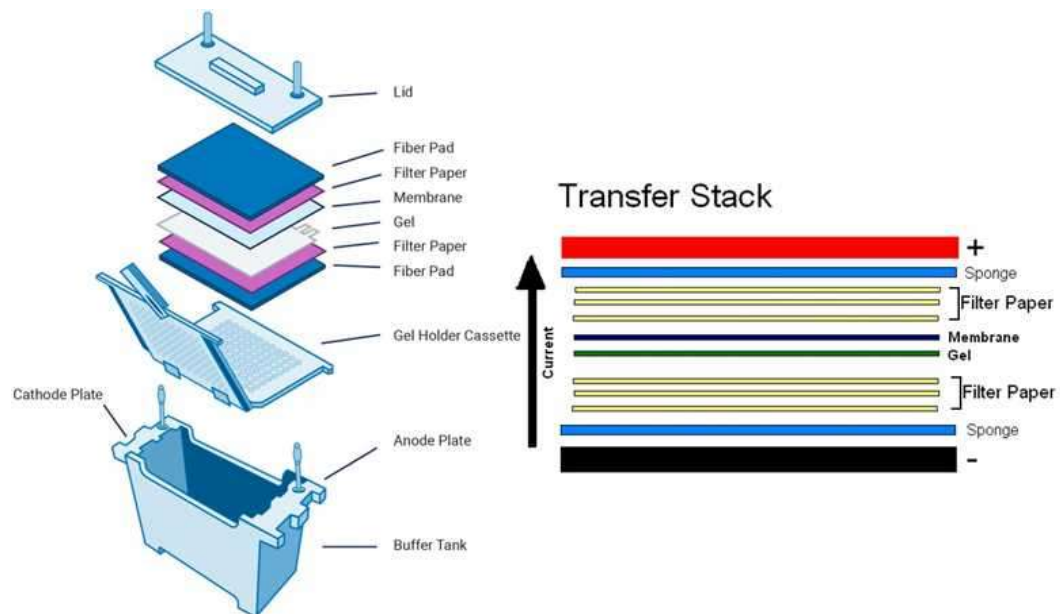


Figura 21. Organització del sandvitx per transferir les proteïnes del gel a la membrana.
 Font: Protein transfer from gel to membrane in western blot assay - creative Biolabs. (s/d).
 Antibody-creativebiolabs.com.

- Posar tubs de 50 mL amb aigua congelada a la cubeta i afegir 4 mL de SDS 10%, 1mL a cada cantonada perquè es reparteixi, això afavorirà la transferència. Llavors deixem que les proteïnes es transfereixen durant 2 hores a 90 V i 4°C.
- Desmuntar el sandvitx i fer fotografies de la membrana i el gel amb el ChemiDoc al programa Stain Free Blot. És important tenir cura en aquest procés per tal d'obtenir les imatges (Figura 20) més clares possibles, ja que posteriorment, s'utilitzaran per a la quantificació i normalització de la proteïna total. S'ha de comprovar que no hi hagi quedat cap resat de proteïna al gel.

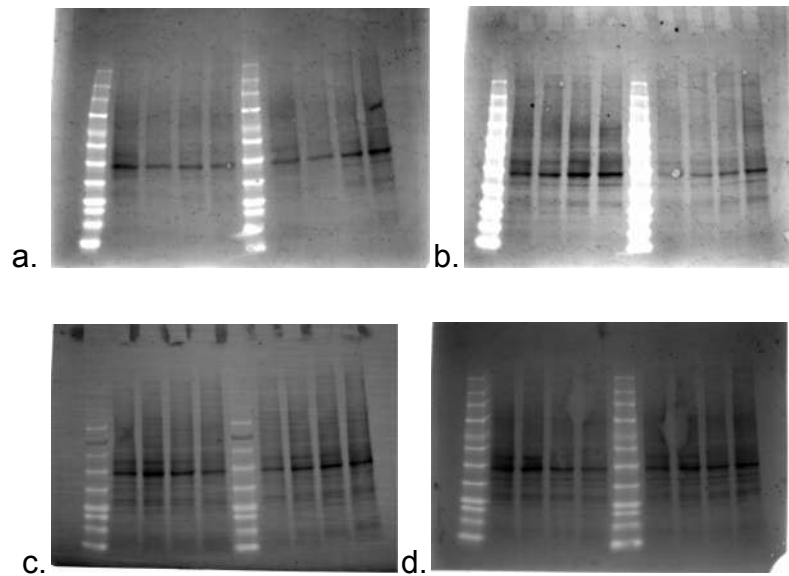


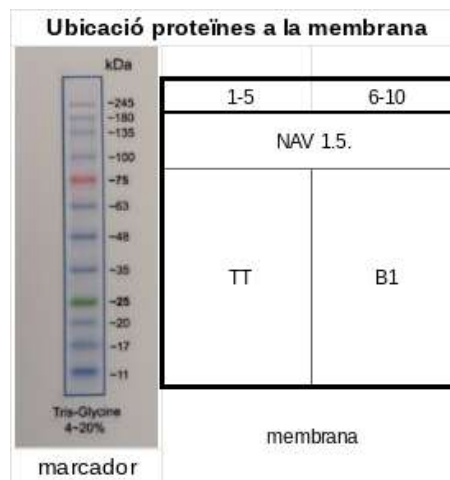
Figura 22. Fotografia membrana per la normalització de la proteïna total (Stain Free Blot).
 a. 36, b. 35, c. 37, d. 35.2 .
 Font: Elaboració pròpia

11. Bloquejar la membrana amb llet al 5% en PBST 1x (composició a l'annex 2), s'ha d'utilitzar una solució de 2 g de llet i 40 mL de PBST 1x, i s'agita durant una hora mitjançant el shaker a velocitat baixa, a temperatura ambient. Per cada membrana posarem 20 mL de la solució, tot això dins unes capses tancades perquè no incideixi la llum. La llet conté proteïnes i aquestes s'enganxaran a tots els llocs de la membrana on no hi hagi proteïnes, de manera que tota la membrana quedi coberta de proteïna, d'aquesta forma s'evita que els anticossos, que són proteïnes, s'enganxin a llocs lliures on no hi havia proteïna.

12. Tallar la membrana per dividir els llocs on es troba la proteïna d'interès. Se sap on es troba gràcies al marcador molecular i el pes molecular de cada proteïna. La subunitat β té un pes molecular de 25kDa²³, mentre que el de la troponina T és de 34,6 kDa i el del canal de sodi de 260. Tallar la membrana per sota la línia vermella (75 kDa) i a la part de baix separar les columnes de la 1 a la 5 i de la 6 fins a la 10. En el segon Western Blot com que no es va analitzar la β 1, tota la part per sobre de 75 kDa era de la Na_v 1.5 i la de sota

²³ Unitat de massa molecular equivalent a 1.000 daltons.

per la TT. En la taula 9 i la figura 21 es mostra com es van tallar les membranes.



Taula 10. Es pot observar la ubicació de les diferents proteïnes en la membrana
 Font: Elaboració pròpia



Figura 23. Membrana tallada segons l'àrea on es troba la proteïna d'interès
 Font: Elaboració pròpia

13. Incubar cada membrana amb l'anticòs primari (antitriponina-T, antiNa_v1.5, etc.) d'aquella proteïna, que està diluït amb 1% BSA, 0,02 % NaN₃ en PBS (composició a l'annex 2). Se separaran les mostres segons la proteïna d'interès i es posen "back to back", és a dir la part on hi ha les proteïnes estarà en sentits oposats perquè així l'anticòs arribi a tot arreu. Deixar incubar les mostres durant tota la nit (O/N) a 4°C.

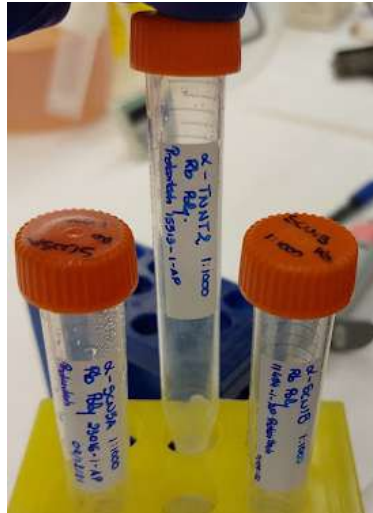


Figura 24. Anticòs primari utilitzat per la detecció de proteïnes.
Font: Elaboració pròpia

14. L'endemà, es recupera l'anticòs primari, ja que es pot reutilitzar. Es realitzen dues rentades a la membrana amb PBST i dues més amb PBS 1x (composició a l'annex 2). Cada rentat serà d'una duració de 5 minuts amb agitació.
15. Incubar les membranes amb l'anticòs secundari que està conjugat amb "horse radish peroxidase" (HRP) diluït 1:10000 en llet al 30% en PBST 1x. L'HRP presenta fosforescència i permet visualitzar l'anticòs en analitzar-lo. L'anticòs secundari s'enganxa a l'anticòs primari, que a l'hora està enganxat a una proteïna concreta, de manera que el senyal s'amplifica i augmenta la sensibilitat per detectar la proteïna d'interès. Els anticòs secundaris són contra l'espècie del primer anticòs, en aquest cas "antirabbit", ja que l'anticòs primari era de conill. Incubar les membranes durant una hora en agitació en caps tancades, per evitar que la llum faci mal bé l'HRP. Les quantitats exactes que s'utilitzen són 1,5 g de llet amb 48,5 ml de PBST i 5µL d'anticòs.
16. Rentar les membranes, cadascuna a la seva caixa, durant 5 minuts dos cops amb PBST i PBS x1.
17. Preparar el "chemiluminescens substrate Clarity", mentre es manté la membrana en PBS 1x. S'ha de barrejar el peròxid i el luminol en una relació d'1:1. El volum total de la solució s'ha de preparar en diverses tongades, de manera que els components estiguin el mínim de temps possible en contacte abans de posar-hi la membrana, ja que des que entren en contacte

comencen a reaccionar. Llavors se submergeix cada tros de la membrana en el Clarity durant 5 minuts i es fan les fotos d'aquella membrana amb el ChemiDoc, en el mode *Chemiluminiscense* que marca la proteïna d'interès i després *Colorimetric* que permet superposar el revelat per saber el pes aproximat de la banda per normalitzar (Figura 24). Un cop fetes les fotografies les membranes es deixen assecar i es guarden en un plàstic transparent etiquetat.

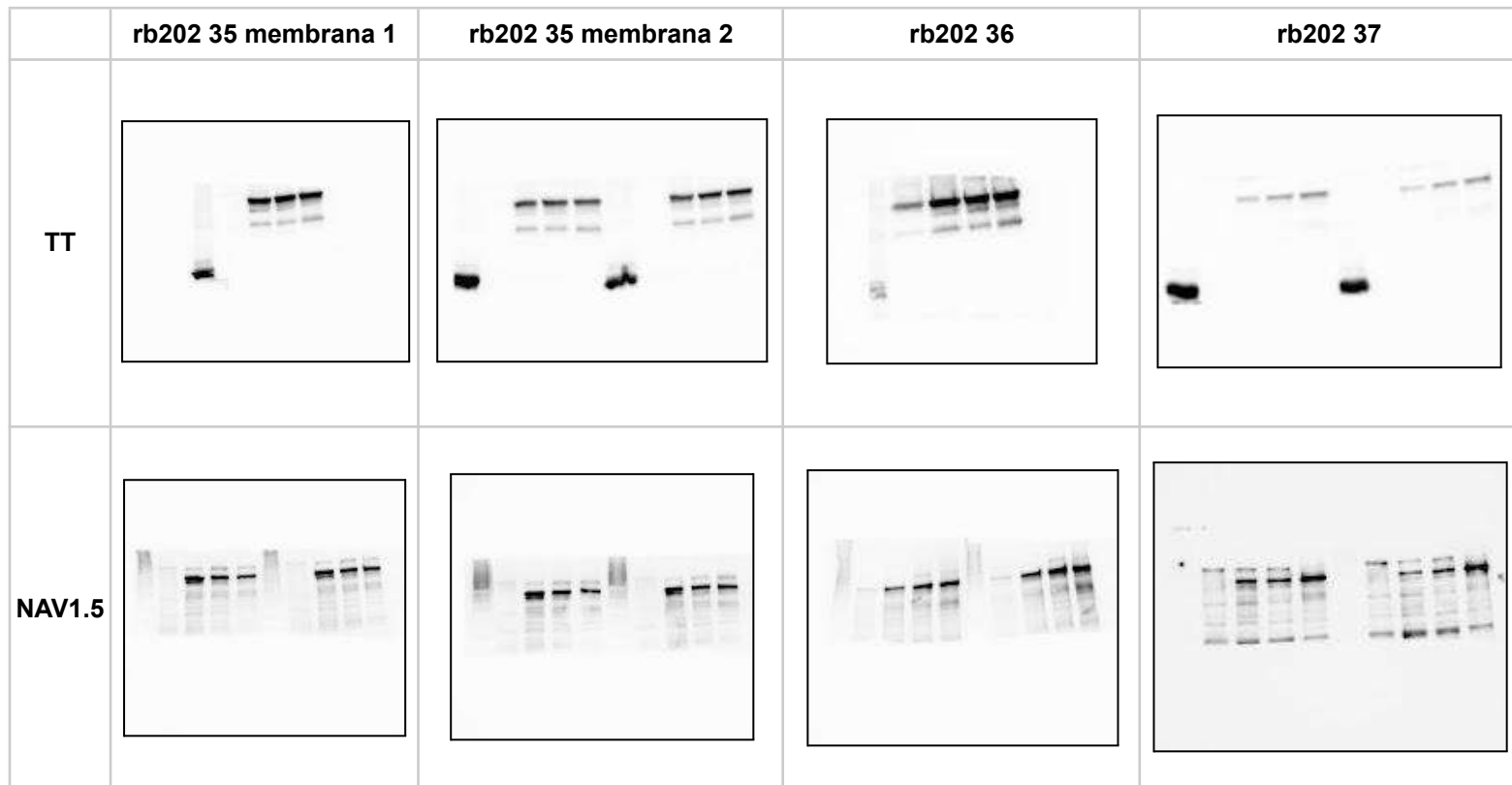


Figura 25. Imatges Chemiluminiscense que destaquen les proteïnes NAV 1.5 i TT en les mostres dels pacients.

Font: Elaboració pròpia

3.4. Resultats

3.4.1. Obtenció dels resultats

Els resultats obtinguts en les gràfiques i taules que es poden veure en el següent apartat s'obtenen a partir de les fotografies en mode Chemiluminiscense que es normalitzen per la proteïna total obtinguda en les imatges de mode Stain Free Blot. Amb el programa de BioRad, es pot observar la quantitat de proteïna que hi ha en una secció concreta a través dels píxels que ha detectat anteriorment el ChemiDoc. De manera que seleccionem les bandes concretes on es troba la proteïna i es crea

una taula a partir d'aquestes dades, també es quantifiquen el nombre de proteïnes total que hi ha a cada carril que serviran per fer la primera normalització. Les normalitzacions són útils per tenir un nombre relatiu de la quantitat que hi ha de cada proteïna i ens permet comparar un carril amb un altre, ja que si es quantifica el nombre real, aquest podria variar segons la quantitat de proteïna carregada.



Figura 26. Obtenció de les dades de Western Blot a través del programa BioRad.
Font: Elaboració pròpia

3.4.2. Anàlisi dels resultats

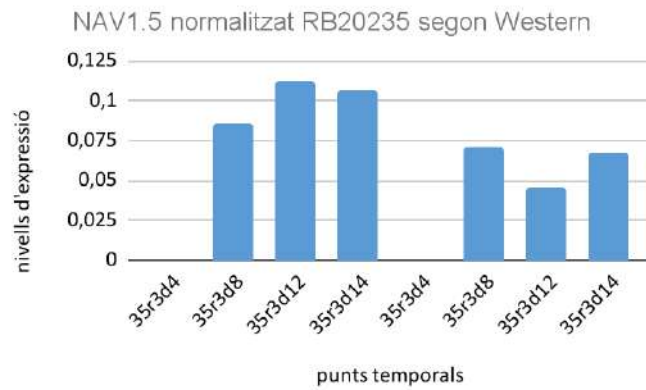
En aquest treball s'expressen els resultats mitjançant l'ús de taules i gràfics. Per més informació sobre les dades recollides es pot visitar l'annex 4. Primer s'analitzaran els resultats de la proteïna Na_v 1.5 i després els de la TT.

Quan s'analitzen els resultats del segon Western Blot del pacient 35, portador de SNV i amb afectació fenotípica de la síndrome, s'observa que els nivells de Na_v 1.5 normalitzats augmenten del dia 4 al 14. En canvi, quan es normalitzen per la troponina T aquests valors disminueixen (gràfics 2 i 3) això és degut al fet que en aquest moment la troponina augmenta més ràpidament que el canal de sodi. Si es té en compte que la TT serveix com a indicador de cardiomiòcits, es pot tenir una idea aproximada de quantes cèl·lules són de cardiomiòcits. S'ha de suposar a l'haver-hi més quantitat de TT, més cardiomiòcits hi haurà i, per tant, major expressió de Na_v 1.5, si aquesta ràtio no es compleix o no es manté estable, vol dir que l'expressió del canal no està augmentant. En la segona repetició tècnica els dos valors tenen la mateixa tendència, però són bastant irregulars, ja que pugen el dia 8, disminueixen al 12 i tornen a augmentar al 14. Per altra banda, en les dades del primer Western Blot amb la mostra 35 els valors de l'expressió de canal de sodi

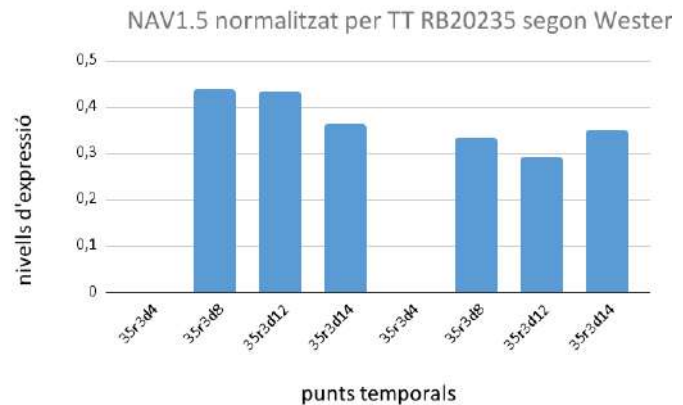
baixen tant quan està normalitzat com quan està normalitzat per TT, tot i que en l'últim cas entre el dia 12 i 14 no hi ha gaire diferència, fins i tot arriba a pujar una mica (gràfics 4 i 5).

NAV1.5 RB20235 segon Western		
mostres	normalitzat	normalitzat per TT
35r3d4	0	0,00
35r3d8	0,09	0,44
35r3d12	0,11	0,43
35r3d14	0,11	0,36
35r3d4	0	0,00
35r3d8	0,07	0,34
35r3d12	0,05	0,29
35r3d14	0,07	0,35

Taula. 11 Valors de NAV1.5. Normalitzada en el segon Western Blot del pacient Rb20235
Font: Elaboració pròpia



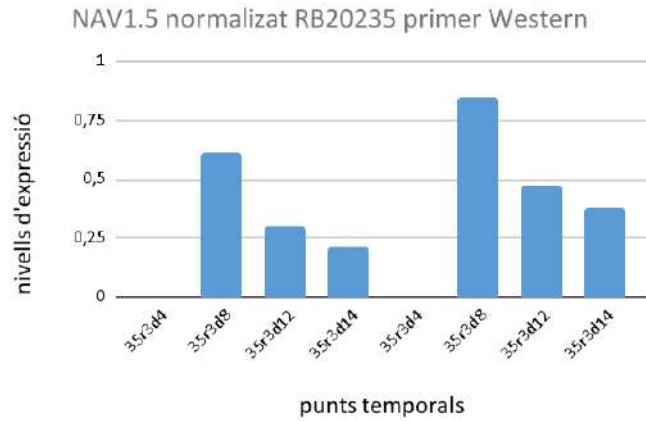
Gràfic 2. Evolució NAV1.5. Normalitzada en el pacient Rb20235 segon Western Blot.
Font: Elaboració pròpia.



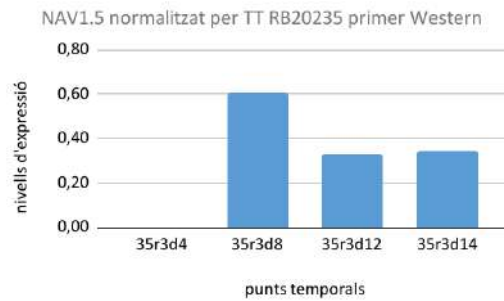
Gràfic 3. Evolució NAV1.5. Normalitzada per TT en el pacient Rb20235 segon Western Blot.
Font: Elaboració pròpia.

NAV1.5 RB202 35 primer Western		
mostra	normalitzat	normalitzat per TT
35r3d4	0,0000	
35r3d8	0,6178	
35r3d12	0,2986	
35r3d14	0,2099	
35r3d4	0,0000	0,00
35r3d8	0,8488	0,60
35r3d12	0,4712	0,33
35r3d14	0,3779	0,34

Taula.12 Valors de NAV1.5. Normalitzada en el primer Western Blot del pacient Rb20235. Font: Elaboració pròpia.



Gràfic.4 Evolució NAV1.5. Normalitzada en el pacient Rb20235 primer Western Blot. Font: Elaboració pròpia.

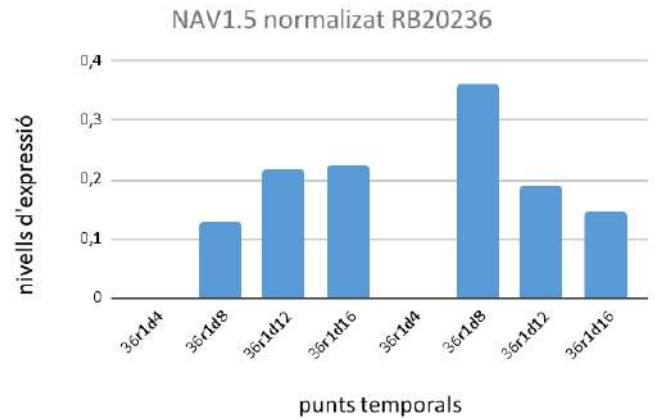


Gràfic.5 Evolució NAV1.5. Normalitzada per TT en el pacient Rb20235 primer Western Blot. Font: Elaboració pròpia.

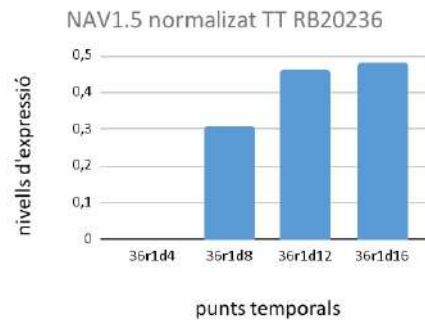
Pel que fa al pacient 36, portador de SNV però sense afectació, l'expressió de $Na_v1.5$ normalitzada per TT augmenta amb el pas dels dies (gràfic 7), mentre que la $Na_v1.5$ normalitzada disminueix, cosa que ens indica que els nivells de TT, la quantitat de cardiomiòcits, del pacient 36 també van baixar en aquests punts temporals. Tanmateix, quan la $Na_v1.5$ es normalitza per la proteïna total, en la primera repetició tècnica l'expressió augmenta, mentre que en la segona disminueix (gràfic 6).

NAV1.5 RB202 36		
Mostra	normalizat	normalitzat per TT
36r1d4	0,00000	
36r1d8	0,12920	
36r1d12	0,21783	
36r1d16	0,22425	
36r1d4	0,00000	0,00
36r1d8	0,36113	0,31
36r1d12	0,19056	0,46
36r1d16	0,14524	0,48

Taula. 13. Valors de NAV1.5. Normalitzada en el pacient Rb20236
 Font: Elaboració pròpia.



Gràfic.6 Evolució NAV1.5. Normalitzada en el pacient Rb20236.
 Font: Elaboració pròpia.

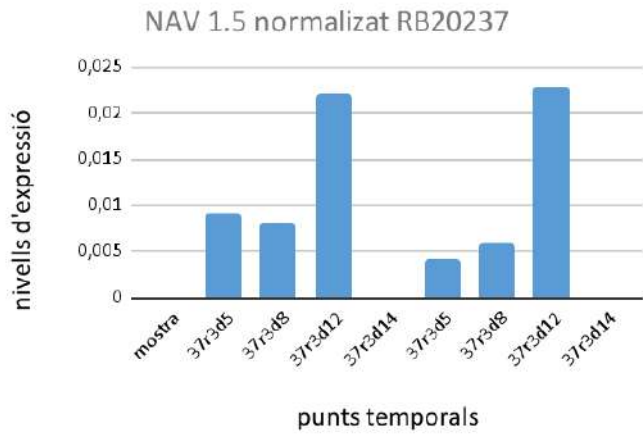


Gràfic.7 Evolució NAV1.5. Normalitzada per TT en el pacient Rb20236.
 Font: Elaboració pròpia.

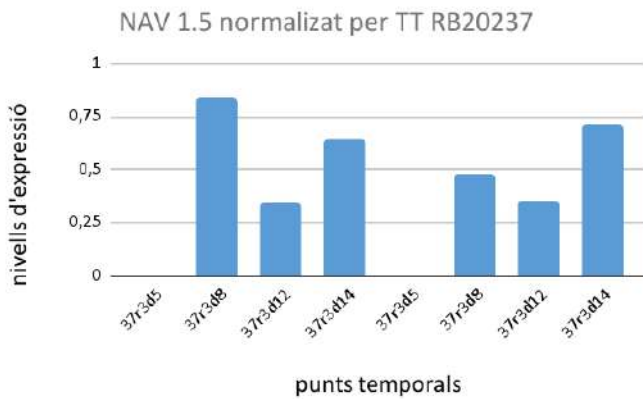
En canvi, en la mostra 37, que no és portador ni afectat per la malaltia, s'observa un augment de l'expressió de $Na_v1.5$ (normalitzat per TT) el dia 8, una disminució dràstica el dia 12 i torna a pujar el 14, aquesta tendència es repeteix en les dues repeticions tècniques (gràfic 9). Tanmateix, quan es la $Na_v1.5$ es normalitza pel volum de proteïna total, es produeix un augment exponencial de la seva expressió (gràfic 8). Les diferències entre una normalització i l'altra, es deuen al fet que el nivell de cardiomiòcits, indicats per TT, augmenten equitativament en els diferents punts temporals.

NAV1.5 RB202 37		
mostra	normalizat	normalizat per TT
37r3d5	0,00000	0,00
37r3d8	0,00918	0,84
37r3d12	0,00827	0,34
37r3d14	0,02222	0,64
37r3d5	0,00000	0,00
37r3d8	0,00433	0,48
37r3d12	0,00604	0,35
37r3d14	0,02300	0,71

Taula. 14. Valors de NAV1.5. Normalitzada en el pacient Rb20237.
Font: Elaboració pròpia.



Gràfic.8 Evolució NAV1.5. Normalitzada en el pacient Rb20237.
Font: Elaboració pròpia.

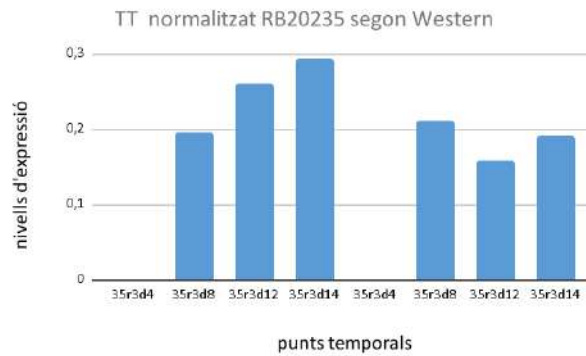


Gràfic.9 Evolució NAV1.5. Normalitzada per TT en el pacient Rb20237.
Font: Elaboració pròpia.

Pel que fa a la proteïna de troponina T, tot i no ser un factor relacionat amb l'expressió del canal de sodi, ens serveix com a indicador de cardiomiòcits. És a dir, la relació entre cardiomiòcits i la proteïna TT és directament proporcional. Aquesta relació ens indica si el canvi en l'expressió de Na_v 1.5 es deu a un canvi en la quantitat de proteïna o en el nombre de cardiomiòcits. El dia 4 les cèl·lules encara no s'han començat a diferenciar en cardiomiòcits, sinó que és a partir del dia 8 que comencen a batejar i considerar-se cèl·lules del cor. És per això que al dia 4 el valor de TT i Na_v 1.5 acostuma a ser a prop de 0.

En el pacient 35, portador de SNV i afectat per la síndrome, es veu que la mostra del segon Western Blot a la primera repetició hi ha una evolució creixent de la quantitat de TT, mentre que la segona repetició i en el primer Western Blot hi ha una caiguda d'expressió en el dia 12.

TT RB20235 segon Western	
mostra	normalitzat
35r3d4	0,00
35r3d8	0,20
35r3d12	0,26
35r3d14	0,29
35r3d4	0,00
35r3d8	0,21
35r3d12	0,16
35r3d14	0,19



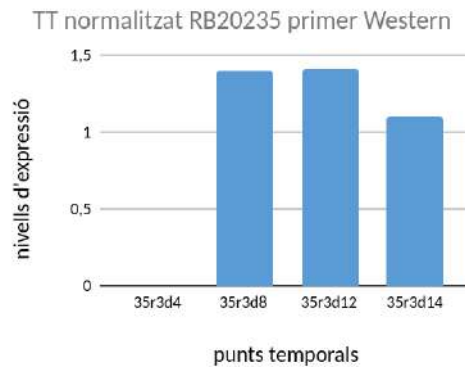
Gràfic.10. Evolució TT normalitzada en el segon Western Blot del pacient Rb20235.

Font: Elaboració pròpia.

Taula. 15. Valors de TT normalitzada en el segon Western Blot del pacient Rb20235.

Font: Elaboració pròpia.

TT RB20235 primer Western	
mostra	normalitzat
35r3d4	0,0000
35r3d8	1,4049
35r3d12	1,4154
35r3d14	1,1061



Gràfic.11. Evolució TT normalitzada en el primer Western Blot del pacient Rb20235.

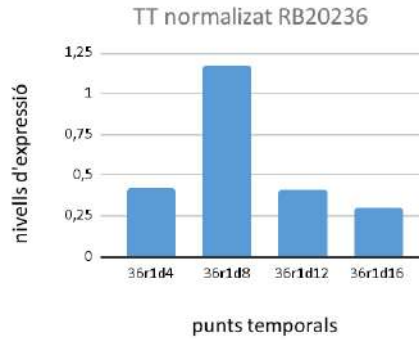
Font: Elaboració pròpia.

Taula. 16. Valors de TT normalitzada en el primer Western Blot del pacient Rb20235.

Font: Elaboració pròpia.

Pel que fa al pacient 36, portador de SNV, sense afecció, té una petita expressió anormal de TT el dia 4, un augment marcat el dia 8 i una disminució dràstica els dos dies restants.

TT RB202 36	
Mostra	normalizat
36r1d4	0,42582
36r1d8	1,17688
36r1d12	0,41490
36r1d16	0,30110

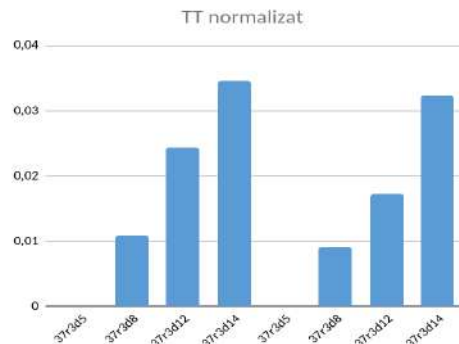


Gràfic.12 Evolució TT normalitzada en el pacient Rb20236.
Font: Elaboració pròpia.

Taula. 17. Valors de TT normalitzada en el pacient Rb20236.
Font: Elaboració pròpia.

Finalment, el pacient 37, que no és portador ni està afectat per la síndrome, té una expressió creixent de la proteïna en ambdues repeticions tècniques. Respecte als altres pacients el 37 té un creixement molt més estable i marcat.

TT RB202 37	
mostra	normalizat
37r3d5	0,00
37r3d8	0,01
37r3d12	0,02
37r3d14	0,03
37r3d5	0,00
37r3d8	0,01
37r3d12	0,02
37r3d14	0,03



Gràfic.13 Evolució TT normalitzada en el pacient Rb20237.
Font: Elaboració pròpia.

Taula. 18. Valors de TT normalitzada en el pacient Rb20237.
Font: Elaboració pròpia.

4. ANÀLISI GENÈTICA

En aquesta secció s'elabora una anàlisi de l'expressió d'ARN per observar l'evolució de l'expressió del canal de sodi a través del seu gen (*SCN5A*), per comparar-la amb el de la subunitat $\beta 1$ del canal (*SCN1B*) i la del marcador de cardiomiòcits troponina T (*TNNT2*).

4.1. Extracció i quantificació ARN

Per l'extracció d'ARN es va seguir un nou protocol, per evitar utilitzar Qiazol, el qual és un material d'alta toxicitat, i reduir el temps que suposava l'antic protocol. És rellevant el fet que tot el procés es fa en una campana d'extracció, ja que es fa ús del β -mercaptoetanol el qual és un reactiu tòxic. A més, també s'ha de vigilar la contaminació creuada d'ARN i l'existència d'ARNasas, que degraden l'ARN, per això s'ha de vigilar que la campana estigui el més estèril possible i cada cop que s'introdueix alguna cosa a la campana s'ha d'aplicar RNAzap, el qual elimina les ARNasas del material. D'aquesta manera s'evita la contaminació i degradació de les mostres.

El procés d'extracció segueix l'estructura següent:

1. Descongelar les mostres de les iPSC diferenciades en cardiomiòcits en fred. Les mostres són diferents de les utilitzades en l'anàlisi de proteïnes però dels mateixos dies, pacients i rondes.
2. Resuspendre cada pellet amb 600 μ L buffer RLT i 6 μ L de β -mercaptoetanol pipetejant ràpidament i nombrosos cops.
3. Posar la mostra lisada en una columna de purificació QIAshredder spin (Figura 23), amb el corresponent tub recol·lector, que pretén separar l'ARN de la resta de la mostra, i centrifugar a màxima potència durant 2 minuts.

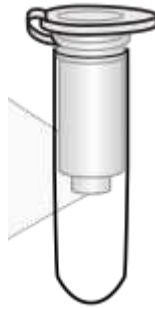


Figura 27. Columna QIA shredder spin de purificació dins un tub recol·lector.
Font: Purificación de ácidos nucleicos mediante columnas de centrifugado. (maig 2022).
Wikipedia.

4. Afegir un volum d'etanol 70% a les mostres i barrejar amb l'ajuda d'una pipeta.
5. Transferir 700µL de la mostra lisada, sense els precipitats, a una columna RNeasy i centrifugar durant 15 segons a >8000 g²⁴.
6. Descartar el fluid del tub recol·lector i repetir pas 5, per aprofitar el líquid restant, i tornar a descartar el líquid.
7. Rentar la columna amb 700µL de RW1 i centrifugar 15 segons a >8000 g, posteriorment descartar el fluid que queda al tub.
8. Incubar la columna amb 10 µL DNase i 70µL de buffer RDD durant 15 minuts a temperatura ambient.
9. Repetir el pas 7.
10. Fer dos rentats amb Buffer RPE. Al primer agregar 500µL de buffer, centrifugar 15 segons a 8000g i descartar el fluid. Al segon s'addiciona 500µL de buffer i es centrifuga a 8000g durant 2 minuts.
11. Canviar el tub recol·lector de la columna per un de nou i centrifugar a màxima velocitat per un minut.
12. Col·locar la columna en un microtub d'1,5 ml i afegir 30 µL de H₂O RNase free per eluir²⁵.
13. Centrifugar durant un minut a 10000 g.
14. Congelar mostra d'ARN a -80°C O/N.

²⁴La força g (força centrífuga relativa) és la quantitat d'acceleració que s'aplicarà a la mostra, depèn de les revolucions per minut (rpm) i del radi del rotor.

²⁵Separar una substància del sòlid que l'ha absorbit mitjançant un dissolvent.

4.2 Quantificació d'ARN

Un cop finalitzada l'extracció d'ARN i les mostres estan congelades a -80°C es comença la quantificació d'ARN seguint el procediment següent.

1. Activar el lector, Nano Drop 1000 Data Viewer (Figura 24), que quantificarà les mostres afegint-hi H_2O RNAsa free.
2. Fer el blanc, és a dir afegir $1\mu\text{L}$ de H_2O RNAsa free al punt negre de la màquina. Això servirà com a "mostra 0" perquè la màquina tingui una referència d'on començar.
3. Posar $1\mu\text{L}$ de cada mostra per quantificar-les en el punt indicat, creant així una petita columna d'aigua. Després de cada mostra netejar la màquina amb H_2O RNase free i un paper especial (Kimitech Delicate Task Wipers). El lector utilitza una tècnica espectròpica per determinar l'absorbància de la mostra en diferents longituds d'ona per calcular la concentració de l'ARN, això es mostra en els gràfics espectroscòpics que genera l'aparell (Figura 25). Això ho fa a través de la llei Lambert-Beer: $Abs = \varepsilon \cdot b \cdot C$. On *Abs* és l'absorbància, ε el coeficient d'extinció molar, *b* la longitud de pas de la cubeta i *C* la concentració de la mostra. D'aquesta manera es poden obtenir les concentracions d'ARN de les mostres (Taula 18).

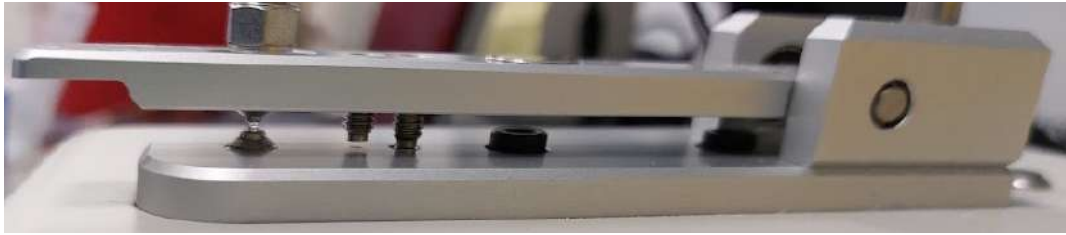


Figura 28. Aparell lector Nano Drop 1000 que utilitza una tècnica espectroscòpica per calcular concentració de les mostres.
 Font: Elaboració pròpia

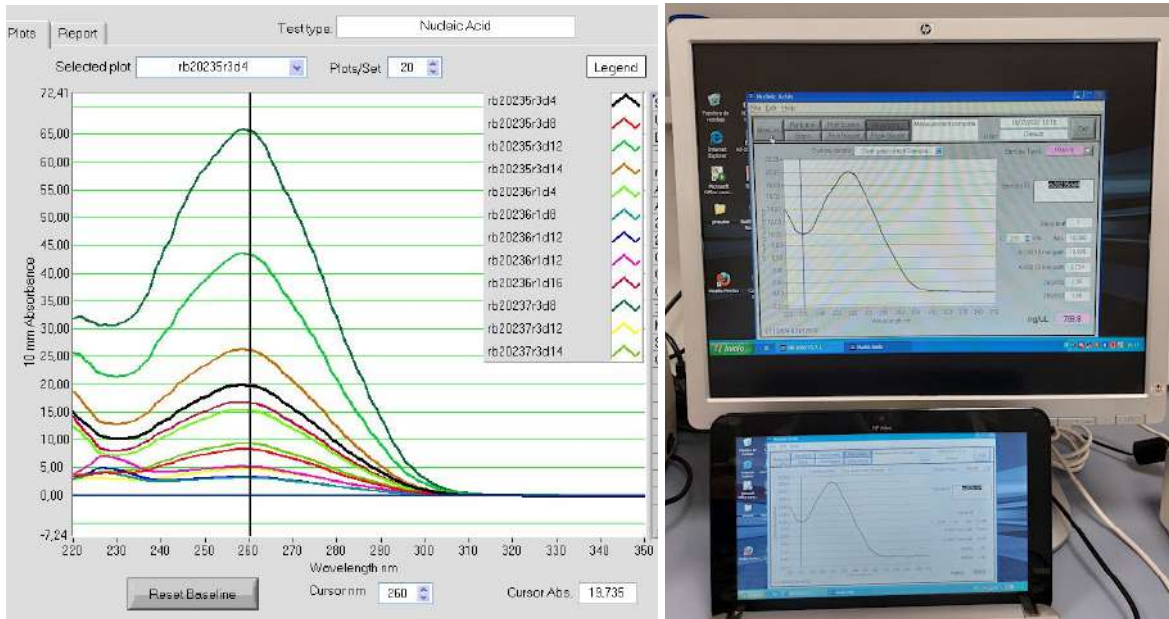


Figura 29. Exemple de gràfic espectroscòpic per la quantificació d'ARN.
 Font: Elaboració pròpia.

Mostra	ng/uL concentració	Abs $\lambda=260\text{nm}$	Abs $\lambda=280\text{nm}$
35 D4 R3	790,78	19,769	9,554
35 D8 R3	329,8	8,246	4,014
35 D12 R3	1733	43,326	21,032
35 D14 R3	1043,5	26,087	12,425
36 D4 R1	608,7	15,218	7,255
36 D8 R1	124,3	3,108	1,538
36 D12 R1	205,3	3,302	1,548

36 D16 R1	664,9	5,132	2,464
37 D5 R3	528,2	16,622	7,901
37 D8 R3	2624,1	65,602	32,187
37 D12 R3	190,4	4,76	2,457
37 D14 R3	372,4	9,31	4,603

Taula 19. Relació de les absorbàncies en diferents longituds d'ona i concentració de cada mostra.
Font: Elaboració pròpia

Per mirar la integritat de l'ARN de les mostres cal passar-les pel bioanalyser.

1. Diluir les mostres amb H₂O RNase free a una concentració aproximada a 300 ng/μL per poder-les passar pel Bioanalyser. Prèviament, calcular les dilucions, en aquest cas de manera aproximada, i el volum necessari d'H₂O (taula 19).

Concentracions				
Mostra	concentració (ng/μL)	dilució	Volum H ₂ O (μL)	concentració obtinguda (ng/μL)
35 D4 R3	790,78	1:2	22,6	376,9
35 D8 R3	329,8			
35 D12 R3	1733	1:5	96,8	268,6
35 D14 R3	1043,5	1:3	38,8	368,9
36 D4 R1	608,7	1:2	23,4	289
36 D8 R1	124,3			
36 D12 R1	205,3			
36 D16 R1	664,9	1:2	21,6	332,4
37 D5 R3	528,2	1:1,78	20,18	153,1
37 D8 R3	2624,1	1:8	169,4	205,6
37 D12 R3	190,4			
37 D14 R3	372,4			

Taula 20. Concentracions inicials de les mostres i la dilució necessària per obtenir una concentració aproximada de 300 ng/μL, juntament amb el volum de dissolvent i la concentració resultant.
Font: Elaboració pròpia

2. Afegir 1μL de mostra i 1 μL d'H₂O i escalfar-la per desnaturalitzar la proteïna durant 2 minuts a 70°C.
3. Preparar el gel-Dye Mix.
 - a. Equilibrar l'RNA dye concentrate a temperatura ambient durant 30 minuts.
 - b. Barrejar la solució amb el *vortex mix* durant 10 segons l'RNA concentrate, centrifugar i afegir 1 μL a 65 μL de gel filtrat.

- c. Barrejar la solució amb el *vòrtex mix* i centrifugar a 13000G durant 10 minuts a temperatura ambient.

4. Carregar el Gel-Dye Mix a la matriu.

- a. Posar el xip d'ARN a la "chip priming station", amb l'objectiu d'escampar la matriu per tot el chip gràcies a la pressió aplicada amb el "plunger".
- b. Pipetejar 9 alíquota de gel dye mix filtrat a D3 , la casella **G** (Taula 20).

Bioanalyser: matriu				
	A	B	C	D
1	1	2	3	G
2	4	5	6	G
3	7	8	9	G
4	10	11	12	ladder

Taula 21. Esquema de la matriu del bioanalyser i nomenclatura de cada casella.
 Font: Elaboració pròpia

- c. Posar el plunger en posició 1 mL i tancar la "chip priming station". Seguidament prémer, és a dir baixar, el "plunger" fins que s'aguanti amb el clip i esperar 30 segons per deixar-lo anar (Figura 26).



Figura 30. Chip priming station
 Font: Elaboració pròpia

- d. Esperar 5 segons i tornar a posar el "plunger" a la posició inicial, 1 mL.
- e. Pipetejar 9 µL de dye-gel mix a D1 i D2, caselles G de la matriu (indicades a la taula 20).

5. Carregar 5 µL d'RNA marker a totes les caselles de la matriu excepte a D1, D2 i D3, caselles G, G i **G** (indicades a la Taula 20).

6. Carregar 1 µL de cada mostra a la casella corresponent de la matriu (Figura 27).



Figura 31. Càrrega de mostres a la matriu (RNA nano Chip) del Bioanalyser amb una micropipeta.
Font: Elaboració pròpia

7. Pipetejar 1 µL de ladder, que es manté congelat fins a l'últim moment, a D4.

8. Barrejar el chip un minut a 2400 rpm amb l'IKA vòrtex.

9. Posar el chip al Bioanalyser (Agilent 2100) per analitzar la integritat de la mostra.

Els resultats del Bioanalyser sobre la qualitat de les mostres són els següents (Taula 21). Quan el RIN és major de 7 la mostra és correcta, però quan és menor o surt N/A vol dir que no és de bona qualitat. Ja pot ser per sobresaturació de la mostra o per falta d'ARN. En l'annex 5 es poden veure uns gràfics més extensos que indiquen la qualitat de les mostres.

Sample	Result label: RIN
35 D4 R3	9,7
35 D8 R3	9,4
35 D12 R3	9,5
35 D14 R3	8,8
36 D4 R1	9,5
36 D8 R1	8,4
36 D12 R1	N/A
36 D16 R1	8,2
37 D5 R3	7,7
37 D8 R3	9,5
37 D12 R3	N/A
37 D14 R3	8,6

*Taula 22. Resultats bioanalyser indicant la qualitat de la mostra a través del RIN.
Font: Elaboració pròpia*

4.3. Retrotranscripció

Abans de realitzar la quantificació és qPCR és necessari fer la retrotranscripció²⁶ d'ARN a cDNA (ADN complementari). Per realitzar aquest procés seguint els següents passos:

1. Calcular la quantitat de mostra d'ARN (que farem x2) i H₂O RNase free que necessitem pel gDNA wipeout buffer, substància que evitarà que quedin restes d'ADN en la mostra (Taula 22)

²⁶Procés cel·lular pel qual un enzim, anomenat retrotranscriptassa que es troba als retrovirus, fa una còpia d'ADN de l'ARN.

Mostra	Concentració (ng/μL)	gDNA wipeout buffer		
		Volum mostra (μL)	x2	Volum H ₂ O (μL)
35 D4 R3	376,9	1,33	2,65	9,35
35 D8 R3	329,8	1,52	3,03	8,97
35 D12 R3	268,6	1,86	3,72	8,28
35 D14 R3	368,9	1,36	2,71	9,29
36 D4 R1	289	1,73	3,46	8,54
36 D8 R1	124,3	4,02	8,05	3,95
36 D12 R1	205,3	2,44	4,87	7,13
36 D16 R1	332,4	1,50	3,01	8,99
37 D5 R3	205,6	2,43	4,86	7,14
37 D8 R3	153,1	3,27	6,53	5,47
37 D12 R3	190,4	2,63	5,25	6,75
37 D14 R3	372,4	1,34	2,69	9,31

Taula 23. Volums de mostra i H₂O utilitzats per preparar les mostres per realitzar el gDNA wipeout Buffer.

Font: Elaboració pròpia

- Preparar el gDNA Wipeout Buffer directament a una placa de 96 pous. Seguint una proporció de 2μL de Buffer i 12μL de mostra de concentració 500 ng/μL i H₂O. El volum total ha de ser de 14 μL.
- Incubar 2 minuts a 42 °C la placa al termociclador, posar una tapa especial a sobre la placa per evitar que la mostra s'evapori quan s'està incubant. Un cop acabat el temps refredar la placa en gel.
- Preparar RT Master Mix per 12 mostres, més una altra per fer-ne excés, amb la proporció següent. Quantiscript Revers Transcriptase: 1, Quantiscript RT Buffer: 4, RT Primer Mix: 1
- Afegir 6μL de Master Mix a cada pou i després passar pel vòrtex i la centrifugadora, es col·loca un plàstic per sobre per evitar que surti la mostra.



Figura 32. Centrifugadora per plaques utilitzada en el procés de retrotranscripció
Font: Elaboració pròpia

6. Tornar a posar la placa al termociclador amb el programa quantitect rt (42°C durant 15 minuts i després 3 minuts a 95°C).
7. Diluir cada mostra amb 20µL de H₂O per obtenir el volum i concentració adequats per treballar
8. Recollir mostres en eppendorfs d'1,5 ml i guardar-les a -20°C O/N.

4.4. qPCR

4.4.1. Tècnica

La PCR quantitativa a temps real (qPCR) és un mètode estàndard per detectar i quantificar una seqüència diana concreta o bé quantificar els nivells d'expressió gènica en una mostra. En aquesta tècnica s'utilitzen molècules reporter fosforescents que permeten la quantificació del producte amplificat. Igual que en la PCR convencional, on s'amplifica l'ADN, el cDNA, però la diferència és que a cada cicle tèrmic es controlen els senyals fosforescents per una quantificació absoluta o relativa. Llavors, els instruments de qPCR mesuren l'acumulació del senyal fosforescent durant la fase exponencial de la reacció per aconseguir una quantificació més precisa i ràpida.

D'aquesta manera, combinant l'amplificació i la detecció en un pas, s'evita detectar els productes mitjançant l'electroforesi en gel i s'assoleix una tècnica realment quantitativa. Això fa que aquest mètode s'utilitzi en moltes àrees de la investigació,

com poden ser l'anàlisi de l'expressió gènica, el genotipat, l'anàlisi de microARN, l'anàlisi de variació genètica i l'anàlisi de proteïnes.

La qPCR està basada en la detecció del producte que es vol amplificar mitjançant sondes fosforescents. La fosforescència s'obté mitjançant dyes²⁷ que s'afegeixen a la reacció i dels quals es mesura la fosforescència en cada cicle de la qPCR. Com que la seva fosforescència augmenta en presència d'ADN, es pot detectar la síntesi d'ADN amb l'augment del senyal. A més, també té l'avantatge de detectar específicament la seqüència diana i reduir la possibilitat de detectar materials inespecífics.

El resultat de l'experiment amb qPCR és la corba d'amplificació, que mostra l'acumulació de producte amplificat en forma de senyal respecte al nombre de cicles. Seguidament, es realitza la quantificació del material amb el cicle de quantificació (Cq), a través d'una quantificació relativa o absoluta, segons que s'estigui analitzant.

4.4.2. Procediment

Un cop acabada la retrotranscripció, es quantifica el cDNA retrotranscrit mitjançant una qPCR amb la sonda Taqman²⁸.

1. Preparar la primera preparació per 55 pous amb 275µL de Mix 2x, 27,5µL de Tm assay 20x i 192,5µL d'H₂O (Taula 23). Tot i que només s'han d'emplenar 48, es fa molt excès perquè com que en la qPCR es treballa amb volums molt petits és fàcil perdre'n durant el pipetatge.

Preparació per la qPCR			
	1w	3,5 w	55 w
Mix 2X	5	17,5	275
Tm assay 20X	0,5	1,75	27,5
H2O	3,5	12,25	192,5
cDNA	1	3,5	55

²⁷ El dye, colorant, s'utilitza per controlar l'amplificació de qualsevol seqüència d'ADN i dispensa l'ús d'una sonda, reduint així el cost de l'amplificació i aportant un gran avantatge en la seva aplicació.

²⁸ Una sonda d'hidròlisis dissenyada per incrementar l'especificitat de la PCR quantitativa

Taula 24. Volums de la preparació per la qPCR amb Taqman i retrotranscripció prèvia per un pou, per un triplicat amb excés i per 55 pous.

Font: Elaboració pròpia.

2. Posar a solució en 4 tubs d'1,5 ml, diferenciats segons la Tm assay que s'utilitza, ja que cada gen utilitza una sonda diferent. Aquestes sondes funcionen amb fosforescència per detectar el gen al qual s'adhereixen, per això es mantenen en paper d'alumini (per on no passa la llum) evitant així que es degradin amb llum exterior. Els gens que es detectaran seran el *TNNT2* (Troponina T), *SCN1B* (subunitat- β 1), *SCN5A* (canal de sodi) i PPIA (gen housekeeping).
3. Preparar una placa de 96 pous amb la preparació anterior i afegir-hi 3,5 μ L de cDNA per pou, ja dins la mateixa placa. En aquesta placa es posen els triplicats de cada mostra tots junts en un sol pou. Aquesta placa i la següent s'emplenen amb una micropipeta automàtica, que agilitza la feina de carregar la placa, es pot veure com s'organitza la taula a l'annex 6.
4. Emplenar la placa de 384 pous (figura 33), l'organització es troba a l'annex 6, a partir de la placa anterior, aquest cop se separen els triplicats, és a dir s'agafa el volum pels triplicats d'una mostra de la placa de 384 d'un sol pou de la placa de 96. Afegir 10 μ L de la preparació a cada pou.

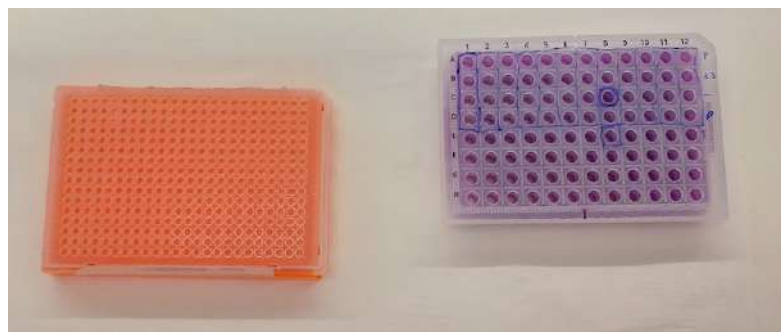


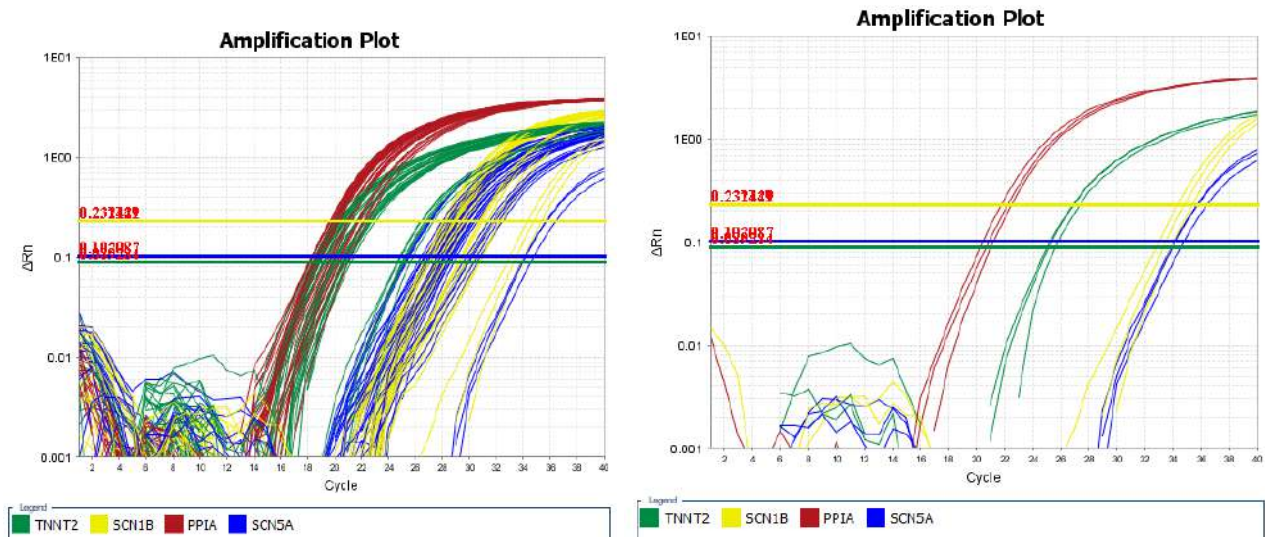
Figura 33. Placa de 384 pous (esquerra) i placa de 96 pous (dreta) utilitzades per la qPCR
Font: Elaboració pròpia

5. S'introdueix la placa de 384 pous al termociclador en un programa de 45 minuts. El programa consisteix en una etapa "Hold Stage" i una altra de "PCR Stage" que és més curta, però se'n fan més cicles.

4.5. Resultats

4.5.1. Obtenció dels resultats

Un cop obtinguts els resultats de la qPCR, es van tractar les dades amb el programa QuantStudi Real-Time PCR, que retornava els resultats en forma gràfica d'amplificació (gràfic 14).



Gràfic 14. Gràfic d'amplificació segons el gen analitzat, de totes les mostres (dreta) i de mostra 35 d4 (esquerra)

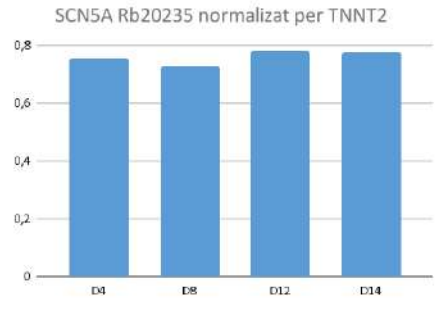
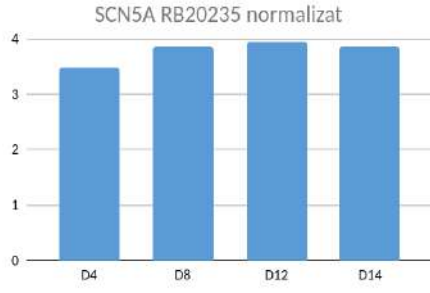
Font: Elaboració pròpia

Es van eliminar les dades dels pous que sortien desviats, cosa que mostrava directament al programa, i es van tractar les dades per formar les taules que es poden trobar a l'annex 3 on s'analitzen els resultats. A través d'aquestes taules més àmplies, es van normalitzar els resultats i es van obtenir les taules i gràfiques del següent apartat.

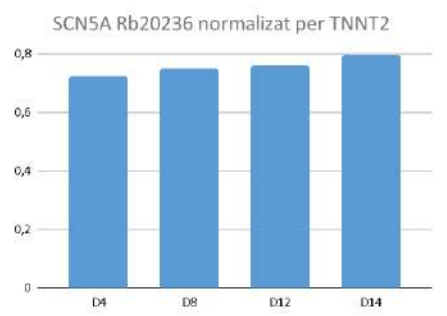
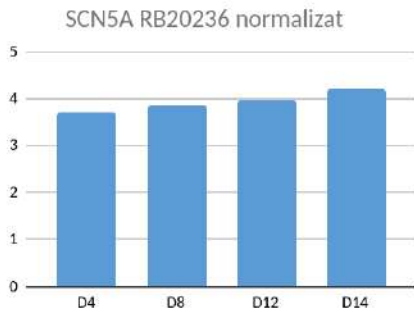
4.5.2. Anàlisi dels resultats

Els resultats obtinguts es van normalitzar utilitzant el gen *housekeeping* i el *TNNT2*, el qual és un indicador de cardiomiòcits. En la taula 25 es pot observar l'evolució de l'expressió de *SCN5A* i seguidament l'explicació dels resultats.

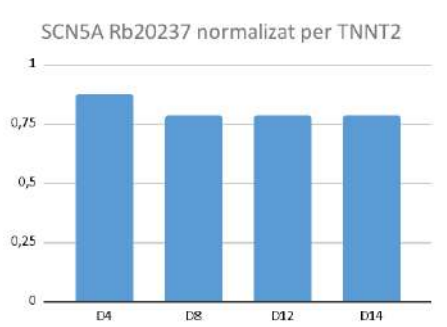
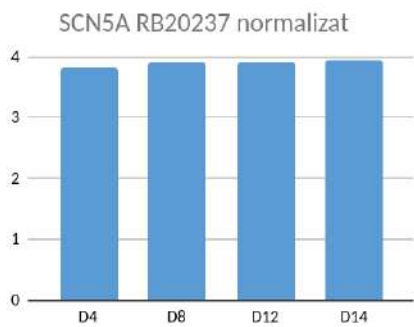
Anàlisi del gen SCN5A			
Pacient	Dia	Normalitzat x10	Normalitzat per TNNT2
Rb20235	D4	3,50	0,76
	D8	3,85	0,73
	D12	3,94	0,78
	D14	3,85	0,78
Rb20236	D4	3,72	0,73
	D8	3,87	0,75
	D12	3,97	0,76
	D16	4,21	0,80
Rb20237	D5	3,82	0,88
	D8	3,92	0,78
	D12	3,92	0,78
	D14	3,96	0,79



Gràfic 14. Evolució SCN5A normalitzat en el pacient Rb20235.
Font: Elaboració pròpia.



Gràfic 15. Evolució SCN5A normalitzat en el pacient Rb20236
Font: Elaboració pròpia.



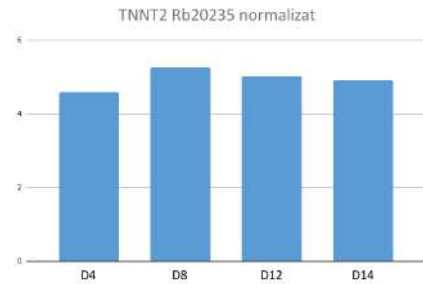
Gràfic 16. Evolució SCN5A normalitzat en el pacient Rb20237.
Font: Elaboració pròpia.

Taula. 25. Evolució SCN5A normalitzat en el pacient 35, 36 i 37.
Font: Elaboració pròpia.

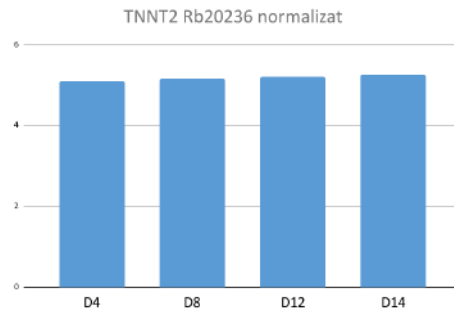
Els resultats obtinguts pel gen SCN5A en el pacient 35, portador de SNV i afectat per la síndrome, varien si es normalitzen o no per TNNT2, que funciona com a indicador de cardiomiòcits igual que la seva proteïna (Troponina T). En el primer cas l'expressió del gen augmenta fins a patir una lleugera baixada el dia 14 i pel que fa a

la normalització amb *TNNT2* és més irregular, ja que tot i disminuir del dia 4 al 8 el 12 torna a augmentar i es manté. Pel que fa al pacient 36, portador de SNV, però no afectat per la síndrome, les dues normalitzacions mostren un augment de l'expressió del gen del canal de sodi. Finalment, el pacient 37, ni portador ni afectat, mostra resultats contraris entre les dues normalitzacions, ja que mentre que la normalització sola augmenta, amb estabilitat entre dia 8 i 12, la normalització per *TNNT2* mostra una disminució de l'expressió de *SCN5A*, amb estabilitat entre dia 8 i 12. En general les variacions entre dia i dia de l'expressió del gen són molt petites en comparació amb gens que es veuen en les taules posteriors.

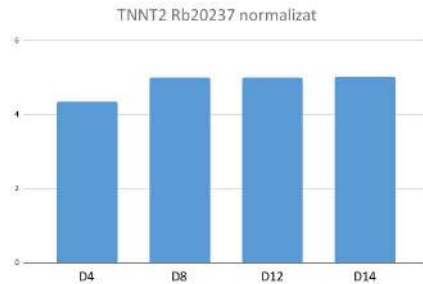
Anàlisi del gen <i>TNNT2</i>		
Pacient	Dia	Normalitzat x10
Rb20235	D4	4,60
	D8	5,28
	D12	5,02
	D14	4,93
Rb20236	D4	5,11
	D8	5,14
	D12	5,21
	D16	5,26
Rb20237	D5	4,37
	D8	5,00
	D12	5,00
	D14	5,03



Gràfic 17. Evolució *TNNT2* normalitzat en el pacient Rb20235.



Gràfic 18. Evolució *TNNT2* normalitzat en el pacient Rb20236.



Gràfic 19. Evolució *TNNT2* normalitzat en el pacient Rb20237.

Taula. 26. Evolució *TNNT2* normalitzat en pacients 35, 36 i 37.
Font: Elaboració pròpia.

Segons els resultats de l'expressió del gen *TNNT2* els tres pacients mostren una tendència creixent, el pacient 36, portador i no afectat, n'és un clar exemple. Pel que fa al pacient 35, portador i afectat, tot i augmentar en expressió de *TNNT2* en els tres primers punts temporals, el catorzè dia presenta una lleugera disminució. En últim lloc, el pacient 37, ni portador ni afectat, mostra una tendència a augmentar l'expressió del gen, però en l'últim punt temporal es manté estable.

Anàlisi del gen <i>SCN1B</i>			
Patient	Day	Normalized x10	Normalized to <i>TNNT2</i>
Rb20235	D4	3,42	0,74
	D8	3,49	0,66
	D12	3,69	0,73
	D14	3,64	0,74
<p>Gràfic 20. Evolució <i>SCN1B</i> normalitzat en el pacient Rb20235.</p>			
Rb20236	D4	3,59	0,70
	D8	3,57	0,69
	D12	3,67	0,70
	D16	3,66	0,70
<p>Gràfic 21. Evolució <i>SCN1B</i> normalitzat en el pacient Rb20236.</p>			
Rb20237	D5	3,75	0,86
	D8	3,58	0,72
	D12	3,73	0,75
	D14	3,66	0,73
<p>Gràfic 22. Evolució <i>SCN1B</i> normalitzat en el pacient Rb20237.</p>			

Taula. 27. Evolució *SCN1B* normalitzat en pacient 35, 36 i 37.
 Font: Elaboració pròpia.

L'últim gen analitzat és el *SCN1B*, una subunitat beta del canal de sodi, per la qual s'espera una tendència d'expressió semblant al *SCN5A*. Aquest fet es compleix en

el pacient 35 (portador i afectat), en el qual la normalització mostra un augment d'expressió amb el temps, fins al dia 14 on l'expressió baixa, mentre que la normalització per *TNNT2* comença disminuint, però augmenta fins a estabilitzar-se en els dos últims punts temporals. Tant en el pacient 36 com el 37 la tendència d'expressió de *SCN1B* varia respecte a la de *SNC5A*. Pel pacient 36, portador no afectat, les variacions entre punts temporals són tan mínimes que es podria considerar que l'expressió és estable. Finalment, l'expressió del gen del pacient 37 mostra una tendència a disminuir al dia 8, augmentar en el 12 per després tornar a disminuir en l'últim punt temporal.

5. CONCLUSIONS PART PRÀCTICA

Després d'haver dut a terme la recerca d'aquesta part pràctica s'ha determinat que els resultats no són concloents, tot i això, aquest estudi preliminar ha permès provar la viabilitat de l'experimentació. En conseqüència també s'ha observat que aquest és un tema prou interessant per fer-ne una investigació amb els recursos, temps i coneixements necessaris. Durant la realització de l'experimentació es van observar certes tendències que van fer plantejar als investigadors del centre realitzar aquest estudi de manera més exhaustiva.

El fet de no haver realitzat prou rèpliques impossibilita la comparació correcta dels resultats, però sí que s'han pogut analitzar les tendències de cada mostra individualment. En alguns casos es mostren semblances pel que fa a la tendència d'expressió que podrien indicar com és realment l'expressió del canal de sodi en aquells casos, tanmateix, s'hauria de confirmar repetint el protocol amb més mostres. És per això que seria interessant realitzar una investigació a partir d'aquest estudi preliminar.

Els resultats preliminars obtinguts mostren pocs patrons repetits, però se'n poden fer unes primeres observacions. En el pacient 36 es pot veure que tant en la proteïna com en el gen del canal de sodi, quan es normalitza per l'indicador de cardiomiòcits, hi ha un augment de l'expressió del canal. En el pacient 37 es pot observar una tendència creixent en els indicadors de cardiomiòcits amb el pas del temps, tanmateix, no es mostra el mateix patró en l'expressió del canal de sodi, ni en proteïnes ni gens. Per tant, no hi ha un augment en l'expressió del canal. Pel que fa al pacient 35 els resultats són molt irregulars, per la qual cosa no es pot observar cap patró. Aquests resultats podrien indicar que els pacients que no presenten ni la mutació del gen SCN5A ni la síndrome de Brugada, com el 37, mostra una expressió constant del canal de sodi. Mentre que en els pacients portadors de la malaltia, com el 36, s'analitzaria un increment de l'expressió del canal durant el desenvolupament del cor. Pel que fa als pacients amb la malaltia i la mutació, com el 35, podria ser semblant al cas dels portadors, tanmateix, no s'han recollit prou dades per confirmar-ho.

CONCLUSIÓ

Al llarg del treball s'ha esmentat que el projecte, consisteix en un estudi preliminar, per tant, el seu objectiu no és extreure'n uns resultats concloents, sino comprovar la viabilitat de l'experiment per plantejar, en un futur, una experimentació exhaustiva amb més rèpliques i mostres. El projecte serveix per provar el disseny d'un posterior estudi, alhora que s'observen les limitacions de la recerca. En aquest treball no es van dur a terme rèpliques biològiques, les quals són rèpliques de l'experiment amb una mostra diferent del mateix pacient, per la qual cosa no podem considerar que els resultats siguin del tot fiables. Fent rèpliques biològiques es pot observar la variabilitat de les condicions experimentals controlades, la variabilitat de factors no controlats i l'heterogeneïtat de la mostra. En el cas dels cardiomiòcits derivats d'iPSC són molt heterogenis, cosa que rebaixa la fiabilitat de l'experiment i força als investigadors a fer més repeticions per comprovar les seves hipòtesis. El que sí que es va fer en aquest estudi van ser rèpliques tècniques, que bàsicament consisteixen a repetir el mateix procés amb la mateixa mostra per analitzar si hi ha hagut algun error quant a la utilització del material. Les rèpliques s'utilitzen bàsicament per analitzar si hi ha variacions en l'experimentació, ja siguin degudes a diferències en la mateixa mostra o el seguiment del protocol.

La hipòtesi que es va plantejar en aquest estudi era: "L'expressió del canal de sodi està afectada per les variants genètiques relacionades amb la síndrome de Brugada". En l'experimentació feta s'han obtingut dades que indicarien que el curs temporal de l'expressió del canal de sodi, voltatge-dependent de $Na_v1.5$, difereix en cèl·lules obtingudes de mostres de pacients que expressen una variant genètica. Aquests són resultats preliminars que s'haurien de comprovar en un estudi més ampli. De manera que s'han complert els objectius experimentals inicials que proposaven analitzar el curs temporal de l'expressió del canal de sodi durant la diferenciació de cardiomiòcits a partir d'iPSC i comparar aquests entre els diferents pacients estudiats i amb l'evolució de l'expressió de la subunitat β_1 del canal de sodi i amb el marcador de cardiomiòcits troponina T.

Pel que fa als propòsits marcats al principi del projecte, he adquirit coneixements teòrics i pràctics sobre les cèl·lules mare, les iPSC, les malalties cardíaques (síndrome de Brugada), els canals iònics, la detecció de proteïnes per Western Blot i la detecció d'ARN per qPCR. Així com he pogut comprendre i sintetitzar articles científics, a l'hora que après a realitzar i redactar una investigació científica. A més, l'elaboració d'aquest treball m'ha permès adquirir maduresa en la meva escriptura i viure experiències que no hagués tingut, com investigar en un laboratori.

A més, al principi d'aquest treball em vaig marcar una sèrie d'objectius en l'àmbit personal. En el transcurs d'aquest treball he pogut complir cadascun dels propòsits, fins i tot superant les meves expectatives. Quan vaig començar el treball tenia diverses opcions sobre que volia fer en un futur, però en aquests mesos, i majoritàriament gràcies a la feina feta en aquest projecte. Ara estic bastant segura de quin camí vull seguir un cop acabi el Batxillerat, que és introduir-me en el món de les ciències biomèdiques.

Durant la redacció del TDR vaig trobar-me amb certes limitacions, ja que la informació que trobava respecte al tema era escassa o difícil d'entendre. Gràcies a l'ajuda de professors i el temps invertit he pogut traspasar aquestes dificultats i elaborar un treball més complet del que m'imaginava en un principi. Pel que fa a la part pràctica les limitacions es centraven més en una qüestió de temps i coneixements, per això no s'han pogut fer totes les comprovacions i rèpliques corresponents. Com també és possible que alguns dels resultats es vegin lleugerament alterats per possibles errors tècnics, ja que eren procediments que no havia realitzat amb anterioritat.

Cal destacar que aquest projecte té una gran perspectiva de futur, ja que en tractar-se d'un tema tan ampli es podria continuar la investigació en un proper projecte com el TFG. De fet, en el mateix grup de recerca on vaig fer les pràctiques hi havia persones elaborant investigacions semblants però a més gran escala. Per altra banda, les iPSC i la Síndrome de Brugada són àrees plenes d'incògnites que en un futur, gràcies a la recerca, es podran anar resolvent. Per tant, és un treball que es podria anar actualitzant i ampliant amb el pas del temps i a l'hora que adquireixo més coneixements en el camp biomèdic.

En conclusió, la recerca bàsica ens permet avançar en el coneixement i tractament de les malalties a través de diferents mètodes. Actualment, una de les eines amb més potencial són les cèl·lules mare pluripotents induïdes les quals representen la base pel futur de la recerca bàsica.

WEBGRAFÍA

A. Lanctot (2011) *Induced pluripotent stem cells: the future of tissue generation*
<https://hopes.stanford.edu/induced-pluripotent-stem-cells-the-future-of-tissue-generation/#amounts-and-timing-of-reprogramming-factors>

Bayart, E. i Cohen-Haguenauer, O. (2013) *Technological Overview of iPS Induction from Human Adult Somatic Cells*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3788326/>

Bioeticaweb. (2013, abril 13). *Células madre y bioética*. Bioética en la Red: Principios de la bioética y otras cuestiones.
<https://www.bioeticaweb.com/caclulas-madre-y-bioactica/>

Bloc Xtec. (s.d). *La cèl·lula*. Recuperat el 30 de maig de:
<https://blocs.xtec.cat/adultspremi/files/2012/10/2.01.Lac%c3%a8l%c2%b7lula.pdf>

Castro, R. (2019). *Células madre pluripotentes inducidas: generación, caracterización y aplicaciones en el estudio y tratamiento de la artrosis*. (Tesis doctoral). Universitat da Coruña, Galicia.
file:///home/chronos/u-4e8553776bc89f6bdc5a37e960e8e17c043fdb0/MyFiles/Downloads/CastroVinuelas_Rocio_TD_2019.pdf

Células madre hematopoyéticas. (s/d). Mhmedical.com.
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1717§ionid=114913617>

Células madre: qué son y qué hacen. (2022, mayo 18). Mayo Clinic.
<https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/bone-marrow-transplant/in-depth/stem-cells/art-20048117>

Chaparro, O. i Beltrán, O. (2009). *Reprogramación nuclear y células pluripotentes inducidas*
<http://www.scielo.org.co/pdf/med/v17n2/v17n2a09.pdf>

Clonatge i cèl·lules mare. (s/d). La genètica a l'abast de tothom, Genètica, herència, malformacions congènites, malalties hereditàries, malalties mendelianes, gens.
<https://lagenetica.info/ca/genetica-present-i-futur/clonatge-i-cel%C2%B7lules-mare/>

Diseño de experimentos para el análisis de expresión — BioMur modulo3 v1.1 documentation. (s/f). de
http://personales.upv.es/jcanizar/modulo_3/disenio_2.html

Figueruela, M. (2021, septiembre 28). *Células madre pluripotenciales inducidas (iPSCs) usando bioimpresión*. Regemat3D.
<https://www.regemat3d.com/celulas-madre-pluripotentes-inducidas>

Garzón-Perdomo, D.K., De los Reyes, L.M., Turner, F.T. (2017) *Metodologías utilizadas en la diferenciación de células madre mesenquimales a linaje neuronal*.
<http://www.scielo.org.co/pdf/anco/v33n4/0120-8748-anco-33-04-00299.pdf>

Hernandez, A. (2011, desembre). *Aspectos bioéticos en los tratamientos con células madre*

https://www.researchgate.net/publication/260770347_Aspectos_bioeticos_en_los_tratamientos_con_celulas_madre

Induced pluripotent stem cells (iPS). (s/f). Ucla.edu. Recuperado el 8 de octubre de 2022, de

<https://stemcell.ucla.edu/induced-pluripotent-stem-cells>

La cèl·lula eucariota. (s/d). Tinet.cat. Recuperat el 29 de maig de 2022, de

https://usuaris.tinet.cat/e3008390/estudicelula/la_cllula_eucariota.html

Martinez, R. (2021). *Effect of sodium channel SNVs associated to arrhythmogenic diseases. Modulatory role of the genetic background*. (Tesis doctoral). Universitat de Girona, Catalunya.

<file:///home/chronos/u-4e8553776bc89f6bdc5a37e960e8e17c043fdb0c0/MyFiles/Downloads/Tesis%20completa%20Rebecca%20Mart%C3%ADnez.pdf>

Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G. J., & Sánchez-Monroy, V. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-53372013000300009

Medline Plus. (s.d.). *Trasplante de médula ósea*. Recuperat 25 d'agost de:

<https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003009.htm>

Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. Á. (s/d). *Tipos celulares. Cardiomiocito. Atlas de Histología Vegetal y Animal*. Uvigo.es. Recuperat el 8 de setembre de 2022, de

<https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/cardiomiocito.php>

Merck. (2022). *PCR quantitativa (qPCR)*. Recuperat el 5 d'agost de:

<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/applications/genomics/qpcr>

¿Para qué sirve la médula ósea? (s/d). Fundación Josep Carreras contra la Leucemia. Recuperat el 4 de juny de 2022, de

https://www.fcarreras.org/es/para-que-sirve-la-medula-osea_55013

Pérez de Prada, M.T. (s.d.). *Las células madre o progenitoras*

https://www.fbbva.es/microsites/salud_cardio/mult/fbbva_libroCorazon_cap35.pdf

Preguntas Frecuentes. (s/d). Centro Médico Teknon. Recuperat el 3 de juliol de 2022, de

<https://www.teknon.es/es/preguntas-frecuentes>

Proyecto ITACA. (s/d). *Canales de sodio*. Edu.es. Recuperat 8 de juliol de 2022, de

<https://www.itaca.edu.es/canales-sodio.ht>

Proyecto ITACA. (s/d). *Potencia de acción cardíaco.* Edu.es. Recuperat el 8 de juliol de 2022, de <https://www.itaca.edu.es/potencial-accion-cardiaco.htm>

Què són les cèl·lules mare? Stem cells in Catalan. (2014, marzo 28). The Niche; The Niche stem cell blog. <https://ipsell.com/que-son-les-cel%C2%B7lules-mare/>

R. M. G. (coordinador del Á. (2021, agosto 11). *Células madre pluripotentes inducidas: ¿Qué son?* Genotipia. <https://genotipia.com/ipses/>

Terapias regenerativas con células madre pluripotentes inducidas. (2022, marzo 16). Secuvita - Vita 34. <https://secuvita.es/terapias-regenerativas-celulas-madre-pluripotentes-inducidas/>

The Texas Heart Institute (s.d.) *Anatomía del corazón.* Recuperat el 3 de juliol de 2022 <https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/anatomia-del-corazon/>

Torrealba, C. (2019, juny 18). *Introducción a Western Blot.* E-allscience <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/introduccion-a-western-blot>

Types of Stem Cells. (2018, octubre 17). A Closer Look at Stem Cells. <https://www.closerlookatstemcells.org/learn-about-stem-cells/types-of-stem-cells/>

Universitat Autònoma de Barcelona. (s/d). *Inducció de cèl·lules mare pluripotents: novetats en medicina regenerativa.* UABDivulga Barcelona Recerca i Innovació. Recuperat el 8 de d'agost de 2022, de <https://www.uab.cat/web/detall-de-noticia/induccio-de-cel-lules-mare-pluripotents-nov-etats-en-medicina-regenerativa-1345469002000.html?noticiaid=1345854825813>






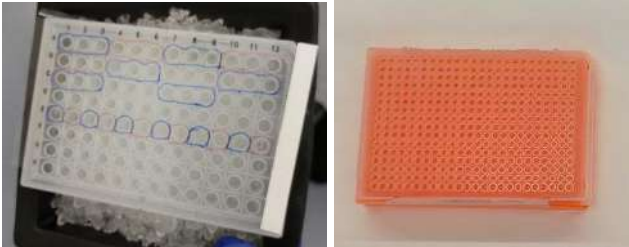
University of Nebraska Medical Center (2020). *Pros and Cons* <https://www.unmc.edu/stemcells/educational-resources/prosandcons.html>







Western Blot. (2022, julio 10). Unilabs.es; Unilabs. <https://www.unilabs.es/glosario/western-blot>

ANNEXES

Annex 1

El material utilitzat durant l'experimentació es troba ordenat alfabèticament a continuació:

<p>Centrífuga: posa en rotació una mostra per separar mitjançant la força centrífuga els seus components o per baixar tot el líquid a la punta del microtub</p>	
<p>Eppendorfs: tubs de mida petita utilitzats per emmagatzemar substàncies, per centrifugar mostres o per preparar mostres senzilles</p>	
<p>Escalfador de bloc: permet escalfar a una temperatura determinada tubs de diferents mides</p>	
<p>Gradeta per eppendorfs: serveix per emmagatzemar els eppendorfs en posició vertical</p>	
<p>Micropipetes: instrument emparat per absorbir i transferir petits volums de líquid</p>	
<p>Plaques de 96 pous i 384 pous: plaques per posar les mostres a analitzar en aparells com el termociclador o a incubar</p>	

<p>Plat calentador: serveix per calentar i barrejar mostres emmagatzemades en tubs.</p>	
<p>Scraper: Estan dissenyats específicament per recollir fàcilment cèl·lules adherides en flascons, plaques de Petri i rodets. Eviten l'ús de tripsina que pot alterar les proteïnes superficials.</p>	
<p>Shaker: agitador que serveix per barrejar les mostres d'un tub</p>	
<p>Sonicador: aplicació d'ultrasons per agitar partícules d'una mostra</p>	
<p>Termociclador: aparell utilitzat per fer la qPCR que permet realitzar cicles de temperatura per l'amplificació de l'ADN</p>	
<p>Vortex: agitador que s'utilitza per barrejar volums petits de líquid</p>	

Annex 2

Composició de preparacions utilitzades durant la part experimental, les qual havien de preparar o ja hi havia preparacions emmagatzemades.

Cell Lysis Buffer		
Components	Volum final = 50mL	Concentració final
0,25M Tris-HCl pH 6.8	10 mL	0,05 M
Glicerol 100%	5 mL	10%
10% SDS	10 mL	2%
Aigua mQ	25 mL	-

Electrolyte Buffer			
10x			Concentració Final a 1X
Components	1L	2L	
0,25M Trizima	30,27 g	60,54 g	25 mM
1,92 M Glicina	144,13 g	288,26 g	192 mM
1% SDS	10 g	20 g	0,10%

Transfer Buffer			
10 x			Concentració Final a 1x
Components	1L	2L	
0,25M Trizima	30,27 g	60,54 g	25 mM
1,92 M Glicina	144,13 g	288,26 g	192 mM
Metanol	-	-	20%

DPBS			
10x			Concentració Final a 1X
Components	1L	2L	
26,8 mM KCl	2 g	4 g	2,68 mM
14,7 mM KH ₂ PO ₄	3 g	5 g	1,47 mM
1,37 M NaCl	80 g	160 g	137 mM
0,8M Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	21,45 g	42,9 g	80 mM

PBST	
Components	Volum
PBS- 1x	1L
Tween-20	1 mL

Annex 3

Anàlisi dels gens *TNNT2*, *SCN1B* i *SCN5A* amb les taules de resultats completes.

Evolució del gen <i>TNNT2</i>						
Patient	Day	Cq	Cq HKG PPIA	Δ Cq	Normalized	x10
Rb20235	D4	25,042	22,363	1,120	0,460	4,60
	D8	18,702	20,310	0,921	0,528	5,28
	D12	19,490	19,617	0,994	0,502	5,02
	D14	20,248	19,859	1,020	0,493	4,93
Rb20236	D4	20,505	21,171	0,969	0,511	5,11
	D8	20,893	21,779	0,959	0,514	5,14
	D12	18,605	19,800	0,940	0,521	5,21
	D16	18,649	20,145	0,926	0,526	5,26
Rb20237	D5	24,717	20,670	1,196	0,437	4,37
	D8	19,955	19,950	1,000	0,500	5,00
	D12	20,998	20,992	1,000	0,500	5,00
	D14	19,914	20,096	0,991	0,503	5,03

Evolució del gen <i>SCN1B</i>									
Patient	Day	Cq	Cq HKG PPIA	Δ Cq	Normali zed	x10	Normalized to TNNT2		x10 TNNT2
Rb20235	D4	34,643	22,363	1,549	0,342	3,42	0,74		4,60
	D8	30,866	20,310	1,520	0,349	3,49	0,66		5,28
	D12	28,225	19,617	1,439	0,369	3,69	0,73		5,02
	D14	28,984	19,859	1,459	0,364	3,64	0,74		4,93
Rb20236	D4	31,249	21,171	1,476	0,359	3,59	0,70		5,11
	D8	32,369	21,779	1,486	0,357	3,57	0,69		5,14
	D12	28,646	19,800	1,447	0,367	3,67	0,70		5,21
	D16	29,221	20,145	1,451	0,366	3,66	0,70		5,26
Rb20237	D5	29,272	20,670	1,416	0,375	3,75	0,86		4,37
	D8	29,565	19,950	1,482	0,358	3,58	0,72		5,00
	D12	29,854	20,992	1,422	0,373	3,73	0,75		5,00
	D14	29,133	20,096	1,450	0,366	3,66	0,73		5,03

Evolució del gen *SCN5A*

Patient	Day	Cq	Cq HKG PPIA	Δ Cq	Normali zed	x10	Normalized to TNNT2		TNNT2 x10
Rb20235	D4	33,909	22,363	1,516	0,350	3,50	0,76		4,60
	D8	27,968	20,310	1,377	0,385	3,85	0,73		5,28
	D12	26,384	19,617	1,345	0,394	3,94	0,78		5,02
	D14	27,353	19,859	1,377	0,385	3,85	0,78		4,93
Rb20236	D4	30,214	21,171	1,427	0,372	3,72	0,73		5,11
	D8	29,824	21,779	1,369	0,387	3,87	0,75		5,14
	D12	26,366	19,800	1,332	0,397	3,97	0,76		5,21
	D16	25,174	20,145	1,250	0,421	4,21	0,80		5,26
Rb20237	D5	28,662	20,670	1,387	0,382	3,82	0,88		4,37
	D8	26,964	19,950	1,352	0,392	3,92	0,78		5,00
	D12	28,356	20,992	1,351	0,392	3,92	0,78		5,00
	D14	26,881	20,096	1,338	0,396	3,96	0,79		5,03

Annex 4

Anàlisi de les proteïnes TT i Na_v1.5 amb les taules de resultats completes separades per pacient.

RB20235 segon Western Blot							
membrana2 35 r3 d4-14							
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador	Volum relatiu
35r3d4	N/A	N/A	79880800	2366087865	2286207065	N/A	1,00
35r3d8	N/A	N/A	100446045	2326368960	2225922915	N/A	1,26
35r3d12	N/A	N/A	88801515	2156853985	2068052470	N/A	1,11
35r3d14	N/A	N/A	70004820	2089542910	2019538090	N/A	0,88
35r3d4	N/A	N/A	61088290	2232804605	2171716315	N/A	0,76
35r3d8	N/A	N/A	98749415	2301572525	2202823110	N/A	1,24
35r3d12	N/A	N/A	149217415	2276229715	2127012300	N/A	1,87
35r3d14	N/A	N/A	135177825	2331231465	2196053640	N/A	1,69

TT membrana2 35 r3 d4-14						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
35r3d4	0	N/A	310153	3646542	3336389	N/A
35r3d8	19744653	23057119	20780063	27598541	6818478	N/A
35r3d12	23099255	27049769	24160262	32225643	8065381	N/A
35r3d14	20604696	24151120	21291872	28540981	7249109	N/A
35r3d4	0	N/A	210513	3570355	3359842	N/A
35r3d8	20859804	23968806	22063762	28551832	6488070	N/A
35r3d12	23414930	26771247	25814468	32816622	7002154	N/A
35r3d14	25901150	30322550	28607400	41592650	12985250	N/A

NAV1.5 membrana2 35 r3 d4-14						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
35r3d4	0	N/A	1418256	6599166	5180910	N/A
35r3d8	8684192	21915300	9378380	28198456	18820076	N/A
35r3d12	9985755	12305043	12962806	21367806	8405000	N/A
35r3d14	7461660	9865482	9441822	18190516	8748694	N/A
35r3d4	0	N/A	340938	6913841	6572903	N/A
35r3d8	7004320	19541640	7446200	26859480	19413280	N/A
35r3d12	6841341	11727612	7695168	20253480	12558312	N/A
35r3d14	9110320	12100480	11187960	21649360	10461400	N/A

RB20235 primer Western Blot

membrana1 35 r3 d4-14						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
35r3d4	N/A	N/A	27602560	1866009984	1838407424	N/A
35r3d8	N/A	N/A	35833728	1812022336	1776188608	N/A
35r3d12	N/A	N/A	42115584	1837917632	1795802048	N/A
35r3d14	N/A	N/A	45754816	1812139776	1766384960	N/A
35r3d4	N/A	N/A	18958848	1707456832	1688497984	N/A
35r3d8	N/A	N/A	24470912	1705820544	1681349632	N/A
35r3d12	N/A	N/A	23858688	1744660608	1720801920	N/A
35r3d14	N/A	N/A	30168000	1823442048	1793274048	N/A

TT membrana1 35 r3 d4-14						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
35r3d4	0	N/A	460080	3591720	3131640	N/A
35r3d8	34379916	39586812	36090405	44849145	8758740	N/A
35r3d12	33768812	39027164	34500928	42286728	7785800	N/A
35r3d14	33369171	39536887	34929279	45398263	10468984	N/A

NAV 1. 5 membrana1 35 r3 d4-14						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
35r3d4	0	N/A	408105	6721155	6313050	N/A
35r3d8	22137120	27133960	23087240	31826080	8738840	N/A
35r3d12	12577725	15867045	15972975	25854345	9881370	N/A
35r3d14	9602736	12371216	11544832	20413796	8868964	N/A
35r3d4	0	N/A	133515	6117345	5983830	N/A
35r3d8	20770256	26536016	22007700	33124208	11116508	N/A
35r3d12	11242575	16464825	13774410	25735815	11961405	N/A
35r3d14	11400120	13829625	15190875	23600700	8409825	N/A

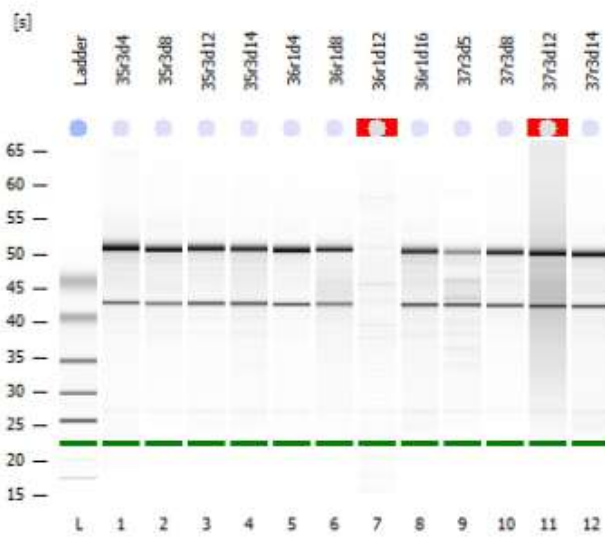
RB20236						
membrana 36 r1 d4-16						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
36r1d4	N/A	N/A	58236084	2204057310	2145821226	N/A
36r1d8	N/A	N/A	41307348	2077957464	2036650116	N/A
36r1d12	N/A	N/A	41526648	2059865112	2018338464	N/A
36r1d16	N/A	N/A	47100336	2052749286	2005648950	N/A
36r1d4	N/A	N/A	36399398	2223105108	2186705710	N/A
36r1d8	N/A	N/A	28823144	2181899189	2153076045	N/A
36r1d12	N/A	N/A	82934659	2279166296	2196231637	N/A
36r1d16	N/A	N/A	105506876	2401005859	2295498983	N/A
NAV 1.5 membrana 36 r1 d4-16						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
36r1d4	0	N/A	801294	3538392	2737098	N/A
36r1d8	5337031	6628321	6773876	11393194	4619318	N/A
36r1d12	9045600	11650950	10857850	19278900	8421050	N/A
36r1d16	10562219	13441112	12266567	21073569	8807002	N/A
36r1d4	0	N/A	1300750	4837328	3536578	N/A
36r1d8	10408967	12385032	11853380	17124492	5271112	N/A
36r1d12	15804322	19072266	17229398	24743534	7514136	N/A
36r1d16	15324225	20575800	16329005	27853350	11524345	N/A
TT membrana 36 r1 d4-16						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
36r1d4	15499654	18795692	17037940	25266236	8228296	N/A
36r1d8	33921315	42405930	40617630	61212375	20594745	N/A
36r1d12	34409655	43814070	41259420	62752680	21493260	N/A
36r1d16	31767989	41781747	38109131	62065554	23956423	N/A

RB20237						
membrana 37 r3 d5-14						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
37r3d5	N/A	N/A	223104783	3612659302	3389554519	N/A
37r3d8	N/A	N/A	303950501	3790199554	3486249053	N/A
37r3d12	N/A	N/A	252576976	3439543685	3186966709	N/A
37r3d14	N/A	N/A	258318977	3293656892	3035337915	N/A
37r3d5	N/A	N/A	152018527	3178530318	3026511791	N/A
37r3d8	N/A	N/A	278594221	3415804365	3137210144	N/A
37r3d12	N/A	N/A	304995331	3565155397	3260160066	N/A
37r3d14	N/A	N/A	244980687	3606133434	3361152747	N/A
NAV1.5 membrana 37 r3 d5-14						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
37r3d5	0	0	123943	2082021	1958078	N/A
37r3d8	2789592	4265508	2968680	5543811	2575131	N/A
37r3d12	2088722	4290236	2129340	5537894	3408554	N/A
37r3d14	5740018	7398824	6143990	10143690	3999700	N/A
37r3d5	0	0	246024	2409444	2163420	N/A
37r3d8	1205370	2852010	1279125	3907710	2628585	N/A
37r3d12	1841985	3819330	1884735	5241285	3356550	N/A
37r3d14	5634888	7070283	6983277	11887539	4904262	N/A
TT membrana 37 r3 d5-14						
Mostra	Volum ajustat total banda (Int)	Volum total banda (Int)	Volum ajustat total carril (Int)	Volum total carril (Int)	Volum fons (Int)	Factor normalitzador
37r3d5	0	0	32832	1658400	1625568	N/A
37r3d8	3322616	4113736	3606196	5720088	2113892	N/A
37r3d12	6166232	7266989	6571735	9191525	2619790	N/A
37r3d14	8907869	10373160	9532845	12935869	3403024	N/A
37r3d5	0	0	44720	1491154	1446434	N/A
37r3d8	2502048	3281424	2671488	4850496	2179008	N/A
37r3d12	5252035	6276366	5568498	8145411	2576913	N/A
37r3d14	7882796	8944439	8783107	11498933	2715826	N/A

Annex 5

Gràfiques del BioAnalyzer per analitzar la qualitat de l'ARN obtingut de les mostres

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

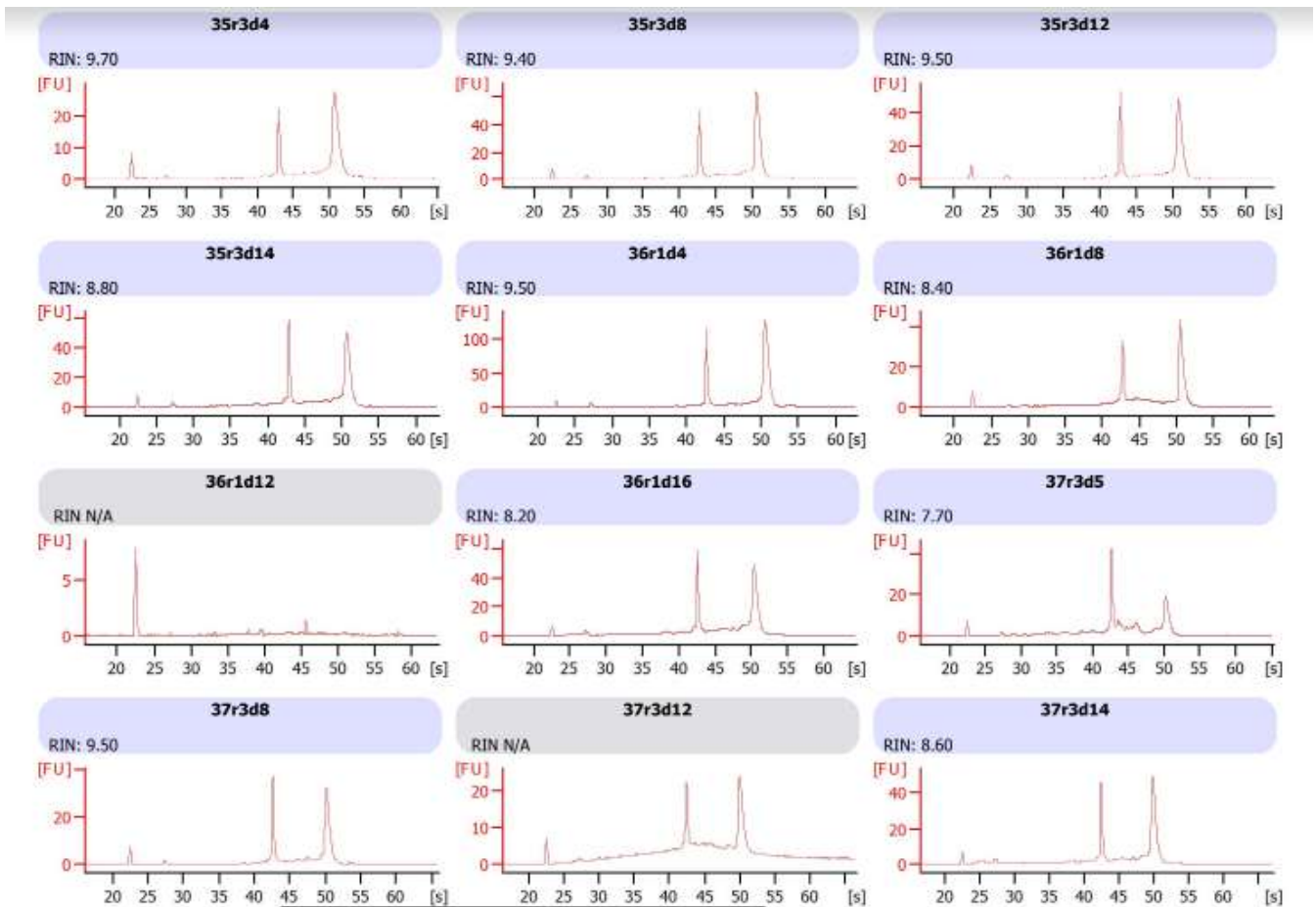
Instrument Name: DE13804494 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13804494 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
 Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Version: 2.6
 Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Eukaryote)
 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #:
 Reagent Kit Lot #:
 Chip Comments:



Annex 6

L'organització de les taules per realitzar la qPCR es va fer de la següent manera:

Placa 96 pous

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	GEN
A	35D4	35D8	35D12	35D14	36D4	36D8	36D12	36D16	37D5	37D8	37D12	37D14	<i>PPIA</i>
B	35D4	35D8	35D12	35D14	36D4	36D8	36D12	36D16	37D5	37D8	37D12	37D14	<i>SCN5A</i>
C	35D4	35D8	35D12	35D14	36D4	36D8	36D12	36D16	37D5	37D8	37D12	37D14	<i>TNNT2</i>
D	35D4	35D8	35D12	35D14	36D4	36D8	36D12	36D16	37D5	37D8	37D12	37D14	<i>SCN1B</i>
E													
F													
G													
H													

Placa de 384 pous

Timeline differentiation SCN5A 220722