
Cèl·lules mare i medicina regenerativa

Pseudònim: Stem



Introducció

La idea d'aquesta recerca és conèixer una mica més a fons el desconegut món de les cèl·lules mare, en especial les iPS, un tipus concret de cèl·lules mare que es generen al laboratori i ens permet en una nova manera d'estudiar les malalties.

Aquest treball fa una petita introducció a la medicina regenerativa i tracta per sobre els diferents tipus de cèl·lules mare que hi ha i que són el principal focus de la medicina regenerativa.

El treball té cinc parts diferenciades, la primera fa referència a la part teòrica, és una introducció al món de les cèl·lules mare i la medicina regenerativa. La segona, la més extensa, fa referència a la part pràctica. És la part més elaborada del treball i de major complexitat, la vaig realitzar durant els mesos de juliol i agost als laboratoris de l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (l'IBEC), que es troba al recinte del Parc Científic de Barcelona (PCB). Es centra bàsicament en la generació, cultiu i caracterització d'iPS. La tercera part està dedicada a les conclusions finals. La quarta, és un annex, també força elaborat, on trobem informació sobre el laboratori on he estat treballant, la sala de cultius cel·lulars, el material i els aparells que s'utilitzen... En aquesta mateixa part també es fa referència a aspectes socials i d'actualitat, com l'aportació de models animals en medicina regenerativa o la investigació actual sobre la regeneració del cor del peix zebra. I l'última part, la més breu però no la menys important, és on trobem totes les referències bibliogràfiques.

Al llarg del treball trobem una sèrie d'aclariments, paraules poc comunes o molt tècniques, que he cregut convenient explicar el seu significat a peu de pàgina, també apareix alguna frase en cursiva de científics coneguts que m'ha semblat interessant destacar. A més, cal dir que al principi hi ha un llistat d'abreviacions, que és important fer-li una ullada per facilitar la posterior lectura del treball.

Continguts

PART TEÒRICA: CÈL·LULES MARE I MEDICINA REGENERATIVA	9-24
1 Abreviacions	9-11
2 Introducció als àcids nucleics, als gens i als factors de transcripció	12-17
2.1 Els àcids nucleics	12-14
2.2 Els gens	14-15
2.3 Els factors de transcripció	16-17
3 Cèl·lules mare com a principal objectiu de la medicina regenerativa	18-22
3.1 Medicina regenerativa	18
3.2 Cèl·lules mare	19-22
3.2.1 Els tres grans grups de cèl·lules mare	20-22
3.2.1.1 Cèl·lules mare somàtiques (o adultes)	20
3.2.1.2 Cèl·lules mare embrionàries (ESc)	21
3.2.1.3 Cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPS)	21-22
3.2.1.3.1 Perquè podem fer servir les iPS?	22
4 Pèrdua de la potencialitat de les cèl·lules durant el desenvolupament embrionari	23-24
4.1 Desenvolupament embrionari	23-24
4.2 Pèrdua progressiva de la potencialitat de les cèl·lules	24
PART EXPERIMENTAL: GENERACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'IPS	25-58



1 Pràctiques realitzades	25-58
1.1 Cultius primaris de cèl·lules adultes	25-27
1.1.1 Introducció	
1.1.2 Objectiu	
1.1.3 Material i/o reactius	
1.1.4 Procediment	
1.1.5 Resultats i interpretació	
1.2 Reprogramació cel·lular	28-32
1.2.1 Introducció	
1.2.2 Objectiu	
1.2.3 Material i/o reactius	
1.2.4 Procediment	
1.2.5 Resultats i interpretació	
1.3 Condicions de cultiu	33-41
1.3.1 Introducció	
1.3.2 Objectiu	
1.3.3 Material i/o reactius	
1.3.4 Procediment	
1.3.5 Resultats i interpretació	
1.4 Caracterització	42-58
1.4.1 Morfologia	42-43
1.4.1.1 Introducció	
1.4.1.2 Objectiu	
1.4.1.3 Material i/o reactius	
1.4.1.4 Procediment	
1.4.1.5 Resultats i interpretació	
1.4.2 Fosfatasa alcalina	44-46
1.4.2.1 Introducció	

1.4.2.2 Objectiu	
1.4.2.3 Material i/o reactius	
1.4.2.4 Procediment	
1.4.2.5 Resultats i interpretació	
1.4.3 Immunofluorescència o marcatge amb anticossos fluorescents	46-50
1.4.3.1 Introducció	
1.4.3.2 Objectiu	
1.4.3.3 Material i/o reactius	
1.4.3.4 Procediment	
1.4.3.5 Resultats i interpretació	
1.4.4 PCR	51-56
1.4.4.1 Introducció	
1.4.4.2 Objectiu	
1.4.4.3 Material i/o reactius	
1.4.4.4 Procediment	
1.4.4.5 Resultats i interpretació	
1.4.5 Diferenciació in vitro	57
1.4.6 Diferenciació in vivo	58
CONCLUSIONS FINALS	59
ANNEXOS	60-69
1 Centre de recerca	60
2 Laboratori i sala de cultius cel·lulars	61-64
2.1 Equip d'una sala de cultius cel·lulars i material d'un sol ús	61-62
2.2 Aparells generals del laboratori	63
2.3 Congelació i descongelació de cèl·lules	64

3	Microscopis	65
4	Retrovirus endògens i lentivirus	66
5	L'aportació dels models animals	67-69
5.1.	Estudi de la regeneració del cor del peix zebra	67-69
6	Un mes al departament de control de la potència de cèl·lules mare a l'IBEC	70
7	Premi Nobel de Medicina 2012	71
	BIBLIOGRAFIA	72-73

PART TEÒRICA: CÈL·LULES MARE I MEDICINA REGENERATIVA

1. Abreviacions

PCB	Parc Científic de Barcelona	
IBEC	Institut de Bioenginyeria de Catalunya	
iPS	Induced Pluripotent Stem cells (Cèl·lules mare pluripotents induïdes)	
ESc	Embryonic Stem cells (Cèl·lules mare embrionàries)	
OCT4	Octamer-binding Transcription factor 4 (factor de transcripció)	
SOX2	Sex determining Region Y-box 2 (factor de transcripció)	
KIF4	Kruppel-like factor 4 (factor de transcripció)	
MYC	Myelocytomatosis viral oncogene homolog (factor de transcripció)	
MEF's	Mouse Embryonic Fibroblasts (Fibroblasts d'embrions de ratolí)	
HFF	Human Foreskin Fibroblasts (Fibroblasts de prepuci humà)	
HESm	Human Embryonic Stem cells medium (Medi per cèl·lules mare embrionàries humanes)	
cHES	Conditioned Human Embryonic Stem cells medium (Medi condicionat)	
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Medi Dulbecco modificat per Iscove)	
MEM	Basal Medium Eagle (Medi elemental amb aminoàcids essencials)	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medi d'Eagle modificat per Dulbecco)	
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Sulfòxid de dimetil)	

KO-DMEM	Knockout Dulbecco's Modified Eagle Medium (reemplaçament de medi modificat)	
KO-SR	Knockout Serum Replacement (Substitut de sèrum)	
NEAA	Non Essential Amino Acids (Aminoàcids no essencials)	
GLX	Glutamax (Glutamina més estable)	
PBS	Phosphate Buffer Saline (Solució amortidora de fosfat)	
FBS	Fetal Bovine Serum (Sèrum boví fetal)	
P/S	Penicillin and Streptomycin (Penicil·lina i estreptomicina)	
IRR	Irradiació	
EBs	Embrioid Bodies (Cossos embrionaris)	
trans ---	Transfectats (ex. trans OCT4: gen transfectat)	
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacció en cadena de la polimerasa)	
Q-PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction	(Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa)
RT-PCR	Reverse transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reacció en cadena de la polimerasa amb retrotranscriptasa o transcriptasa inversa)	
RT	Retrotranscriptasa	
DNA	Deoxyribonucleic acid (Àcid desoxiribonucleic)	
cDNA	DNA complementari	
RNA	Ribonucleic acid (Àcid ribonucleic)	
mRNA	(o RNAm)	RNA missatger
tRNA	(o RNAt)	RNA de transferència

rRNA	(o RNAr)	RNA ribosòmic
nRNA	(o RNAn)	RNA nucleolar
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates (Desoxinucleòtids Trifosfat)	
Acs	Anticossos	
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	
CO ₂	Diòxid de carboni	
O ₂	Oxigen	
hESCs	Human Embryonic Stem cells (Cèlules mare embrionàries)	
pol	Polimerasa	
AP	Alkaline Phosphatase (Fosfatasa alcalina)	
IFD	Immunofluorescència directa	
IFI	Immunofluorescència indirecta	
UV	Llum ultraviolada	
MPM	Marcador de pes molecular	
TBE	Tris-boratos-EDTA (Solució amortidora)	
Ct	Cycle Threshold (Cicle llindar)	
RFU	Relative Fluorescence Units (Unitats de fluorescència relativa)	

2. Introducció als àcids nucleics, als gens i als factors de transcripció

2.1. Els àcids nucleics

Els àcids nucleics són biomolècules orgàniques encarregades d'emmagatzemar i difondre la informació genètica. El nom d'àcids nucleics prové del fet que són substàncies de caràcter àcid i que es van descobrir a l'interior del nucli de les cèl·lules eucariotes³. Es van distingir de la resta de substàncies del nucli perquè són molt riques en fòsfor.

Les unitats bàsiques dels àcids nucleics són els nucleòtids, cadascun d'ells està format per la unió de les següents molècules:

- Un glúcid de cinc carbonis (pentosa), la ribosa en el cas de l'RNA i la desoxiribosa en el cas del DNA.
- Un o diversos grups fosfat.
- Una base nitrogenada, que segons l'estructura química poden ser:
 - Púriques: Adenina (A) i Guanina (G)
 - Pirimidíniques: Citosina (C); Uracil, només present en l'RNA (U) i Timina, només present en el DNA (T).

Entre les bases nitrogenades hi ha una complementarietat. L'Adenina i la Timina sempre van unides quan es tracta de molècules de DNA. Quan es tracta de molècules de RNA se substitueix la Timina per l'Uracil. La Guanina i la Citosina sempre van aparellades, tant si parlem de DNA com si parlem d'RNA. Gràcies a aquesta complementarietat de bases, l'RNA i el DNA poden formar cadenes dobles amb dues seqüències de nucleòtids antiparal·leles.

Segons la pentosa que contenen, es distingeixen dos tipus d'àcids nucleics:

L'àcid desoxiribonucleic o DNA, és la molècula portadora de la informació genètica. El paper principal d'aquesta molècula és el

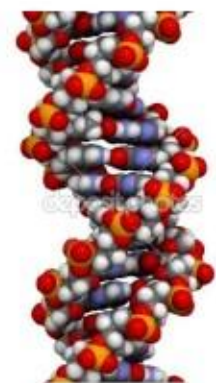


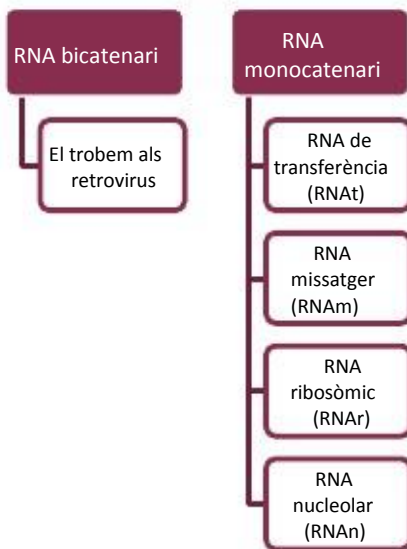
Figura 1: estructura tridimensional del DNA

³anomenen així totes les cèl·lules que contenen la informació genètica tancada dins d'una doble membrana, l'embolcall nuclear, el qual delimita el nucli d'aquestes cèl·lules.

d'emmagatzemar a llarg termini la informació i és l'encarregat de la seva transmissió hereditària.

L'**àcid ribonucleic** o RNA es troba en molts tipus de virus i en les cèl·lules procariotes⁴ i eucariotes, i és l'únic material genètic de certs virus. És la molècula que dirigeix les etapes intermèdies de la síntesi de proteïnes, ja que el DNA no pot actuar sol.

Hi ha dos tipus d'RNA:



RNAt: Té com a funció transportar aminoàcids específics fins als ribosomes on es sintetitzaran les proteïnes.

RNAm: Té com a funció copiar la informació continguda al DNA i dur-la fins als ribosomes perquè s'hi sintetitzin les proteïnes a partir dels aminoàcids que aporta el RNAt.

RNAr: És l'RNA que constitueix els

ribosomes i origina en aquests els llocs adequats per allotjar l'RNAm i també a l'RNAt.

RNAn: S'origina a partir de diferents segments de DNA i es troba constituint el nuclèol.

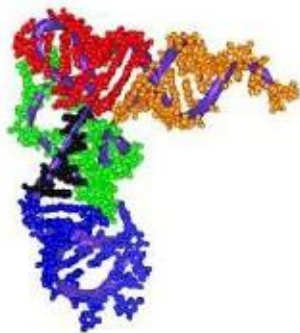


Figura 2: estructura tridimensional de l'RNA



Figura 3: RNAt, estructura secundària

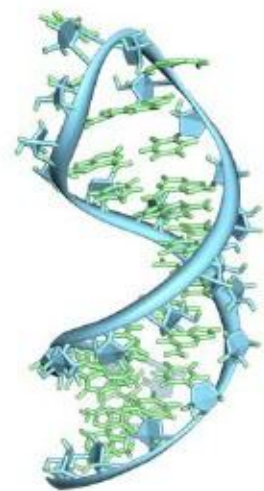


Figura 4: pre-RNAm

⁴ S'anomenen així totes les cèl·lules que no tenen un nucli cel·lular definit i el seu material genètic es troba dispers pel citoplasma.

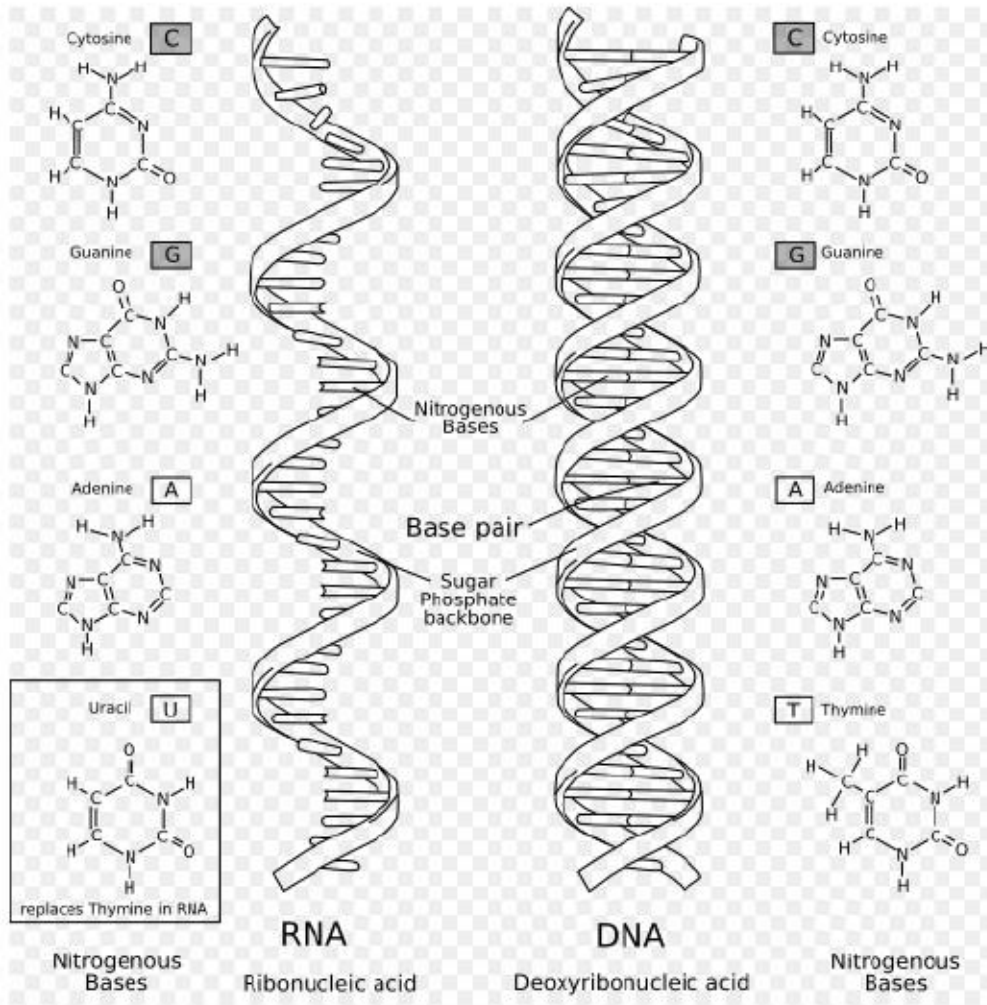


Figura 5: comparativa entre RNA i DNA

2.2. Els gens

Un gen és un fragment d'àcid nucleic que duu informació per a un determinat caràcter. El conjunt de gens d'un individu s'anomena genotip i les característiques que es poden observar d'un individu determinades pels gens, fenotip. Cal dir que aquesta definició de gen és massa simplista a la llum dels descobriments recents, però de moment és suficient.

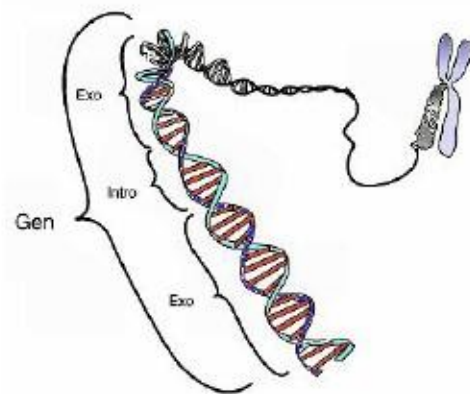


Figura 6: estructura d'un gen

De cada gen podem distingir diferents variants, anomenades al·lels. Un al·lel pot ser recessiu, si no s'expressa en el fenotip de l'individu, o dominant, si apareix reflectit al fenotip de l'individu.

La informació que duu cada gen s'expressa mitjançant els processos de transcripció i traducció, els quals es duen a terme al DNA cel·lular o genomas⁵ i als ribosomes⁶ respectivament.

- **Transcripció:** És el procés que es duu a terme per copiar la informació del fragment de DNA corresponent a un gen, a RNAm, és a dir, es passa d'una seqüència de bases nitrogenades d'un gen, a una seqüència de bases nitrogenades complementàries pertanyents a un RNAm. Durant aquest procés actua l'RNA polimerasa, un enzim que permet sintetitzar RNAm a partir d'un model de DNA.
- **Traducció:** És el procés que permet passar d'una seqüència de nucleòtids d'RNAm a una seqüència d'aminoàcids, que posteriorment formarà una proteïna⁷.

Posteriorment, es va descobrir que alguns virus podien produir DNA a partir del seu RNA, procés que s'anomena retrotranscripció o transcripció inversa.

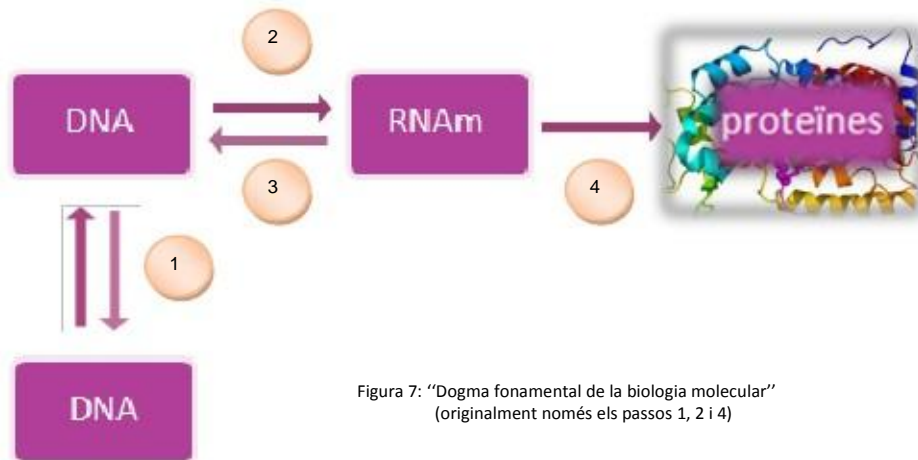


Figura 7: "Dogma fonamental de la biologia molecular" (originalment només els passos 1, 2 i 4)

1. Duplicació o replicació del DNA

2. Transcripció

3. Retrotranscripció

4. Traducció

⁵ Ens els organismes eucariotes ens referim al DNA contingut al nucli, on trobem tota la informació genètica de l'individu.

⁶ Complex macromolecular de proteïnes i àcids ribonucleics (RNA). La seva funció és sintetitzar proteïnes a partir de la informació genètica que els hi arriba del DNA i l'RNAm.

⁷ Polímer d'aminoàcids (compostos orgànics de baix pes molecular que es caracteritzen per tenir un grup carboxil (-COOH) i un grup amino (-NH₂)).

2.3. Els factors de transcripció

Els factors de transcripció són proteïnes que coordinen i regulen l'expressió d'un gen o un grup de gens, és a dir, són proteïnes que tenen com a funció que un gen s'expressi o no.

Els factors de transcripció interactuen amb regions específiques del DNA, amb elements de la maquinària de transcripció (com l'RNA polimerasa), amb altres factors de transcripció i amb molècules que activen o inhibeixen la seva activitat.

La transcripció, és el procés en què la informació codificada pel DNA passa a l'mRNA. La síntesi de l'RNA la realitza l'RNA polimerasa, però la iniciació i progressió del procés necessita la participació d'un gran nombre de proteïnes, els factors de transcripció.

La diferenciació cel·lular depèn de l'expressió d'un patró específic de gens, el qual està determinat bàsicament pel perfil de factors de transcripció expressats en cada tipus cel·lular. El 2006 es va evidenciar que només un grup de 4 factors de transcripció eren suficients per reprogramar alguns tipus cel·lulars, com fibroblasts humans, i generar cèl·lules de fenotip molt similar a les cèl·lules mare embrionàries. La regulació de l'estat de pluripotència es fa mitjançant els factors de transcripció: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* i *c-Myc*, aquests actuen sobre l'expressió gènica, promouen la pluripotència i inhibeixen la resta de gens que intervenen en la diferenciació. Més tard, es va aconseguir reprogramar algunes cèl·lules utilitzant només tres d'aquests quatre factors de transcripció. Cadascun d'aquests factors de transcripció té una funció específica o juga un paper concret que veurem a continuació.

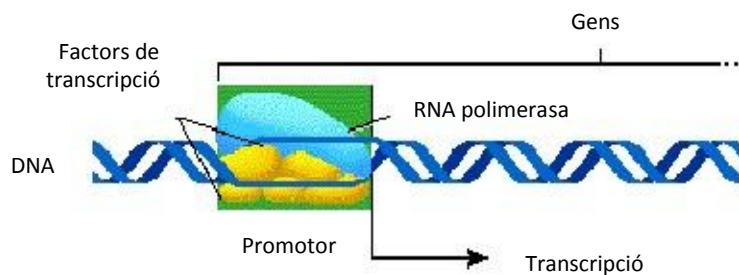


Figura 8: Iniciació del procés de transcripció amb la intervenció de factors de transcripció.



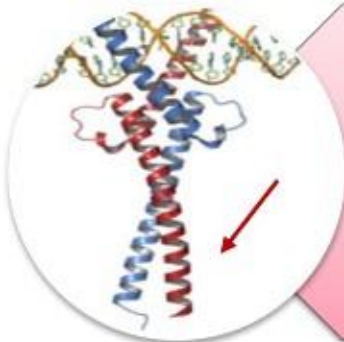
Oct4 juga un paper clau en el manteniment de la pluripotència. La falta d'Oct4 en els embrions és letal. En nivells elevats, en canvi, indueix la diferenciació, de manera que els nivells de regulació d'Oct4 han d'estar sotmesos a una estricta regulació.



Sox2 coopera activament amb *Oct4* en la regulació de gens implicats en el manteniment de la pluripotència. A diferència d'Oct4, no només s'expressa en cèl·lules pluripotents, sinó que també ho fa en etapes del desenvolupament, sobretot en cèl·lules neuronals.



Klf4 s'expressa en les cèl·lules mare embrionàries i té un doble paper, com a oncògen (gen anormal o activat que procedeix d'una mutació i que desenvolupa càncer), i com antioncògen (gen supressor de tumors). El seu paper en el procés de reprogramació està relacionat amb l'inhibició de p53 (un gen), prevenint la sortida de les cèl·lules del cicle cel·lular.



c-Myc és un factor de transcripció amb múltiples dominis i és, a més, un potent oncògen implicat en la proliferació cel·lular, en la replicació del DNA, en la inhibició de la diferenciació cel·lular i en la metastasi. No és indispensable, però indueix un programa cel·lular necessari per a l'autorenovació.

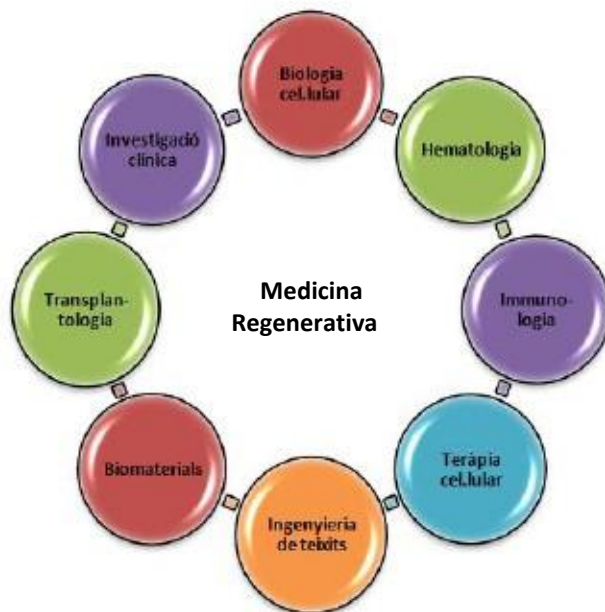
3. Cèl·lules mare com a principal objectiu de la medicina regenerativa

3.1. Medicina regenerativa

La medicina regenerativa és una branca de la medicina o de la bioenginyeria⁸ (hi ha diferents opinions), que s'ha desenvolupat considerablement en aquets últims anys. Aquesta medicina substitueix o regenera cèl·lules, teixits u òrgans amb la finalitat de restaurar o restablir les funcions biològiques. Els avenços en aquest camp s'han vinculat estretament amb els nous coneixements adquirits sobre les cèl·lules mare i la seva capacitat de transformar-se en qualsevol tipus de teixit del nostre cos. L'objectiu principal d'aquest tipus de medicina és investigar sobretot amb cèl·lules mare i amb diferents models animals amb la finalitat de conèixer:

- Els mecanismes bàsics del desenvolupament inicial i de l'organogènesis⁹.
- L'aplicació de línies cel·lulars¹⁰ que deriven de cèl·lules mare a malalties degeneratives, on hi ha una pèrdua de cèl·lules, és a dir, reemplaçar cèl·lules danyades a causa d'una malaltia en determinats teixits, per cèl·lules sanes

generades a partir de cèl·lules mare i comprovar que es restableixen les funcions biològiques.



La medicina regenerativa està relacionada amb diferents àrees de la biomedicina, amb les que manté estrets vincles.

Figura 9: caràcter multidisciplinari de la medicina regenerativa.

⁸ És el resultat de l'aplicació dels principis i tècniques de l'enginyeria al camp de la medicina.

⁹ És el conjunt de canvis que permeten que les capes embrionàries (ectoderma, la més externa; mesoderma i endoderma, la més interna) es transformin en els diferents òrgans que formen un organisme.

¹⁰ Es denomina així el conjunt de cèl·lules derivades d'una original que mantenen sempre les mateixes característiques, per exemple, NX-A (Fènix A) és una línia cel·lular.

3.2. Cèl·lules mare

Donades les investigacions realitzades als últims anys sobre les cèl·lules mare i les seves possibilitats terapèutiques han estat qualificades com una revolució en la medicina regenerativa.

Anomenen cèl·lula mare aquella cèl·lula indiferenciada que compleix almenys una de les dues característiques següents:

- Té la capacitat d'autorenovació, és a dir, a diferència d'altres cèl·lules, no envelleix.
- Sota certes condicions fisiològiques o experimentals, té la capacitat de diferenciar-se en el tipus cel·lular per el qual hagi estat programada: en funció del seu grau de potencialitat, produirà cèl·lules específiques d'un o més teixits.

Les cèl·lules mare segons el seu potencial de diferenciació¹¹ poden ser:

- Totipotents: són aquelles que poden generar un nou individu completament organitzat i estructurat. Únicament el zigot¹² i les vuit primeres cèl·lules resultants de les primeres divisions cel·lulars són totipotents.
- Pluripotents: són aquelles que poden generar tots els tipus cel·lulars d'un organisme, però no un nou individu, és a dir, les cèl·lules mare embrionàries (ESc), i les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPS), generades *in vitro*.
- Multipotents: només poden generar uns determinats tipus cel·lulars, de la mateixa capa embrionària. També s'anomenen cèl·lules mare somàtiques o adultes. En són un exemple les cèl·lules hematopoètiques de la medul·la òssia (conjunt de cèl·lules que formen la sang) o les cèl·lules de la pell.
- Oligopotents: poden generar únicament un tipus particular de cèl·lules.

¹¹ La cèl·lula indiferenciada a partir de la qual es pot desenvolupar una cèl·lula amb una funció específica pot tenir diferents graus de potencialitat, és a dir, pot generar un o més determinats tipus de cèl·lules segons que siguin totipotents, pluripotents, multipotents o oligopotents (continuar la lectura).

¹² És la primera cèl·lula d'un nou individu que s'obté de la fusió d'un gàmeta femení i un gàmeta masculí.

3.2.1. Els tres grans grups de cèl·lules mare

Tot i que com acabem de veure hi ha quatre (o cinc) tipus de cèl·lules mare, les investigacions que s'estan realitzant giren principalment al voltant dels tres grans grups següents: les cèl·lules mare somàtiques, les ESc i les iPS.

3.2.1.1. Cèl·lules mare somàtiques (o adultes)

Són cèl·lules no diferenciades que es troben en teixits i òrgans adults i que posseeixen la capacitat de diferenciar-se per donar lloc a cèl·lules adultes del teixit en el que es troben; per tant, es consideren cèl·lules multipotencials, que donen lloc a qualsevol teixit cel·lular de la mateixa capa embrionària.

▪ Avantatges

- No experimenten rebuig immunològic (sempre que siguin del mateix individu), per tant no generen cap tipus de conflicte amb el sistema immune de la persona donat que provenen del propi individu (no presenten problemes d'histocompatibilitat).
- No generen tumors, ja que tenen una taxa baixa de proliferació.
- Són relativament fàcils d'aconseguir.
- Poden ser emprades per crear altres tipus de teixits.
- No presenten problemes ètics, ja que no s'han de destruir embrions.

▪ Inconvenients

- No poden estar massa temps en cultiu perquè envelleixen.
- Tot i que són relativament fàcils obtenir, les quantitats que s'obtenen són molt petites.
- Només poden generar cèl·lules d'una mateixa capa embrionària.

3.2.1.2. Cèl·lules mare embrionàries (ESc)

Les cèl·lules mare embrionàries són pluripotents. Generalment s'obtenen de la massa interna del blastòcit¹³ (aquest està format per una capa externa, anomenada trofoblast, i per una capa cel·lular interna, constituïda per unes 30 cèl·lules, que són les

¹³ És una estructura embrionària present durant les primeres etapes del desenvolupament durant l'embaràs dels mamífers. Es forma 4 o 5 dies després d'haver-se produït la fecundació.

cèl·lules mare embrionàries, que tenen la capacitat de diferenciar-se en tots els tipus cel·lulars que apareixen en l'organisme adult, donant lloc a teixits i òrgans).

- **Avantatges**

- A partir de només una sola línia cel·lular podem aconseguir una quantitat infinita de cèl·lules.
- Poden generar qualsevol tipus cel·lular del nostre cos.

- **Inconvenients**

- Són difícils de controlar a causa de la seva ràpida proliferació.
- Presenten problemes ètics, ja que si partim de la idea que la vida s'inicia en el moment de la concepció, les investigacions amb embrions humans no són èticament correctes.
- Generalment presenten problemes d'histocompatibilitat amb el receptor.

3.2.1.3. Cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPS)

Les cèl·lules iPS són un tipus de cèl·lules mare generades al laboratori a partir de pràcticament qualsevol tipus de cèl·lula humana adulta. Aquestes cèl·lules mare de pluripotència induïda tenen la capacitat d'originar tots els tipus de teixits del nostre cos, com fan les cèl·lules mare embrionàries.

- **Avantatges**

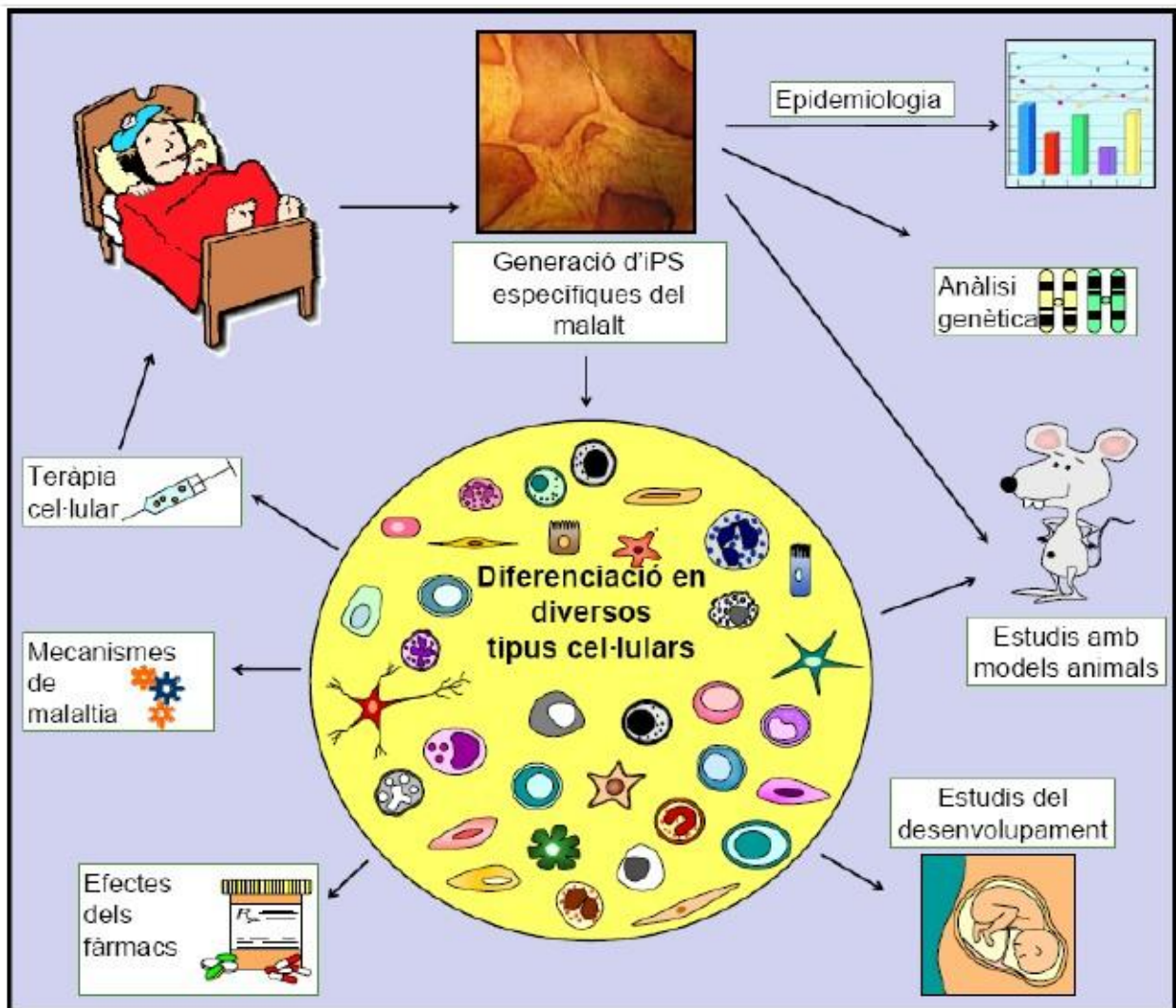
- Les podem generar al laboratori a partir de cèl·lules adultes.
- Es comporten com les cèl·lules mare embrionàries.

- **Inconvenients**

- El virus que s'utilitza per reprogramar les cèl·lules adultes les predisposa a originar càncer, de manera que de moment no poden ser emprades clínicament en pacients.

3.2.1.3.1. Per a què podem fer servir les iPS?

Al següent quadre podem observar els diferents usos de les cèl·lules mare pluripotents. Un dels usos més rellevants és el fet de poder estudiar al laboratori com apareixen i es desenvolupen les malalties. Això és possible diferenciant cèl·lules iPS d'un pacient en el tipus cel·lular rellevant per la malaltia, per exemple, si volem estudiar la malaltia del Parkinson, hem de reprogramar cèl·lules de qualsevol teixit cel·lular d'un pacient que pateixi la malaltia, diferenciar-les en neurones, estudiar el comportament d'aquestes i comparar-les amb les neurones diferenciades d'un pacient sa.



4. Pèrdua de la potencialitat de les cèl·lules durant el desenvolupament embrionari

4.1. Desenvolupament embrionari

El desenvolupament embrionari comença amb les primeres divisions d'un oòcit fecundat. Aquesta nova cèl·lula, anomenada cèl·lula ou o zigot, és una cèl·lula mare que té la capacitat de donar lloc un nou individu completament organitzat i estructurat.

Durant el desenvolupament inicial distingim tres fases:

- Segmentació

Consisteix en una sèrie de divisions mitòtiques¹⁴ que es produiran des de la fecundació fins a la implantació en l'endometri¹⁵ de l'úter. Al tercer dia, el zigot té 8 cèl·lules i s'anomena mòrula, al cinquè dia es forma un vuit interior i passa a l'estat de blàstula; finalment, al sisè dia es produeix la nidació o adhesió a l'endometri, on passa a l'estat de gàstrula.



Figura 10: Mòrula



Figura 11: Blàstula



Figura 12: Gàstrula

- Gastrulació

La gàstrula és l'estructura embrionària on observem les tres capes embrionàries que donaran lloc als diferents teixits de l'embrió. Aquestes tres capes germinals són:

- L'ectoderma: és la capa més externa i dona lloc a les cèl·lules del cervell (neurones), la medul·la espinal, els nervis, la pell, les ungles i el pèl.
- La mesoderma: és la capa intermèdia i dona lloc a les cèl·lules del cor, els ossos, els ronyons, els cartílags, els músculs i la sang.

¹⁴ Divisió cel·lular que origina dues cèl·lules filles iguals.

¹⁵ Paret de l'úter.

- L'endoderma: és la capa més interna i dona lloc a les cèl·lules del fetge, el pàncrees i les mucoses i recobriments interns dels aparells respiratori i digestiu.

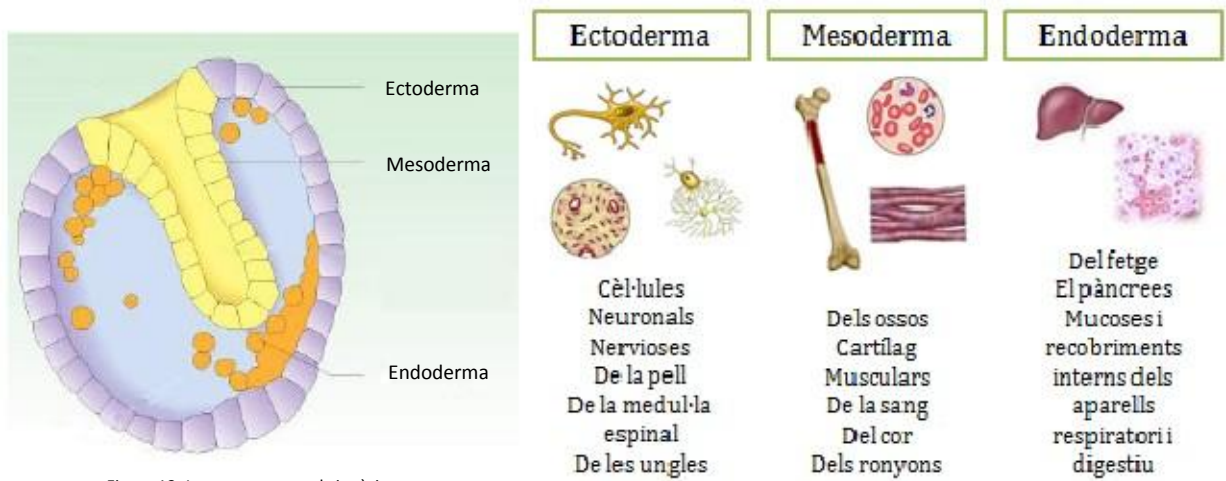
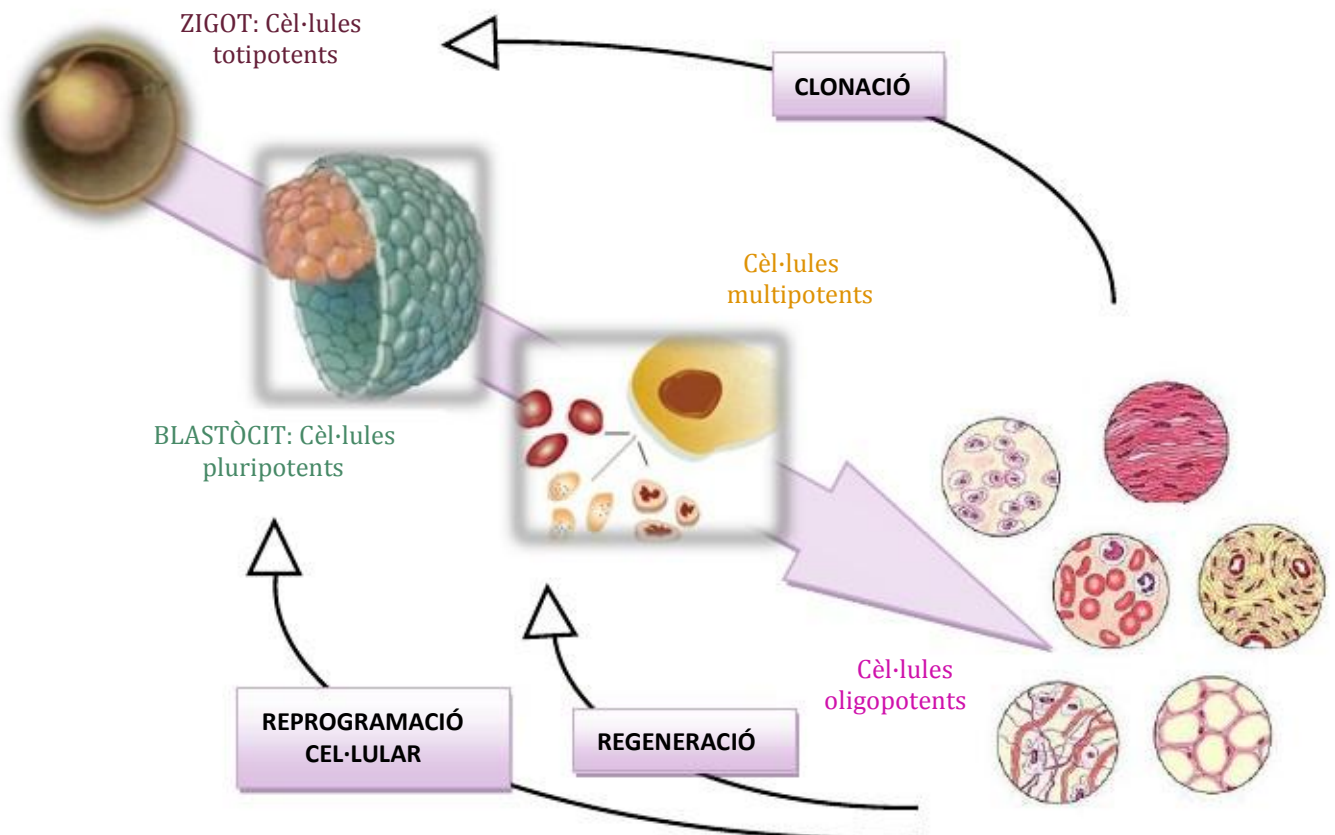


Figura 13: Les tres capes embrionàries

Organogènesi

És la fase en que les cèl·lules i teixits s'organitzen per donar lloc als òrgans. Aquesta fase dura fins els tres mesos: l'embrió passarà a anomenar-se fetus.

4.2. Pèrdua progressiva de la potencialitat de les cèl·lules



PART EXPERIMENTAL: GENERACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'IPS

1. Pràctiques realitzades

La intel·ligència consisteix, no només en el coneixement, sinó també en la destresa d'aplicar els coneixements en la pràctica¹⁶.

La generació de cèl·lules mare pluripotents induïdes és una tècnica complexa i la seva eficàcia és generalment molt baixa, depèn fonamentalment d'una sèrie de factors que s'han de tenir en compte durant el cultiu cel·lular. Els petits detalls tècnics i específics d'un laboratori, poden fer que aquesta tècnica tingui més consistència i els resultats obtinguts siguin millors. El primer pas per generar iPS és disposar de cultius primaris dels quals obtindrem les cèl·lules a reprogramar. Un cop reprogramades diem que tenim línies d'iPS, en aquest cas humanes, que han de ser caracteritzades per comprovar que presenten les mateixes característiques que les cèl·lules mare embrionàries, que és el nostre objectiu principal.

Aquesta sèrie de pràctiques que hi ha a continuació, són totes i cadascuna de les pràctiques que s'han de dur a terme per generar iPS i caracteritzar-les per comprovar les semblances que tenen amb les cèl·lules mare embrionàries. Hi ha pràctiques molt diferents entre elles, de manera que l'únic que tenen en comú és l'objectiu principal. Les tècniques utilitzades en alguns casos són diferents. També hem de tenir en compte que en totes utilitzem l'equip d'una sala de cultius cel·lulars, material d'un sol ús i aparells generals del laboratori (veure annex 2).

1.1. Cultius primaris de cèl·lules adultes

1.1.1. Introducció

Abans de dur a terme la reprogramació cel·lular hem de tenir suficients cèl·lules adultes per reprogramar, això implica que primer de tot hem de fer cultius primaris de cèl·lules adultes.

¹⁶ Aristòtil, filòsof grec (384 aC – 322 aC)

No és del tot fàcil obtenir cèl·lules per reprogramar, ja que això depèn de què un hospital et faci arribar mostres de pell (biòpsies), per exemple, o d'algun altre tipus de teixit. Tot i així, durant la meua estada s'han processat 6 biòpsies.

1.1.2. Objectiu

L'objectiu d'aquesta pràctica és aconseguir un gran nombre de cèl·lules adultes per després reprogramar-les (en el nostre cas) i així fer-les pluripotents. Les cèl·lules que ens interessa aconseguir són fibroblasts i queratinòcits.

Hem d'aconseguir que, arrel de cultivar un tros minúscul de pell, s'iniciï una proliferació cel·lular que ens permeti obtenir un nombre elevat d'aquestes cèl·lules.

1.1.3. Material i/o reactius

- Biòpsia de teixit epitelial¹⁷ que inclou cèl·lules de la dermis i de la epidermis
- Una placa de Petri de 35x10 mm per cada 5 trossets de mostra
- 2 ml de medi de cultiu per a fibroblasts (DMEM) per cada placa. A les plaques que volem obtenir queratinòcits haurem d'utilitzar un medi específic per a queratinòcits: és un medi comercial (que es pot preparar al laboratori, però que val més comprar-lo) anomenat EpiLife Medium, que és un medi lliure de sèrum i baix en calci
- Cobreobjectes (només li posarem cobreobjectes a la meitat dels cultius)

1.1.4. Procediment

- En primer lloc tractem les biòpsies, sempre sota la cabina de flux laminar. Primer les netegem amb PBS i les deixem durant una hora amb unes gotes d'antibiòtic (penicil·lina i estreptomina) i fungizona, per assegurar-nos que estan lliures de bacteris i fongs. Mentrestant posem el material que utilitzarem (tissors, pinces i bisturí) en etanol al 70%
- Passada una hora, tornem a rentar amb PBS.
- Posem a escalfar al bany (a 37°C) el medi de cultiu per tenir-lo preparat.

¹⁷ Teixit de recobriment i protecció format per una o diverses capes de cèl·lules unides directament entre sí (en aquest cas pertany a la pell).

- A continuació agafem una biòpsia de les quals disposem, li tallem el tros de grassa (que no serveix) i la tallem en uns 20 trossets.
- Repartim aquests trossets en 4 plaques de Petri (5 trossets per placa).
- A la meitat dels cultius els hi posem un cobreobjectes, ja que, de vegades, els trossets es desenganxen i floten, de manera que no creixen del tot bé.
- Afegim el medi de cultiu a les plaques de Petri: a les que no tenen cobreobjectes els li posem una gota per trosset, a les altres 1 ml.
- Tanquem les plaques de Petri i les marquem totes, indicant el dia i el nombre de la biòpsia a la qual pertanyen.
- Les posem a incubar (a 37°C, 5% de CO₂ i 21% d'O₂).
- Repetim la mateixa operació amb la resta de les biòpsies.
- Al dia següent afegim medi de cultiu a les biòpsies que no tenen cobreobjectes.

És important controlar les biòpsies durant els pròxims dies, sense moure-les gaire, tot hi que no els hi hem de canviar el medi fins passats 3 o 4 dies.

1.1.5. Resultats i interpretació

Passats 5 dies des que vam fer els cultius, ja podem observar el creixement d'alguna que altre cèl·lula al voltant d'alguns dels trossets cultivats, això ens indica que, en principi, hauríem d'obtenir les cèl·lules desitjades.



Figura 14: Cultiu primari (a la dreta queratinòcits, a l'esquerra fibroblasts) - Augments: 10X -

Al cap de 10 dies totes les plaques contenen una quantitat significativa de cèl·lules (ja siguin fibroblasts o queratinòcits), de manera que no ens preocupem per cap dels cultius, deduïm que tots estan en les condicions correctes, de manera que la proliferació cel·lular és força ràpida i com era d'esperar. Passat uns 20 dies (gairebé 3 setmanes) ja podem veure totes les plaques recobertes de cèl·lules de fibroblast i de queratinòcits, els dos tipus de cèl·lules que esperàvem obtenir, així doncs, podem dir que hem aconseguit el nostre objectiu.

1.2. Reprogramació cel·lular

1.2.1. Introducció

La reprogramació cel·lular consisteix a introduir un còctel específic de gens en qualsevol de les nostres cèl·lules adultes, com poden ser les de la pell, a través de la tècnica de transducció¹⁸ amb virus.

La transducció es realitza amb virus sintètics que contenen gens relacionats amb les cèl·lules mare, que faran que aquestes cèl·lules tornin enrere en la seva diferenciació i adquireixin la capacitat de pluripotència, és com fer un *reset* a les cèl·lules per després poder-les diferenciar al tipus cel·lular desitjat.

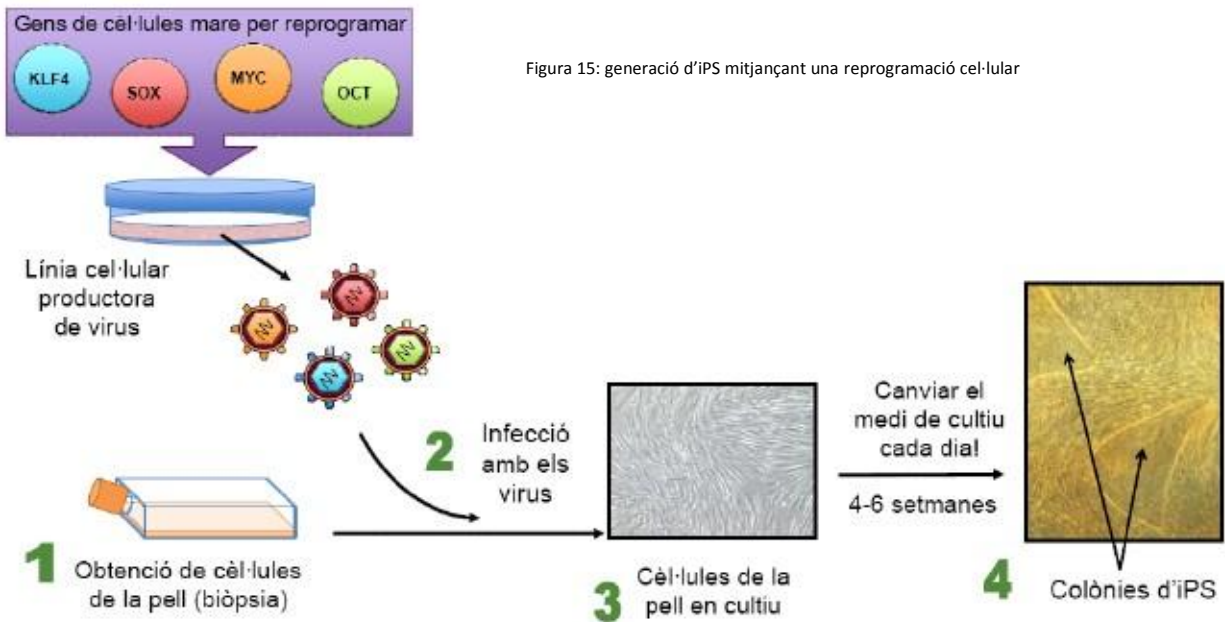


Figura 15: generació d'iPS mitjançant una reprogramació cel·lular

1.2.2. Objectiu

L'objectiu de la reprogramació cel·lular és aconseguir cèl·lules pluripotents a partir de cèl·lules adultes que extraurem de cultius primaris, en aquest cas utilitzarem fibroblasts (que es troben a la dermis).

¹⁸ En el cas que la introducció de material genètic extern a cèl·lules eucariotes es faci mitjançant vectors vírics (com és el cas) s'anomena transducció, si fos mitjançant plasmidis o altres eines, parlariem de transfecció.

Un cop feta la reprogramació cel·lular, hem d'haver canviat la informació expressada a la cèl·lula. El DNA és el mateix a totes les cèl·lules clòniques de l'individu, és a dir, una cèl·lula pancreàtica té la mateixa informació que un hepatòcit (cèl·lula pròpia del fetge), però cada tipus cel·lular té un conjunt de gens activats, i altres inactivats, de manera que s'expressa una informació o una altra.

Durant la reprogramació cel·lular es tracta "d'apagar" la informació que la fa ser una cèl·lula de la pell (en aquest cas) i "encendre" la informació que la fa ser una cèl·lula mare pluripotent.

1.2.3. Material i/o reactius

Per a la producció de retrovirus per a la reprogramació, necessitarem:

- Cèl·lules Φ NX-A (Fènix-A): són cèl·lules de càncer renal que només produeixen l'embolcall del virus, de manera que la informació genètica (ja sigui DNA, o RNA) la decidim nosaltres.
- Reactius per al cultiu de les cèl·lules NX-A:
 - PBS (Phosphate Buffer Saline)
 - Tripsina 0,05%
 - D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
 - Antibiòtic (penicil·lina i estreptomina)
 - Glutamax
 - FBS (Fetal Bovine Serum)



Figura 16: Cèl·lules Fènix (NX-A)
- Augments: 10X -

Per a la transfecció necessitarem:

- Plaques de Petri de 90X15 mm (en aquest cas 4)
- Reactius per du a terme la transfecció:
 - X-tremegene 9 ¹⁹
 - PBS (Phosphate Buffer Saline)

¹⁹ És el reactiu de transfecció de DNA més utilitzat a causa de la seva alta eficiència de transfecció en línies cel·lulars comunes, són liposomes que transfereixen la informació desitjada.

- DNA
- Polybrene 10 mg/mL²⁰
- Filtres de 0.45 µm de baixa unió a proteïnes
- Cèl·lules que volem transfectar (en aquest cas fibroblasts)

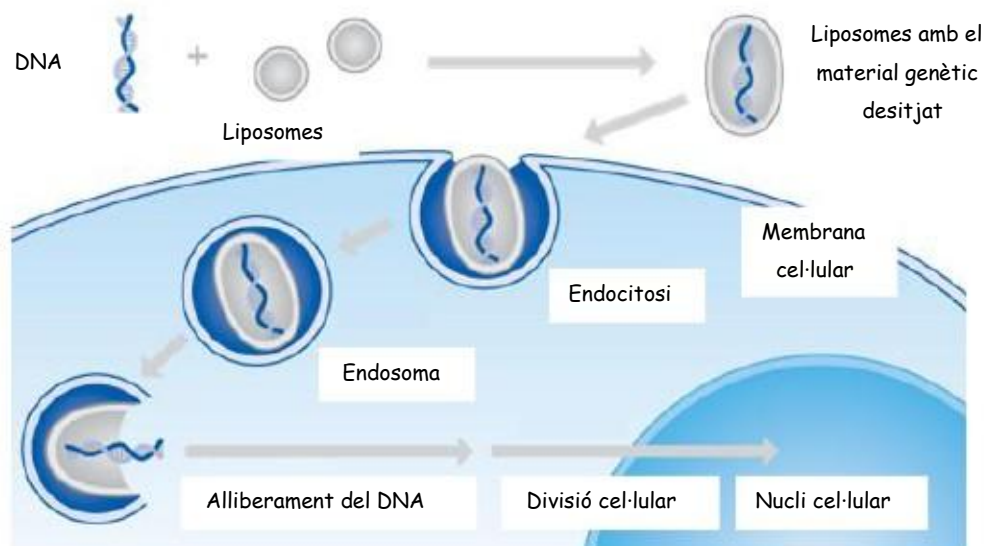
1.2.4. Procediment

- Aproximadament una setmana abans de fer la transfecció hem de cultivar les cèl·lules Fènix només amb el medi de cultiu adequat, en aquest cas el medi que utilitzarem serà el DMEM.
- 24 hores abans de fer la transfecció hem de fer un passatge, és a dir, hem d'aixecar les cèl·lules Fènix que es troben adherides a la placa de Petri per fer la transfecció en una altra placa. Ens interessa desenganxar les cèl·lules per tenir-les ben separades i que la transfecció sigui més eficaç, de manera que utilitzarem el mètode de la tripsinització. La tripsina és un enzim que trenca els enllaços peptídics²¹ de les proteïnes, de manera que aconseguim desenganxar les cèl·lules de la placa sense trencar-les. És important que, abans d'afegir la tripsina, aspirem el medi de cultiu, fem dos rentats amb PBS i tornem a aspirar la resta de líquid restant. Aquest pas no ens el podem saltar, ja que hi ha proteïnes (que es troben al medi de cultiu) que inhibeixen l'acció de la tripsina, de manera que si queden restes d'aquestes proteïnes a la placa, no aconseguiríem els resultats desitjats.
- Un cop tenim les cèl·lules desenganxades de la placa hem de fer el recompte amb l'ajuda de la càmera de Neubauer, un instrument que s'adapta al microscopi i permet comptar les cèl·lules que hi ha en un medi líquid (en aquest cas en el medi de cultiu cel·lular).
- Un cop comptades, sembrem nous cultius d'aproximadament $4,5 \times 10^6$ cèl·lules per placa.
- Incubem a 37°C, 5% CO₂ i 21% d'O₂ per tal que les cèl·lules acabin de produir l'embolcall del virus.

²⁰ És un polímer utilitzat per augmentar l'eficiència de la infecció de certes cèl·lules amb un retrovirus en un cultiu cel·lular, ajuda a permeabilitzar les cèl·lules que vols infectar.

²¹ Són enllaços formats entre un grup amino (-NH₂) d'un aminoàcid i el grup carboxil (-COOH) d'un altre aminoàcid.

- Al dia següent passem a fer la transfecció. Primer de tot hem de fer una barreja amb 873 μL (1 microlitre = 1 mm^3) de PBS i 9 μg del DNA desitjat.
- A continuació agitem la barreja al vòrtex.
- Li afegim 27 μL de X-tremegene 9 i tornem agitar al vòrtex.
- Deixem la barreja a temperatura ambient entre 15 i 30 minuts per permetre la formació de liposomes²².
- Afegim aquesta barreja a la placa de les cèl·lules Fènix (sense canviar el medi) i balancegem la placa endavant i endarrere de tal manera que quedi ben repartida. En aquest moment hem introduït el material genètic desitjat a l'embolcall del virus que ha sigut produït per les cèl·lules Fènix.
- Incubem durant 24 hores (a 37°C, 5% de CO_2 i 21% d' O_2).



- El dia següent a la transfecció, canviem el medi de cultiu molt acuradament per evitar el despreniment de les cèl·lules, i passem a incubar-les a 32°C, 5% de CO_2 i 21% d' O_2 .
- Un dia més tard, recollim el líquid on es troben els virus (que anomenem sobrenedant), el filtrem (amb el filtre de 0,45 μm de baixa unió a proteïnes) i afegim 5 μL de polybrene per cada 10 ml de medi.
- Centrifuguem per afavorir el contacte de les cèl·lules amb els virus, de tal manera que la reprogramació es dugui a terme correctament.

²² És una vesícula esfèrica composta d'una doble capa de fosfolípids (un tipus de lípids, molècules orgàniques). La seva estructura permet absorbir i transportar substàncies.

- Afegim nous medis de cultiu perquè surtin nous virus i incubem 24 hores més (a 37°C, 5% de CO₂ i 21% d'O₂).
- El dia següent repetim l'últim pas, tornem a recollir el líquid sobrenedant, el filtrem i li afegim 5 µL de polybrene per cada 10 ml de medi i passem a infectar les cèl·lules que volem reprogramar (en aquest cas les cèl·lules de la pell).
- Un cop infectades dos vegades (procés que, en el cas concret d'utilitzar vectors virals, anomenem transducció), ja podem passar a incubar-les (a 37°C, 5% de CO₂ i 21% d'O₂) durant 48 hores.
- Dos dies després, hem de cultivar les cèl·lules reprogramades sobre feeders ²³. Això ho farem en plaques de Petri de 90X15 mm.
- Al dia següent canviarem el medi de cultiu (HESm), i així successivament fins que apareguin colònies d'iPS.

1.2.5. Resultats i interpretació

Al cap d'unes 4 setmanes en les condicions de cultiu adequades, observem colònies d'iPS, cèl·lules correctament reprogramades que han adquirit la capacitat de pluripotència, altres només estan parcialment reprogramades.

Tot i així a partir de la desena setmana, el centre d'alguna de les colònies es veu d'un color massa fosc, la qual cosa ens indica que algunes cèl·lules s'estan començant a diferenciar. De totes maneres no ens hem de preocupar, donat que es normal que passi això, que hi hagi alguna cèl·lula que es comenci a diferenciar no vol dir que la resta també ho facin.

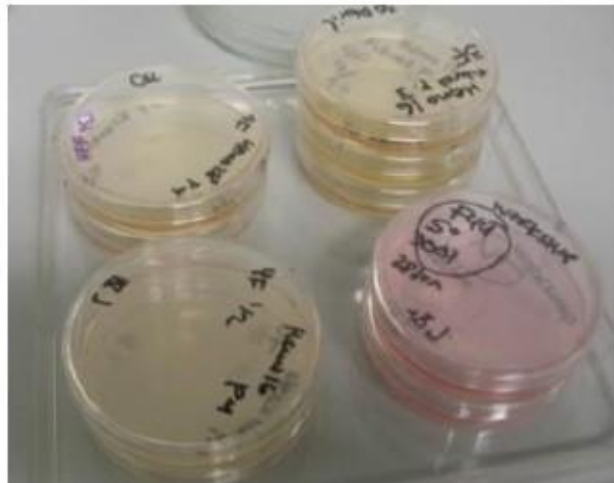


Figura 17: Plaques de reprogramació

²³ Traduït al català vol dir "alimentadors". Són una capa de fibroblasts humans, que han estat irradiats perquè no proliferin i amb els quals les iPS conviuen millor.

1.3. Condicions de cultiu

1.3.1. Introducció



Figura 18: Incubador amb plaques de reprogramació i línies cel·lulars

La majoria de línies cel·lulars dupliquen el cultiu en 24-48 hores, quan les condicions de creixement són adequades. D'aquesta manera, aconseguim que les cèl·lules es multipliquin en qualsevol cultiu en uns dies, fins arribar a ocupar tota la superfície de la placa. És per això que si desitgem mantenir una línia en cultiu no només d'uns dies, hem de repondre nutrients i eliminar productes de degradació, com poden ser cèl·lules mortes. Per això és important mantenir les cèl·lules a l'incubadora (a 37°C, 5% de CO₂ i 21% O₂ o 5% -segons

les cèl·lules- d'O₂) i sobretot canviar el medi de cultiu freqüentment (en el cas de les iPS, cada dia).

És fàcil observar com el pH del medi tendeix a acidificar-se quan hi ha molta quantitat de cèl·lules, és a dir, quan la densitat és elevada. Això ho veiem reflectit quan el medi es torna d'un color taronja - groguenc a l'augmentar els productes de rebuig alliberats.

A causa d'això, una de les pràctiques diàries és canviar el medi de cultiu de totes les plaques i, per tant, hem d'elaborar diferents medis de cultiu contínuament.

A continuació, hi ha les receptes dels medis de cultiu que més s'utilitzen al treballar amb cèl·lules mare induïdes, i seguidament hi ha una petita explicació de per què fem servir cada medi de cultiu i una breu descripció de cadascun dels elements que el componen per entendre la funció que tenen tot ells.



Figura 19: Medis de cultiu per canviar

HEE

IMDM base	440 ml
FBS 10%	50 ml
Glutamax	5 ml
P/S 100X	5 ml

DMEM

DMEM base	440 ml
FBS 10%	50 ml
Glutamax	5 ml
P/S 100X	5 ml

ENDODERM

KO-DMEM	435ml
FBS 10%	49,5 ml
Glutamax	5 ml
P/S 100X	5 ml
NEAA	5 ml
β mercapto etanol	0,5 ml

MESODERM

KO-DMEM	435ml
FBS 10%	49,5 ml
Glutamax	5 ml
P/S 100X	5 ml
NEAA	5 ml
β mercapto etanol	0,5 ml
Ascorbic acid (vitamina C)	50 ml

ECTODERM

DMEM F12	241ml
BME	241 ml
Glutamax	5,25 ml
P/S 100X	5,25 ml
N2	2,5 ml
B27	5 ml

Medi de congelació

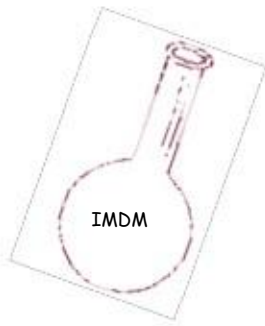
FBS	90%
DMSO	10%

Medi condicionat

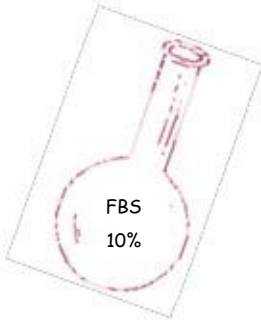
HES amb MEFs	100%
--------------	------

<u>HESm</u>			
KO-DMEM	387 ml	NEAA 100X	5 ml
KO-SR 20%	100 ml	β mercapto etanol	0,5 ml
Glutamax	5 ml	FGF	10 ng/ml
P/S 100X	2,5 ml		

- Medi de cultiu HFF: l'utilitzem únicament per a cultius de fibroblasts humans.
- Medi de cultiu DMEM: l'utilitzem per a cultius primaris, cultius de MEFs, per cultivar les cèl·lules Fènix i moltes altres.
- Medi de cultiu per a endoderma: l'utilitzem per a cultius que volem diferenciar a qualsevol tipus cel·lular que pertanyi a l'endoderma, per exemple cèl·lules pancreàtiques.
- Medi de cultiu per a mesoderma: l'utilitzem per a cultius que volem diferenciar a qualsevol tipus cel·lular que pertanyi al mesoderma, per exemple cèl·lules de la sang, del cor, dels ossos o cartílags.
- Medi de cultiu per a ectoderma: l'utilitzem per a cultius que volem diferenciar a qualsevol tipus cel·lular que pertanyi a l'ectoderma, per exemple cèl·lules del cabell o neurones.
- Medi de congelació: com el seu propi nom indica, l'utilitzem per a congelar les cèl·lules.
- Medi de cultiu HES: l'utilitzem per a les plaques de reprogramació i cultius de iPS.
- Medi condicionat: l'utilitzem per a cèl·lules que estan sobre matrigel, sense feeders (explicat a continuació).



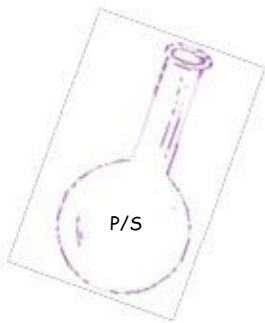
És un medi altament enriquit amb vitamines, aminoàcids i altres nutrients, molt adequat per a la ràpida proliferació de cultius de cèl·lules d'alta densitat.



És el suplement de creixement més àmpliament utilitzat per a medis de cultiu cel·lular, a causa del seu alt contingut de factors de creixement embrionari. Si les concentracions són apropiades, s'ha demostrat que satisfà les necessitats metabòliques específiques del cultiu de cèl·lules. És la principal font de proteïnes per al cultiu cel·lular.



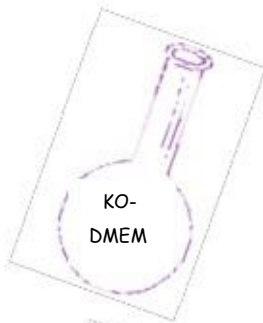
La glutamina és l'aminoàcid més abundant en el teixit muscular. Aquest preparat artificial conté glutamina, en aquest cas fa la funció de complement alimentari i a més, prevé la degradació i l'acumulació d'amoniac fins i tot en cultius de llarg termini, de manera que les cèl·lules creixen en millors condicions.



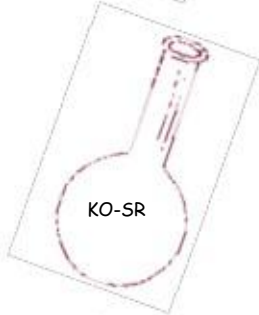
La penicil·lina i l'estreptomicina són dos antibiòtics, que com la resta, maten o impedeixen el creixement de certes classes de microorganismes, generalment bacteris. És més difícil que el cultiu es contami.



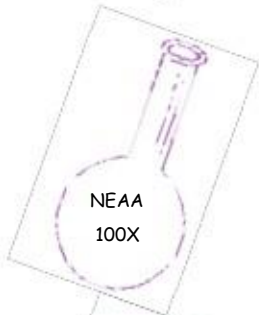
Aquest medi és una modificació del BME, el qual s'utilitza per a cèl·lules que s'adhereixen a la placa, només s'ha augmentat la concentració de vitamines i aminoàcids per permetre el cultiu de cèl·lules embrionàries de ratolí i altres cultius primaris.



És un medi dissenyat, com tots els altres, per millorar el creixement i la morfologia de les cèl·lules. Aquest medi imita millor l'ambient natural dels teixits embrionaris, de tal manera que les cèl·lules es troben millor. A més, redueix de forma significativa la possible diferenciació de les cèl·lules.



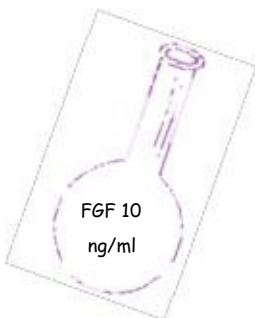
És un compost lliure de sèrum, de tal manera que pot substituir l'FBS, ja que també manté les cèl·lules en estat de pluripotència i aquestes creixen correctament i de forma relativament ràpida.



És un suplement de proteïnes que, com la resta, ajuda a mantenir el creixement del cultiu cel·lular, aportant-li més aliment a les cèl·lules.

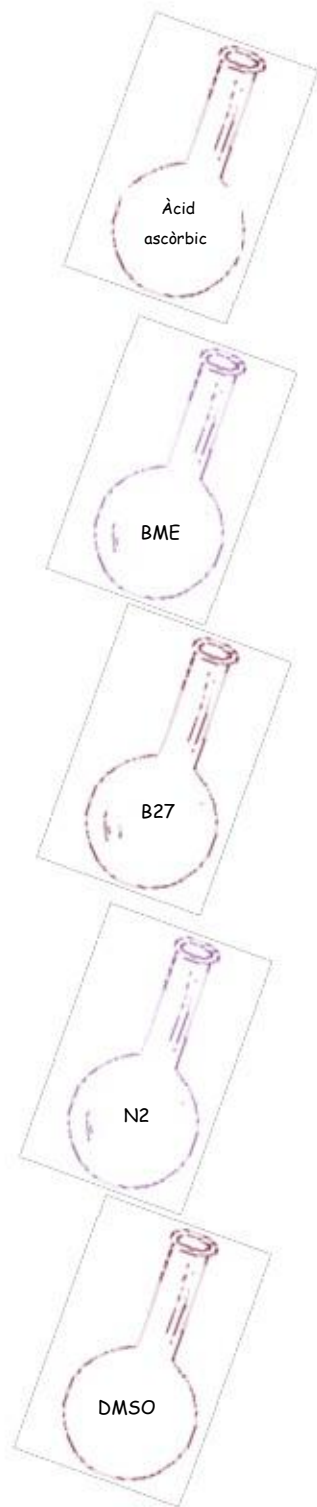


És un component químic que s'utilitza per reduir els ponts disulfur i pot actuar com a antioxidant biològic. Desnaturalitza proteïnes i ribonucleases²⁴.



Són una sèrie de factors de creixement implicats en el desenvolupament embrionari. Són unes proteïnes que interaccionen amb la superfície cel·lular i s'ha demostrat que són essencials per a la transducció de senyals en processos de diferenciació i proliferació cel·lular.

²⁴És un enzim que catalitza (fa més ràpida la velocitat de la reacció) la hidròlisi de l'RNA en components més petits.



L'àcid ascòrbic, o vitamina C, és un àcid orgànic soluble en aigua, amb propietats antioxidants. L'afegim quan volem obtenir teixit cel·lular del mesoderma.

És un medi que compleix els requisits especials pel cultiu de cèl·lules neuronals. Permet el manteniment a llarg termini d'aquestes cèl·lules sense necessitat de cultivar-les sobre una capa de feeders.

És el primer suplement lliure de sèrum per a cultiu de cèl·lules neuronals a llarg termini, permet que les cèl·lules creixin correctament.

És un suplement per complementar els factors de creixement (com l'FGF), lliure de sèrum i de constitució definida. S'utilitza per a cultius primaris i de neurones.

És un líquid orgànic incolor que conté sofre. Únicament l'afegim al medi de congelació. Hem de tenir cura ja que, a temperatura ambient, és tòxic per les cèl·lules.

1.3.2. Objectiu

L'objectiu principal és mantenir les cèl·lules en estat de pluripotència per poder amplificar el cultiu, ja sigui per congelar o per diferenciar i dur a terme els projectes d'investigació.

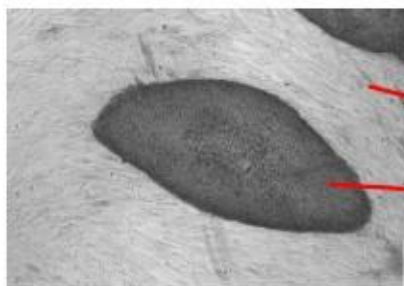
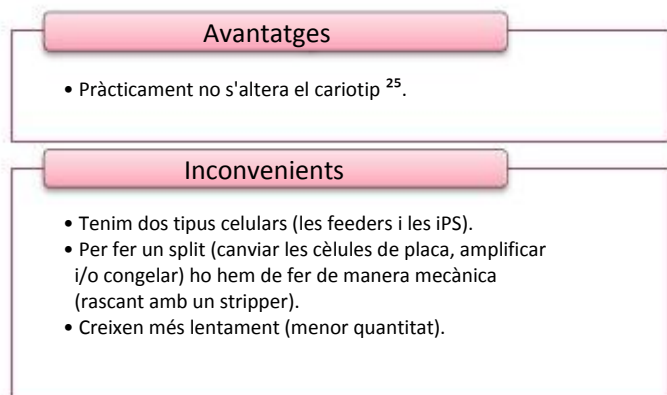
1.3.3. Material i/o reactius

- Medis de cultiu
- Feeders
- Matrigel
- Gelatina 0,1%
- Stripper (pas mecànic)
- Tripsina 0,05% (pas enzimàtic)
- Cultius cel·lulars amb els quals estem treballant

1.3.4. Procediment

- Un cop hem transfectat les cèl·lules (reprogramació cel·lular), les hem de posar a créixer sobre feeders, condició que anomenem “co-cultiu” i hem de canviar el medi (HES) cada dia, per tal de reposar nutrients i eliminar productes de rebuig. Per fer un co-cultiu, primer de tot hem de fer un recobriment a les plaques (coating) per assegurar-nos que les feeders s’adhereixen bé. Simplement hem de posar 1 ml de gelatina a cada placa durant uns minuts i aspirar el líquid restant. A continuació afegir 1 ml de IMDM, sembrar les feeders i afegir 1 ml més de IMDM.

El fet que les cèl·lules creixin sobre feeders, ens aporta una sèrie d'avantatges i d'inconvenients que podem veure reflectits a continuació:



Feeders

iPS (colònia)

Figura 20: Cèl·lules iPS sobre feeders - Augments: 4X -

²⁵ Entenem per cariotip la composició fotogràfica dels cromosomes (petit cossos que organitzen la cromatina, material que aporta la informació genètica dels organismes eucariotes) d'una cèl·lula, ordenats segons un patró estàndard.

- Un cop les cèl·lules comencin a créixer bé sobre feeders (aproximadament 7, 10 o 12 dies) les podem passar a una altra placa sense co-cultiu, és opcional, però té força avantatges i un sol inconvenient:

Per això hem de recobrir una nova placa amb matrigel, un medi líquid que conté matriu extracel·lular de tumors de ratolins, ric en proteïnes i factors de creixement i posar-hi medi condicionat. A continuació rascarem amb l'stripper les cèl·lules de la placa actual (que es troben sobre feeders) i les passarem a la nova placa recoberta de matrigel i amb medi condicionat.

- Quatre o cinc dies després observem que la quantitat de cèl·lules ha augmentat significativament, de manera que és recomanable fer un split (un divisió del cultiu), per amplificar i congelar. Per fer l'split, en aquest cas no ho fem de manera mecànica, sinó de manera enzimàtica (amb un enzim, la tripsina, que aixeca les cèl·lules adherides a la placa), de manera que ens resulta més fàcil amplificar.

1.3.5. Resultats i interpretació

Recordem que, en gran part, del cultiu cel·lular depenen els òptims resultats de la reprogramació cel·lular i de les futures investigacions. Seguint el procediment explicat anteriorment, hem obtingut diversos subcultius arrel de tornar a sembrar un o diversos tipus de cèl·lules, és a dir, de fer splits. Dels millors subcultius hem generat línies cel·lulars estables amb les quals treballarem durant les investigacions, abans però hem congelat diverses mostres pels imprevistos que pugui haver-hi. S'ha de tenir en compte que la fase de cultiu és llarga i contínuament es fan splits (tant mecànics com amb enzims), es congelen i es descongelen mostres i es renoven els cultius.

Avantatges

- Obtenim una quantitat major de cèl·lules en menys temps.
- Tenim les cèl·lules en estat pur.
- L'split és enzimàtic (molt més fàcil de realitzar).

Inconvenients

- Cariotip més inestable.



Figura 21: iPS creixent sobre matrigel - Augments: 3X -

ESQUEMA DE CONDICIONS DE CULTIU

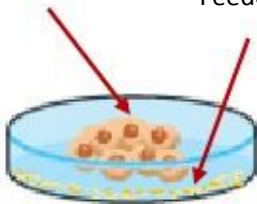


Posem les cèl·lules reprogramades a créixer sobre feeders (fibroblasts humans irradiats perquè no proliferin, però que continuïn vius)

Recobrim les plaques amb matrigel

Trossets de colònies d'iPS

Feeders



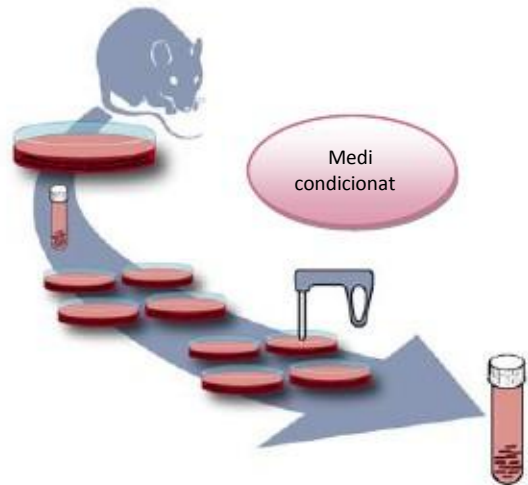
Canviem el medi de cultiu cada dia

7 - 10 - 12 dies

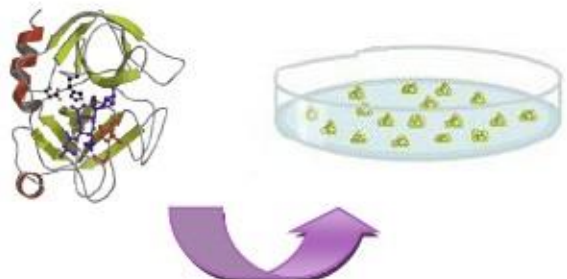


Split de manera mecànica (rasquem amb l'stripper)

Aspirem el matrigel i afegim medi condicionat



Split de manera enzimàtica (la tripsina aixeca les cèl·lules adherides a la placa)



1.4. Caracterització

La caracterització consisteix en una sèrie de proves (o experiments) que és imprescindible fer a les cèl·lules per verificar que realment tenen les característiques desitjades, en el nostre cas totes les proves de caracterització tenen com a objectiu general comprovar la bona reprogramació cel·lular i, com a conseqüència, l'estat de pluripotència de les cèl·lules. També fem proves de caracterització un cop diferenciem les cèl·lules en un teixit cel·lular concret, en aquest cas busquem verificar que les cèl·lules ja no presenten les característiques pròpies de les cèl·lules mare pluripotents, sinó que ara expressen les característiques d'un tipus cel·lular concret.

1.4.1. Morfologia

1.4.1.1. Introducció

És una de les proves de caracterització més bàsica que hi ha, però a la vegada més elemental, ja que si la morfologia de les colònies no és l'adequada, no és factible fer la resta de proves de caracterització. Només es tracta d'observar al microscopi les plaques de reprogramació i, si ho creiem convenient, fer alguna fotografia.

1.4.1.2. Objectiu

Observar al microscopi òptic colònies d'iPS correctament reprogramades, és a dir que tinguin les vores ben definides i les cèl·lules siguin compactes i uniformes. També és d'esperar que trobem colònies que només estiguin parcialment reprogramades i altres que tinguin alguna part diferenciada.

1.4.1.3. Material i/o reactius

- Plaques a visualitzar
- Microscopi òptic

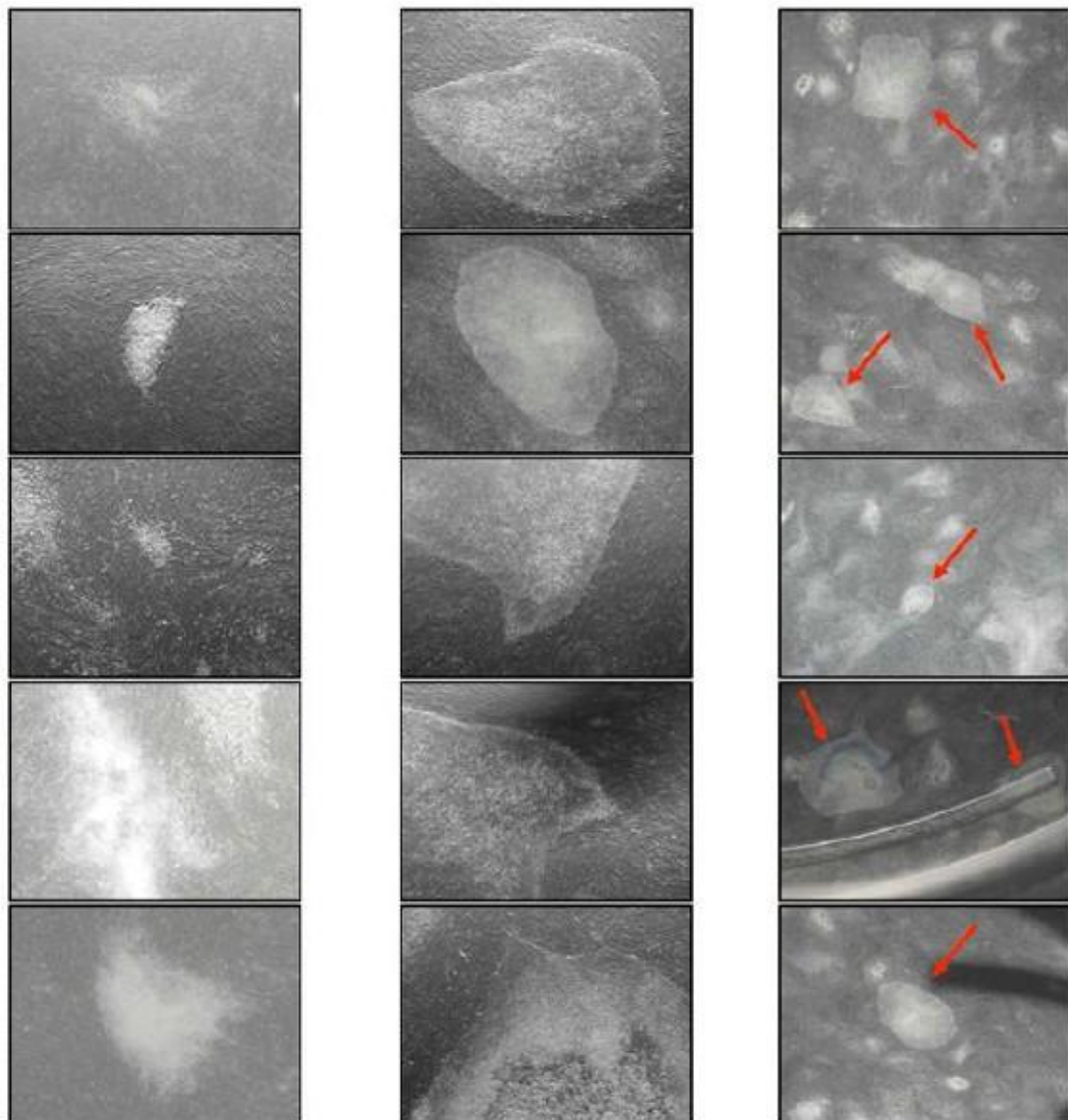
1.4.1.4. Procediment

- Abans de mirar la morfologia de les cèl·lules és convenient canviar el medi de cultiu.
- A continuació posem la mostra al microscopi òptic (a uns 20X augments) i enfoquem fins que visualitzem correctament les colònies.

- Si volem podem fer alguna fotografia amb el microscopi per així observar millor una colònia, fins i tot mesurar el seu diàmetre i la quantitat de cèl·lules.

1.4.1.5. Resultats i interpretació

Els resultats que vam obtenir van ser força positius. Hi havia colònies que encara no estaven del tot reprogramades, altres en canvi estaven perfectament definides i les cèl·lules eren compactes i uniformes.



Parcialment reprogramades

Totalment reprogramades

Plaques de cultiu en reprogramació

1.4.2. Fosfatasa alcalina

1.4.2.1. Introducció

La fosfatasa alcalina és un enzim hidrolasa²⁶, responsable d'eliminar grups fosfats de diversos tipus de molècules com nucleòtids o proteïnes.

Les fosfatases alcalines són enzims que es troben presents en gairebé tots els teixits de l'organisme, sent particularment altes en les cèl·lules pluripotents, de manera que, si nosaltres afegim el substrat adequat, es produeix (o s'hauria de produir, si les cèl·lules realment son pluripotents) una reacció química acolorida.

El substrat que li afegirem és un compost artificial, p-nitrofenil-fosfat, que al posseir una resta orgànica unida amb un grup fosfat, pot ser reconeguda per l'enzim. El substrat, en ser hidrolitzat, origina un producte, el p-nitrofenol, un compost acolorit. Si volem detenir la reacció hem d'afegir fosfat, ja que l'excés d'aquest producte, inhibeix l'activitat enzimàtica.

Cal dir que, un cop que es produeix aquesta reacció, les cèl·lules moren.

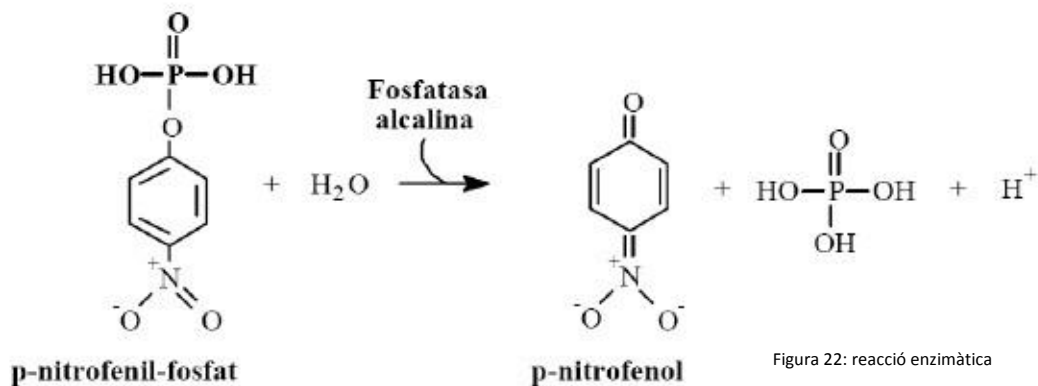


Figura 22: reacció enzimàtica

1.4.2.2. Objectiu

Avaluar l'eficiència de la reprogramació mitjançant la visualització de colònies pluripotents tenyides de color blau.

²⁶Enzim capaç de catalitzar (augmentar la velocitat d'una reacció química) la hidròlisi d'un enllaç química.

1.4.2.3. Material i/o reactius

- Kit de tinció fosfatasa alcalina (Stemgent)
 - Solució fixadora 25 ml
 - AP Solució A 10 ml
 - AP Solució B 10 ml
 - AP Solució C 10 ml
- PBS
- Tubes de 15 ml

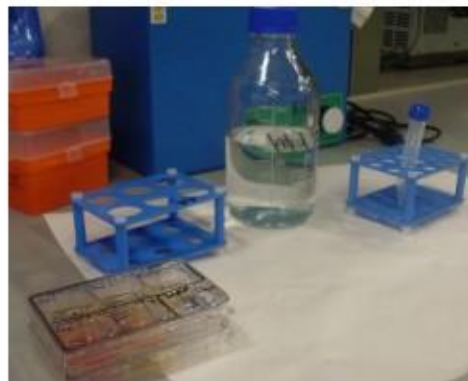


Figura 23: Preparació del material per la tinció

1.4.2.4. Procediment

- Primer preparem la solució fixadora amb 9 ml de PBS i formaldehid al 37% (que ho trobem en el kit sota el nom de “solució fixadora”).
- Aspirem el medi de cultiu i fem dos rentats amb PBS.
- A continuació afegim la quantitat suficient de solució fixadora (acabada de preparar) per cobrir el fons de la placa. Incubem a temperatura ambient durant 3-4 minuts.
- Mentrestant preparem la solució de substrat (amb el material del kit). Barregem quantitats iguals de la solució A (blanc) i la solució B (groc), un cop ho tinguem, ho protegim de la llum solar amb paper d'alumini. Al cap de 3 minuts afegim la solució C.
- Aspirem la solució de fixació i afegim la quantitat suficient de solució de substrat per cobrir la placa.
- Incubem a temperatura ambient en la foscor durant 20 minuts.
- Per últim, aspirem el substrat i afegim PBS.

1.4.2.5. Resultats i interpretació

Observem que s'ha produït una reacció acolorida, les cèl·lules han quedat tenyides de color blau, per tant podem confirmar que expressen fosfatasa alcalina i, tot hi que hem de fer la resta de proves de caracterització, és un indicatiu que la reprogramació ha sigut eficient i les cèl·lules han adquirit la capacitat de pluripotència.

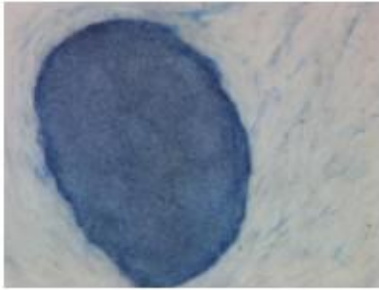


Figura 24: Colònia pluripotent tenyida de color blau després d'haver fet la tinció - Augments: 4X -

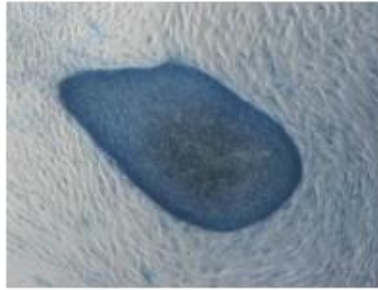


Figura 25: Colònia pluripotent tenyida de color blau després d'haver fet la tinció - Augments: 4X -

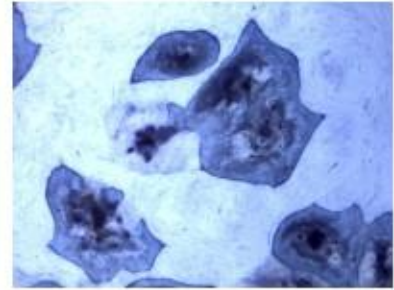


Figura 26: Colònies parcialment diferenciades (la part més fosca) després d'haver fet la tinció - Augments 4X -

1.4.3. Immunofluorescència o marcatge amb anticossos fluorescents

1.4.3.1. Introducció

Qualsevol antigen pot ser marcat específicament amb un fluorocrom²⁷ acolorit, a través d'un anticòs específic. Quan irradiem aquest element amb llum ultraviolada es fa fluorescent. La immunofluorescència, o marcatge amb anticossos, tracta bàsicament d'això. En aquest cas realitzarem marcatges amb anticossos fluorescents que reconeixen proteïnes que són exclusives de les cèl·lules mare embrionàries, de manera que si aquestes proteïnes estan presents vol dir que les cèl·lules han adquirit la capacitat de pluripotència i el comportament és gairebé igual al de cèl·lules mare embrionàries.

Hi ha dos tipus d'immunofluorescència:

- Immunofluorescència directa (IFD o primària)

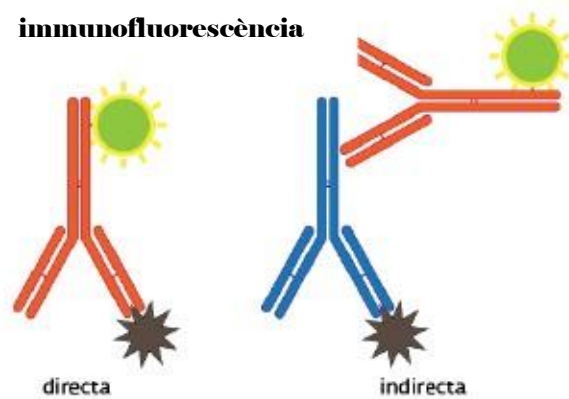
L'IFD fa ús d'un sol anticòs que es troba químicament unit a un fluorocrom. L'anticòs reconeix la molècula diana (la proteïna que estem buscant) i s'uneix a ella directament.

En el nostre cas, com que utilitzem aquesta tècnica com una tinció, la regió on es diposita la molècula diana pot ser identificada al microscopi de fluorescència com una zona brillant.

²⁷Són molècules que al ser excitées amb energia d'una determinada longitud d'ona són capaces d'emetre energia d'una longitud d'ona major.

- Immunofluorescència indirecta (IFI o secundària)

L'IFI fa ús de dos anticossos: l'anticòs primari, és el que reconeix i s'uneix a la molècula diana, i l'anticòs secundari que és el que es troba marcat amb el fluorocrom, reconeix al primari i s'uneix a ell. Aquesta tècnica és una mica més complexa que la IFD, requereix més passos i s'ha de tenir més cura, ja que és més probable que pateixi interferències, però en contrapartida és molt més flexible que la tècnica directa i, degut a què és possible que un anticòs primari s'uneixi a més d'un anticòs secundari, implica un efecte d'amplificació i ens permet jugar amb fluorocroms de diferents colors i reconèixer diverses proteïnes a la vegada, la qual cosa amb la IFD és més complicat d'aconseguir.



1.4.3.2. Objectiu

Observar marques fluorescentes en aquelles cèl·lules (o colònies) que presentin proteïnes exclusives de les cèl·lules mare embrionàries per així confirmar l'eficàcia de la reprogramació i verificar que les cèl·lules han adquirit la capacitat de pluripotència i que el comportament és molt similar a les cèl·lules mare embrionàries.

1.4.3.3. Material i/o reactius

- TBS+ : 0,1% de triton diluït en TBS
- TBS++ : 3% de donkey serum i 0,3% de triton diluït en TBS
- Anticossos necessaris
- DAPI 1:5000: DAPI diluït 1:5000 en TBS++
- Medi de muntatge (PVA/DABCO)

1.4.3.4. Procediment

- Immunofluorescència directa (IFD o primària)
 - Aspirem el medi de cultiu i afegim 1 ml de medi nou.
 - Afegim 10 µl de l'anticòs a la mateixa placa.
 - Posem a incubar (a 37°C, 5% de CO₂ i 5% d'O₂) durant 30 minuts.
- Immunofluorescència indirecta (IFI o secundària)
 - Primer de tot rasquem (de manera mecànica) les cèl·lules i posem una mostra sobre un portaobjectes.
 - A continuació fem 3 rentats amb PBS de 5 minuts cadascun (durant aquest temps deixem la mostra a temperatura ambient).
 - Fixem els portaobjectes amb paraformaldehid al 4% (una substància que serveix per fixar) i els deixem durant 30 minuts a temperatura ambient.
 - Rentem els portes 3 vegades amb TBS + per permeabilitzar²⁸ la membrana i els deixem 15 minuts a temperatura ambient. És necessari permeabilitzar la membrana per permetre l'entrada dels anticossos, la substància que utilitzem per permeabilitzar és el triton, que es troba a la solució de TBS +.
 - Bloquegem les mostres, això significa que afegim proteïnes al medi (sèrum) perquè els anticossos no s'enganxin inespecíficament.
 - Afegim TBS ++ i ho deixem durant 2 hores a temperatura ambient.
 - Incubem les mostres a 4°C amb els anticossos primaris diluïts en TBS ++.
 - Tornem a rentar tres cops amb TBS ++ i deixem les mostres 10 minuts més a temperatura ambient.
 - Bloquegem les mostres durant 2 hores a temperatura ambient, aquest cop amb els anticossos secundaris.
 - Rentem els portes dos vegades amb TBS + i els deixem 10 minuts a temperatura ambient. A continuació, rentem un cop més amb TBS + i ho deixem 15 minuts més a temperatura ambient.
 - Incubem amb DAPI 1:5000 (un colorant blau del DNA) durant 10 minuts a temperatura ambient.
 - Rentem 2 vegades amb TBS + i ho deixem 15 minuts a temperatura ambient.

²⁸ La membrana cel·lular, constituïda per fosfolípids, glicolípids i proteïnes, regula l'entrada i sortida de substàncies a la cèl·lula; per permetre l'entrada dels anticossos cal permeabilitzar-la (fer-la permeable).

- Muntem els portaobjectes. Apliquem una gota de PVA/DABCO i finalment, ho precintem amb NailPolish i ho deixem assecar.

1.4.3.5. Resultats i interpretació

- Immunofluorescència directa (IFD o primària)

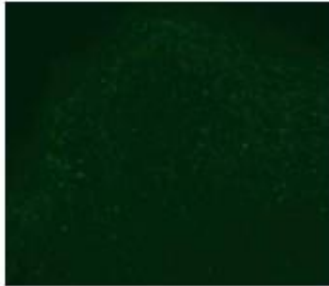


Figura 27: IFD (imatge real)
- Augments: 20X -

En l'observar la mostra al microscopi, podem percebre una lleu fluorescència de color verd, la qual cosa ens indica que les cèl·lules estan adquirint la capacitat de pluripotència. Aquesta immunofluorescència pertany a una placa de reprogramació d'unes 2-3 setmanes, de manera que és normal que la fluorescència que observem sigui molt lleu.

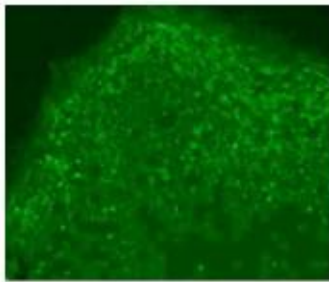


Figura 28: IFD (imatge modificada) - Augments: 20X -

Al marge observem la mateixa fotografia, amb l'excepció que la figura 28 ha hagut de ser lleument modificada, s'han augmentat els nivells de brillantor i contrast per observar correctament la fluorescència a la imatge impresa.

- Immunofluorescència indirecta (IFI o secundària)

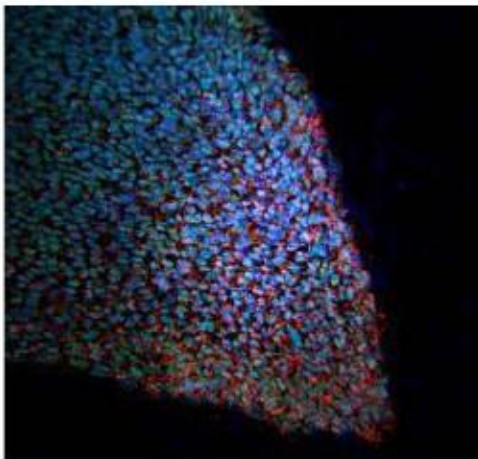


Figura 29: IFI - Augments: 40X -

En l'observar la mostra al microscopi, constatem que les cèl·lules presenten les proteïnes que buscàvem de manera que podem dir que han adquirit la capacitat de pluripotència i tenen les característiques de les cèl·lules mare d'origen embrionari.

El color vermell i el color verd corresponen a marcadors embrionaris diferents. El blau és un colorant del DNA que s'anomena DAPI.

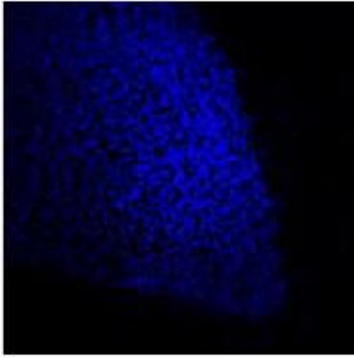


Figura 30: Marcatge amb DAPI
- Augments: 40X -

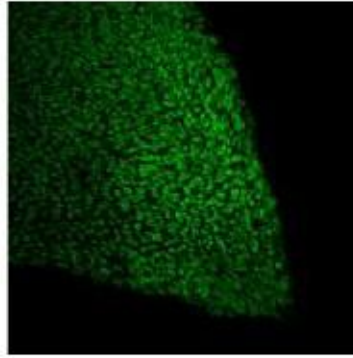


Figura 31: Marcatge amb SSEA4
- Augments: 40X -

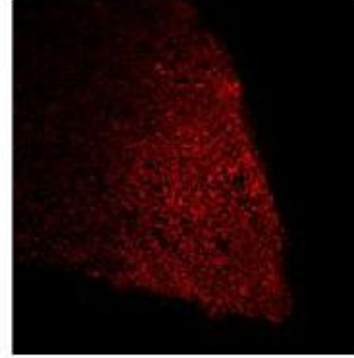


Figura 32: Marcatge amb Nanog
- Augments: 40X -

○ Immunofluorescència directa i indirecta

Durant la meua estada al laboratori, a més de fer una IFD i una IFI, vaig fer una immunofluorescència en una mica més complexa. Vam fer servir 4 mostres diferents, en una mostra només utilitzàvem un anticòs primari marcat amb un fluorocrom (IFD); en una altra, un anticòs primari sense marcar i un de secundari marcat amb un fluorocrom d'un altre color (IFI), i a les altres dues vam utilitzar anticossos primaris marcats amb fluorescència, altres sense marcar i anticossos secundaris. Algunes proteïnes eren reconegudes per l'anticòs primari i directament emetien fluorescència, altres eren reconegudes per l'anticòs primari, però fins que no s'acoblava el secundari no emetien fluorescència. Aquesta immunofluorescència no era per caracteritzar iPS, sinó per caracteritzar cardiomiòcits²⁹ diferenciats a partir d'iPS; tot i així, he trobat convenient exposar els resultats ja que van ser positius:

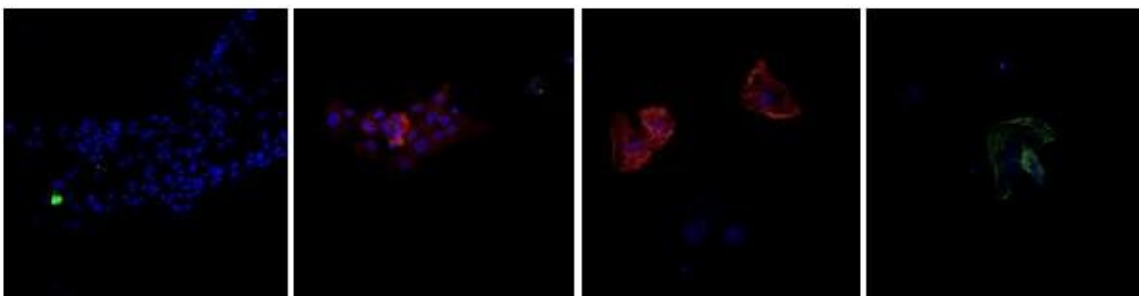


Figura 33: el color blau correspon al DAPI (colorant del DNA que marca el nucli de les cèl·lules), el verd a l'anticòs secundari Cy2 que està conjugat amb l'anticòs primari *Actin* (sense fluorocrom), el taronja a l'anticòs primari *Sirpa*, que en una mostra està conjugat amb l'anticòs secundari Cy3 (de color vermell) per amplificar la senyal (la fluorescència) de *Sirpa* que desapareix molt ràpidament - Augments: 20X -

²⁹ Cèl·lules del miocardi o múscul cardíac capaces de contreure's de forma espontània i individual.

1.4.4. PCR

1.4.4.1. Introducció

La clonació és una de les millors maneres d'aconseguir una gran quantitat de còpies d'un determinat segment de DNA, però si la quantitat inicial és molt petita o és impura, la clonació no es pot dur a terme; en aquest cas s'utilitza la tècnica de la PCR o reacció en cadena de la polimerasa, una tècnica de biologia molecular desenvolupada el 1985 per Kary Mullis.

La tècnica de la PCR té multitud d'aplicacions, una d'elles és la que ens permet controlar i detectar els fragments de DNA del nostre interès. D'aquesta manera podem saber si un gen s'ha introduït o no al genoma de la cèl·lula. Recordem que durant la reprogramació cel·lular vam introduir 4 factors de transcripció que regulen l'expressió d'un grup de gens (el de la pluripotència). Amb aquesta tècnica volem verificar que la cèl·lula expressa els gens de pluripotència i els factors de transcripció per si mateixa, de manera endògena.

La base teòrica de la PCR és la següent:

Aquesta tècnica s'inicia disposant en el medi adequat el DNA inicial que conté la seqüència diana, un DNA-polimerasa especial resistent a la calor (en aquest cas utilitzarem la Taq pol³⁰), els quatre tipus de desoxiribonucleòtids trifosfats³¹ i dos segments de DNA monocatenari complementaris dels extrems del DNA inicial que actuen com a encebadors. Partint del DNA inicial, una DNA polimerasa incorpora nucleòtids complementaris a cada cadena originada per la unió dels "primers" o encebadors amb el motlle que volem amplificar. El procés costa de tres fases:

- Desnaturalització: en primer lloc és necessari desnaturalitzar el DNA inicial, per aconseguir la separació de les dues cadenes s'ha d'eleva la temperatura fins a 94°C.

³⁰ Taq polimerasa és un enzim que va ser aïllat per primer cop el 1969 per Thomas Brock en una font del parc nacional de Yellowstone en el bacteri termòfil *Thermus aquaticus*, que viu en fonts hidrotermals submarines. És capaç de suportar temperatures molt elevades com les requerides durant la PCR. Pot mantenir la seva activitat enzimàtica fins als 72 C, tot i que la seva termoestabilitat és tal que resisteix una mitjana de 40 minuts a 95°C.

³¹ S'utilitzen com a font de nucleòtids i, a més, aporten energia.

- Hibridació: en aquesta fase actuen els “primers” (o encebadors³²) unint-se per complementarietat al DNA inicial ja desnaturalitzat. En aquesta segona fase la temperatura oscil·la entre 50°C i 65°C.
- Elongació: finalment actua el DNA-polimerasa incorporant nucleòtids complementaris a partir de l'extrem 3'. La temperatura en aquesta fase utilitzant la Taq pol és de 72°C.

Per dur a terme la caracterització d'iPS no només fem servir la PCR convencional, sinó que a més utilitzem la Q-PCR i la RT-PCR.

La PCR amb retrotranscriptasa inversa³³ (RT-PCR) és una variant de la PCR convencional en la qual utilitzem RNA com a motlle inicial, en comptes de DNA, i es fa ús d'una retrotranscriptasa inversa per realitzar la síntesi d'un DNA complementari (DNAc) a partir de l'RNA.

La PCR en temps real o PCR quantitativa (Q-PCR) té com a característica principal que permet quantificar la quantitat de DNA o RNA present a la mostra original, és a dir, no només podem observar si un gen s'ha introduït o no al genoma de la cèl·lula, sinó que a més ens permet constatar a quins nivells s'expressa. El procediment segueix el principi general de la reacció en cadena de la polimerasa, la seva característica clau és que el DNA amplificat es detecta mentre progressa la reacció en temps real. Hi ha dos mètodes per a la detecció del producte (el DNA amplificat) en temps real:

- La tècnica basada en fluorocroms no específics
- La tècnica basada en sondes específiques

En la tècnica basada en fluorocroms el DNA, que veu multiplicada la seva quantitat amb cada cicle, s'uneix al fluorocrom (generalment SYBR Green) produint fluorescència, que és mesurada per un termociclador apte per PCR en temps real. La tècnica basada en sondes de DNA consisteix en oligonucleòtids³⁴ que estan marcats amb un indicador fluorescent que permet la detecció només després de la hibridació de la sonda amb la diana de DNAc; el senyal de fluorescència resultant permet mesurar

³² És una cadena curta d'àcid nucleic que serveix com a punt d'inici per a la replicació del DNA.

³³ Enzim que es troba present en els retrovirus i les cèl·lules.

³⁴ Seqüència curta de DNA o RNA, amb 50 parells de bases o menys.

quantitativament l'acumulació del producte durant les etapes exponencials de la PCR. TaqMan és una de les sondes més utilitzades donat que augmenta significativament la especificitat de la reacció.

1.4.4.2. Objectiu

Verificar que els transgens³⁵ utilitzats per reprogramar cèl·lules somàtiques en cèl·lules iPS han estat silenciats per la maquinària cel·lular quan les cèl·lules estan completament reprogramades, és a dir, volem verificar que les cèl·lules reprogramades expressen per si mateixes els gens que les hi vam incorporar. A més, esperem que aquestes cèl·lules expressin gens de pluripotència (com Cripto, NANOG o Rex1) i factors de reprogramació endògens (com KIF4, OCT4 o SOX2).

1.4.4.3. Material i/o reactius

- DNA motlle (genòmic) o RNA en el cas de la RT-PCR
- Primers (o encebadors) 4 µl
- Solució tampó o Buffer³⁶ (color verd) 5 µl
- Magnesi 2 µl
- DNA polimerasa (Taq pol) 0,3 µl
- Desoxiribonucleòtids trifosfats 1,5 µl
- H₂O 11,2 µl
- Retrotranscriptasa inversa (en el cas de la RT-PCR)
- SYBR Green o TaqMan (en el cas de la Q-PCR)
- Agarosa 1% (en el cas de la PCR convencional)
- Aigua destil·lada desionitzada (en el cas de la PCR convencional)
- Buffer que conté glicerol i colorant (en el cas de la PCR convencional)
- Marcador de pes molecular (en el cas de la PCR convencional)
- TBE, solució amortidora (en el cas de la PCR convencional)
- Bromur d'etidi (en el cas de la PCR convencional)
- Tubs de PCR (de 0,2 µl)
- Termociclador³⁷ (màquina de PCR)

³⁵ Gen d'un organisme que ha sigut incorporat al genoma d'un altre organisme.

³⁶ Manté el nivell de pH adequat perquè la DNA polimerasa pugui actuar.

1.4.4.4. Procediment

El procediment és el mateix tant per la PCR convencional, com per la PCR a temps real, com per la PCR amb retrotranscriptasa inversa, simplement afegim o suprimim algun dels passos.

- Només en el cas de la RT-PCR: fem la retrotranscripció a partir de l'RNA i amplifiquem a partir de la primera cadena de DNAc.
- Barregem tots els reactius excepte el DNA (que es diferent a cada mostra) i fiquem 2 µl de la barreja a cada tub. Només en el cas de la Q-PCR: afegim SYBRGreen o TaqMan.
- A continuació afegim el DNA, que és probable que no totes les mostres tinguin exactament la mateixa quantitat.
- Centrifuguem 1 minut.
- Programem el termociclador perquè faci 30 cicles. Normalment es programa perquè faci entre 25 i 35 cicles, 40 com a màxim, sinó es perd eficiència. Col·loquem la placa amb les mostres al termociclador. Trigarà 2 hores i 10 minuts.
- Només en el cas de la PCR convencional: preparem el gel per observar els resultats. Per a la preparació del gel hem de diluir 5 grams d'agarosa l'1% en 500 ml de TBE. Bullim la barreja, afegim bromur d'etidi a una concentració 1:1000 i ho deixem refredar. A continuació afegim la solució en una cubeta de 50 ml i li fiquem la pinta. Deixem polimeritzar (refredar) entre 20 i 40 minuts, després ho posem a la cubeta d'electroforesi amb líquid TAE, H₂O i sal i per últim carreguem el gel. Al gel hi posarem el DNA amplificat amb la tècnica de la PCR i un marcador de pes molecular.
 - Per preparar el marcador de pes molecular hem d'afegir en un tub:
 - 7 µl d'aigua destil·lada desionitzada
 - 3 µl del marcador de pes molecular
 - 2µl de buffer de la mostra

³⁷ Controla la temperatura de cada cicle d'amplificació.

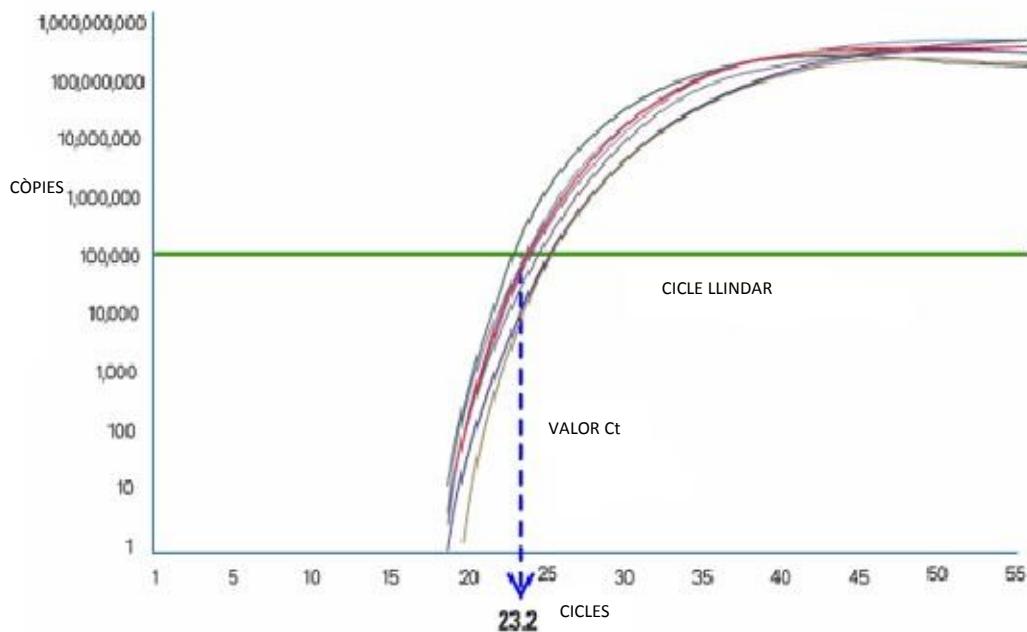
Amb una micropipeta de 20 µl aspirem les mostres preparades i les col·loquem una per una perpendicularment al gel d'agarosa (als pequets de la pinta). És important prendre nota d'on hem col·locat cadascuna de les mostres i el marcador de pes molecular.

1.4.4.5. Resultats i interpretació

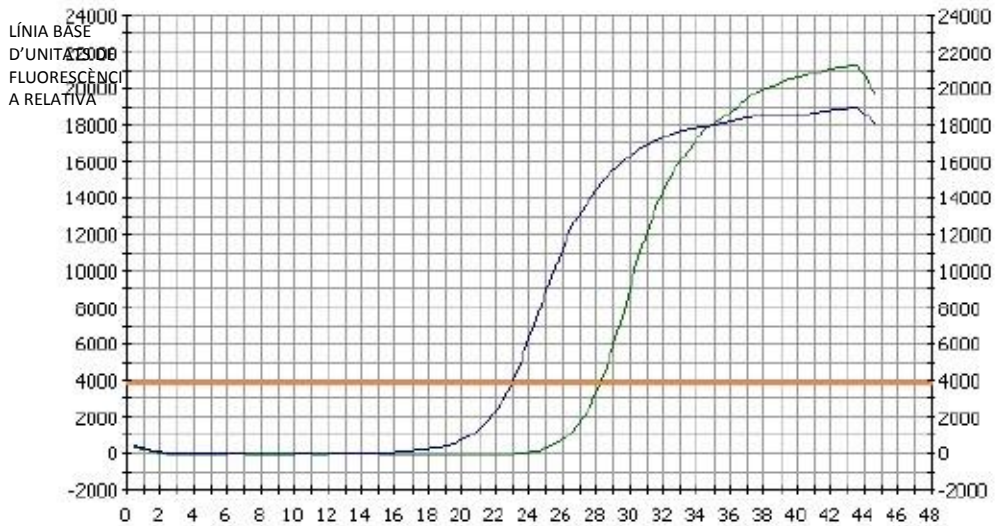
○ PCR a temps real o PCR quantitativa

Per caracteritzar les iPS hem fet una PCR quantitativa. La quantificació que fem és relativa, és a dir, analitzem els canvis d'expressió gènica en una mostra donada en relació a una altra mostra de referència (per exemple, una mostra control sense tractar).

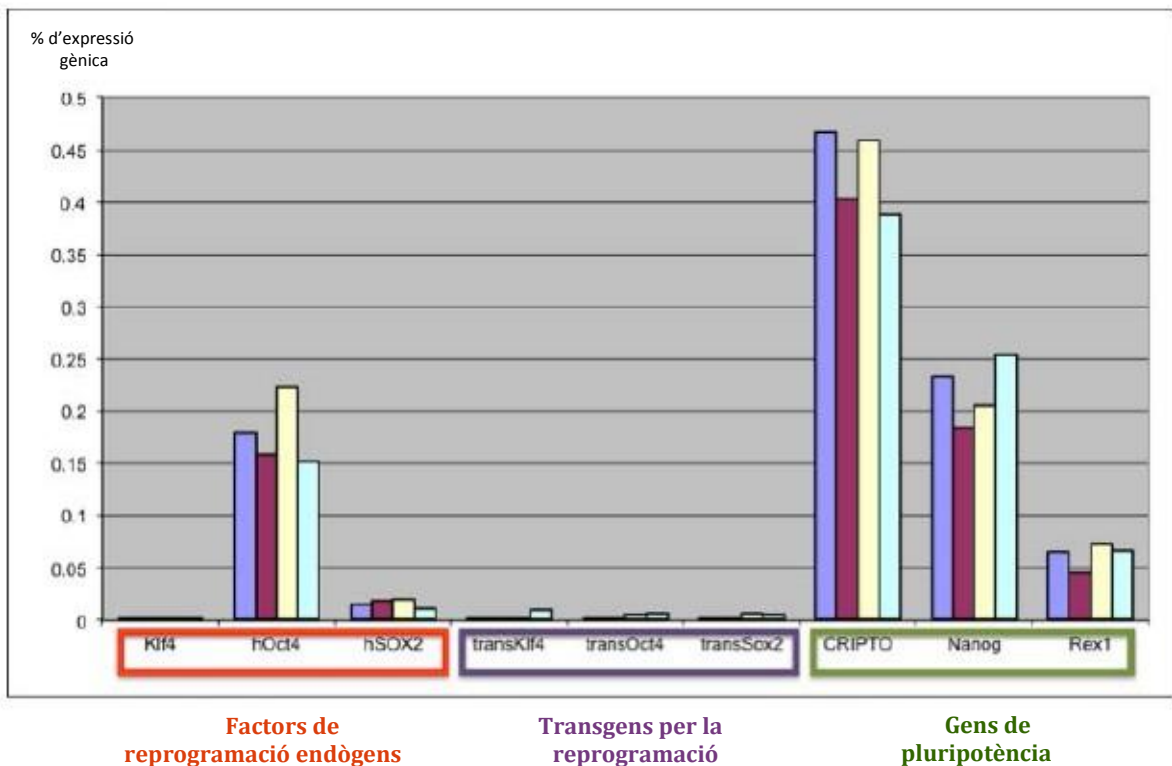
A la quantificació relativa utilitzem el valor Ct per calcular l'expressió relativa dels gens. El valor Ct és l'interacció entre la línia de llindar (quantitat mínima de senyal que ha de ser present per ser registrada per un sistema, en aquest cas la quantitat mínima de fluorescència) i la gràfica d'ampliació. Ct significa cicle llindar, i és el cicle de PCR en què la mostra arriba al nivell mínim de fluorescència.



Si els valors de Ct són baixos significa que hi ha més transcripció a la mostra en comparació amb valors alts de Ct. Nosaltres utilitzem un gen de control amb baixos valors de Ct amb la finalitat de normalitzar les mostres i calcular l'expressió relativa dels gens que ens interessen.



A continuació podem observar els resultat obtinguts (quantificats en relació amb l'expressió de GAPDH, gen control). A partir d'aquests resultats deduïm que les cèl·lules s'han reprogramat correctament, ja que expressen els transgens per si mateixes, els gens de pluripotència i els factors de reprogramació.



1.4.5. Diferenciació *in vitro*

Mentre que les cèl·lules mare pluripotents es mantinguin en cultiu en les condicions adequades, poden romandre indiferenciades, però si permetem que les cèl·lules s'agrupin formant cossos embriònics, començaran a diferenciar-se espontàniament. La diferenciació espontània és un bon indicador de què el cultiu de cèl·lules realment ha adquirit la capacitat de pluripotència, per això també serveix com a prova de caracterització, però tot i així és una manera ineficaç de produir cultius de tipus cel·lulars específics.

Per tant, per generar cultius de determinats tipus de cèl·lules, hem de controlar el procés de diferenciació, per això un cop formats els cossos embriònics hem de canviar les condicions de cultiu. Cada tipus cel·lular concret ha de seguir un protocol diferent, hem de preparar cultius sota condicions especials per permetre que les cèl·lules iPS donin lloc a diversos tipus de cèl·lules adultes. Així doncs, el fet que una cèl·lula indiferenciada generi un tipus cel·lular específic depèn principalment del medi i de les condicions de cultiu.

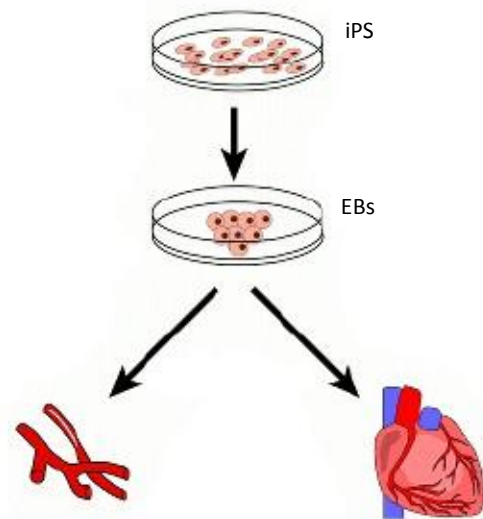


Figura 34: Diferenciació sota condicions especials

La diferenciació *in vitro* és un procés llarg; és per això que durant la meua estada no n'he pogut veure tota l'evolució, però vaig observar resultats de teixits cel·lulars diferenciats a partir d'iPS.

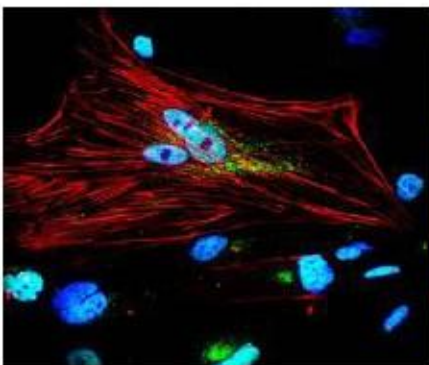


Figura 35: Cèl·lules cardíques diferenciades a partir d'iPS - Augments: 63X -

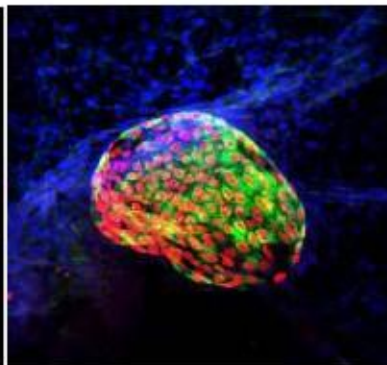


Figura 36: Hepatòcits diferenciats a partir d'iPS - Augments: 40X -

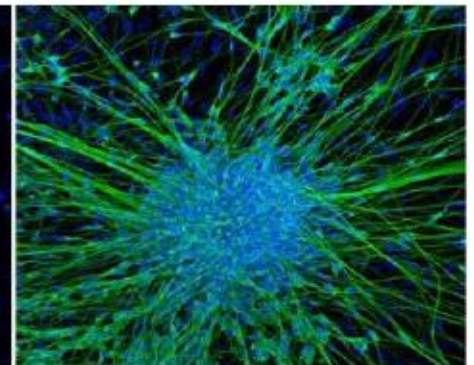


Figura 37: Neurones diferenciades a partir d'iPS - Augments: 40X -

1.4.6. Diferenciació *in vivo*

De la mateixa manera que podem demostrar la capacitat de diferenciació *in vitro*, també podem evidenciar la capacitat de diferenciació *in vivo*.

Injectar les cèl·lules en un ratolí amb el sistema immunitari debilitat per comprovar la formació d'un tumor benigne anomenat teratoma, és la prova de caracterització d'IPS més conclouent.

Donat que el sistema immunològic del ratolí està debilitat, les cèl·lules mare humanes injectades no son rebutjades i podem observar el seu creixement i diferenciació. El resultat d'aquesta diferenciació són els teratomes, tumors benignes que contenen una barreja de moltes cèl·lules diferenciades o parcialment diferenciades, la prova clau que ens indica que les cèl·lules reprogramades han adquirit la capacitat de pluripotència i són capaces de diferenciar-se en múltiples tipus cel·lulars.

Aquesta pràctica no la vaig poder dur a terme donat que no està permès tractar amb els ratolins sense tenir el títol corresponent, tot i així vaig observar teratomes que havien sigut extrets de ratolins immunodeficients als quals anteriorment, aproximadament un parell de mesos abans, els hi havia injectat iPS.



Figura 38: Teratoma en PBS

CONCLUSIONS FINALS

- Un cop generades les iPS, l'objectiu clau d'aquesta investigació era esbrinar si un cop reprogramades les cèl·lules adultes, per fer-les pluripotents, tenien les mateixes característiques que les cèl·lules mare d'origen embrionari i, després de realitzar totes les proves de caracterització podem afirmar que sí, que realment compleixen tots els requisits de les cèl·lules mare embrionàries. Abans de proposar aquest objectiu però, s'havia proposat de manera poc explícita la següent pregunta, que es contesta al llarg del treball: "Com és possible generar cèl·lules pluripotents a partir de cèl·lules adultes del nostre cos?". Una resposta breu és: simplement duent a terme una reprogramació cel·lular.
- Qualsevol mínim error et pot destrossar una investigació. S'ha de tenir molta cura i, sobretot, fer rèpliques de cadascun dels experiments. No és suficient si els resultats els obtenim una sola vegada.
- Actualment ens movem en un món on la ciència i la tecnologia té un gran pes, molts de nosaltres podríem dir que no seriem capaços de viure sense ambdues coses, però no només això, de cara al món de la medicina per exemple, gran part dels medicaments, les vacunes i altres cures són el resultat de la ciència i la tecnologia. En la ciència actual, encara que molta gent es negui a considerar-ho així, utilitzen les propietats biològiques de tot tipus d'éssers vius, ja sigui amb el DNA modificat o no, per millorar la salut i la vida humanes.
- Des de l'aplicació mèdica d'aquesta ciència s'han resolt molts misteris de la vida i, encara que sembla que la medicina regenerativa i, en especial les cèl·lules mare, estan lluny de ser una aplicació mèdica estesa, en un futur no molt llunyà, ho serà.
- M'ha servit molt aquesta investigació de cara al futur, i no cal dir que és un món on queda molt per explorar, però realment val la pena continuar-hi.

ANNEXOS

1. Centre de recerca i equip d'investigació

La part pràctica d'aquest treball la vaig realitzar durant els mesos de juliol i agost als laboratoris de l' Institut de Bioenginyeria de Catalunya (l'IBEC), que es troba al recinte del Parc Científic de Barcelona (PCB). La ubicació de l'IBEC al PCB ofereix un entorn biomèdic molt estimulant, en el qual l'institut pot treballar en col·laboració amb altres entitats públiques i privades, a més d'aquesta manera té accés a potents mitjans tecnològics com la plataforma de nanotecnologia.

L'institut estableix estrets vincles amb centres internacionals d'investigació, universitats, hospitals i la indústria per executar projectes i intercanviar talent.

Actualment, l'institut té 15 grups d'investigació distribuïts en 6 programes; jo vaig realitzar les pràctiques amb el grup d'investigació "Control de potència de cèl·lules mare" que està inclòs al programa de biotecnologia cel·lular.

Programes d'investigació:

- Biotecnologia Cel·lular
- Biomecànica i biofísica cel·lular
- Nanobiotecnologia
- Biomaterials, implants i enginyeria de teixits
- Senyals i instrumentació mèdica
- Robòtica i imatges biomèdiques

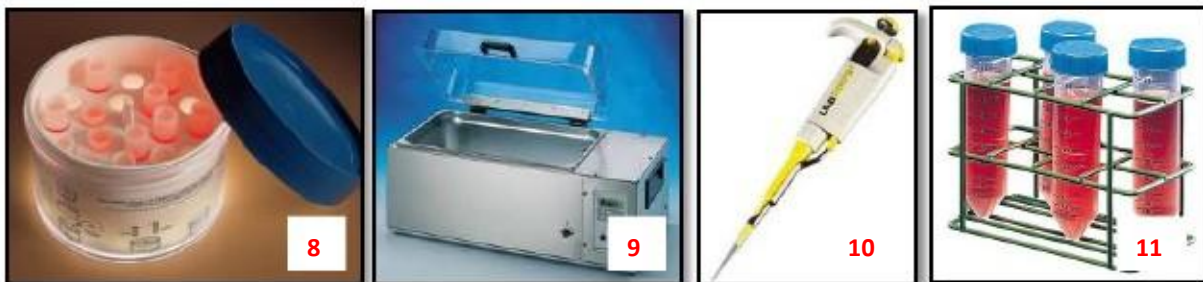


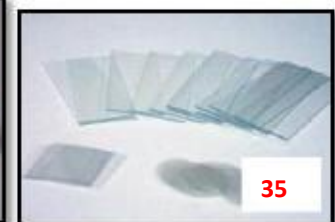
Figura 39: Jo amb el grup d'investigació "Control de Potència de Cèl·lules mare" a la sala d'actes

2. Laboratori i sala de cultius cel·lulars

2.1. Equip d'una sala de cultius cel·lulars i material d'un sol

ús





- | | | |
|--|--|-----------------------------------|
| 1. Incubadora | 13. Etanol i isopropanol | 26. Tubs de prolicopilé |
| 2. Nevera i congelador | 14 i 15. Contenidor de residus biològics | 27. Reactius |
| 3. Sistema de buit | 16. Encenedor d'alcohol | 28. Plaques de 6 pouets |
| 4. Vòrtex (agitador) | 17. Aigua destil·lada | 29. Pipetes Pasteur |
| 5. Cabina de flux laminar | 18. Camara de Neubauer | 30. Bisturí |
| 6. Microcentrifugadora | 19. Microscopi òptic invertit | 31. Agulla emmanegada |
| 7. Centrifugadora | 20. Filtres | 32. Pinces |
| 8. Recipient de congelació progressiva | 21. Guants de làtex | 33. Medis de cultiu |
| 9. Bany d'aigua | 22. Plaques de Petri | 34. Strepper |
| 10. Micropipeta automàtica | 23. Microtubs (per a PCR) | 35. Portaobjectes i cobreobjectes |
| 11. Gradeta | 24. Pipetes graduades | |
| 12. Pipetejador automàtic | 25. Puntes | |

2.2. Aparells generals del laboratori



- | | | |
|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1. Autoclau (esterilització) | 6. Matràs aforat | 11. Balança |
| 2. Tubs d'assaig | 7. Eines per mesurar volums | 12. Agitador circular |
| 3. Vas de precipitats | 8. Embut de vidre | 13. Temporitzador |
| 4. Espàtula | 9. Termociclador per a RT-PCR | 14. Tanc de nitrogen líquid |
| 5. Matràs d'Erlenmeyer | 10. Termociclador per a PCR | 15. Sala de microscòpia |

2.3. Congelació i descongelació de cèl·lules

- CONGELACIÓ DE CÈL·LULES

CÈL·LULES VIVES: Primer hem d'aspirar el medi de cultiu actual, fer dos rentats amb PBS i afegir tripsina per aixecar les cèl·lules, a continuació hem d'afegir el medi de congelació i recollir les cèl·lules amb una pipeta per posar-les en un microtub. Després hem de posar aquest microtub en un recipient de congelació progressiva que conté isopropanol i posa'l congelador a -80°C . El recipient de congelació progressiva fa que la temperatura baixi d'un grau en un grau, de manera que les cèl·lules pateixen menor risc de morir. Al cap de 24 hores (48 com a molt!) hem de treure el microtub del congelador de -80°C i posar-lo en nitrogen líquid, on podrà estar indefinidament.

CÈL·LULES MORTES: Si no ens interessa mantenir les cèl·lules vives perquè simplement volem congelar per posteriorment fer anàlisis de biologia molecular, hem de congelar les cèl·lules en forma de pellet o botó cel·lular. Per això hem d'aspirar el medi de cultiu actual, fer dos rentats amb PBS i afegir tripsina per aixecar les cèl·lules, a continuació hem de centrifugar en medi HES (per neutralitzar l'efecte de la tripsina), aspirar aquest i agafar les cèl·lules per posar-les en un microtub. Després hem d'afegir 1 ml de PBS i tornar a centrifugar. Finalment hem d'aspirar el PBS i congelar el microtub a -80°C indefinidament.

- DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES

CÈL·LULES VIVES: Hem de ser molt ràpids a l'hora de descongelar, ja que es en cas contrari és fàcil que es formin cristalls que causen la mort de les cèl·lules. D'altra banda és important que no arribin a assolir la temperatura ambient, ja que recordem que el DMSO és tòxic per a les cèl·lules a aquesta temperatura. Així doncs, per descongelar les cèl·lules, primer hem d'afegir-les el medi adequat i centrifugar, a continuació hem d'aspirar el medi, resuspendre i tornar a posar-les el medi de cultiu.

CÈL·LULES MORTES: Simplement deixem descongelar a temperatura ambient.

3. Microscopis

El microscopi és un instrument que ens permet veure objectes massa petits per ser observats a simple vista. El tipus més comú i el primer que es va inventar va ser el microscopi òptic, que va ser dissenyat al voltant de l'any 1610 per Galileu, segons els italians, o el 1590 per Zacharias Janssen, en opinió dels holandesos. No va ser fins al segle XVIII que el microscopi va tenir diversos avenços mecànics que van augmentar la seva estabilitat i la seva facilitat d'ús. La història del microscopi no acaba aquí; a dia d'avui encara s'estan fent millores òptiques i creant nous microscopis per veure més enllà. Durant les pràctiques que he realitzat he tractat amb diversos tipus de microscopis, a continuació hi ha una breu descripció de cadascun d'ells.

MICROSCOPI ÒPTIC INVERTIT (1)

Està format per dos lents: l'objectiu i l'ocular. El màxim augment s'aconsegueix quan el microscopi té els oculars 20X i l'objectiu de 100X, que multiplicats dona 2000 augments. Amb aquests augments no arribem a observar estructures intracel·lulars. El fet que sigui invertit permet observar organismes o teixits en cultiu sense una preparació prèvia, afavorint el monitoratge de l'estat de creixement i altres factors implicats en el desenvolupament del cultiu.

MICROSCOPI DE FLUORESCÈNCIA INVERTIT (3)

Els objectes són il·luminats per rajos d'una determinada longitud d'ona. La imatge que observem és el resultat de la radiació electromagnètica emesa per les molècules que han absorbit l'excitació primària i han remès la llum amb major longitud d'ona. L'utilitzem per detectar substàncies marcades amb fluorocroms (immunofluorescència).

ESTEREOMICROSCOPI (2)

Consta de dos microscopis òptics complets, cadascun amb el seu objectiu i el seu ocular, en els quals, en no coincidir els seus eixos òptics, les imatges formades són diferents, i veiem una única imatge en 3 dimensions.

MICROSCOPI CONFOCAL (4)

El seu comportament és molt similar al de fluorescència. El seu avantatge principal és que permet reconstruir imatges tridimensionals i obtenir imatges de major qualitat mitjançant tècniques de filtrat especial que eliminen la llum provinent de plans fora del focus.



1



2



3



4

4. Retrovirus endògens i lentivirus

A dia d'avui hi ha dos maneres d'infectar les cèl·lules amb la informació desitjada durant la reprogramació cel·lular, amb retrovirus endògens o amb lentivirus.

La característica principal que particularitza als retrovirus és que el seu genoma, és a dir, el seu material genètic, està constituït per RNA en comptes de DNA, al contrari de molts altres virus. Per infectar una cèl·lula, els retrovirus han de traduir el seu RNA en DNA i inserir-lo dins del DNA propi de la cèl·lula a infectar. Per aconseguir-ho s'utilitza un enzim específic: la transcriptasa inversa. A partir de llavors, el virus es replica com a part del DNA de la cèl·lula infectada. Normalment, a les cèl·lules la informació genètica passa de DNA a proteïnes via RNAm, en canvi en els retrovirus primer passa de RNA a DNA mitjançant l'acció de la transcriptasa inversa, d'aquí l'origen del seu nom.

Els retrovirus endògens tenen una característica especial i és que, no només s'integren al genoma de la cèl·lula infectada, sinó que a més s'hereten de generació en generació.

Els lentivirus són un tipus concret de retrovirus amb un període d'incubació molt llarg i que, a diferència d'altres retrovirus, no només infecten aquelles cèl·lules que es divideixen, sinó que també infecten aquelles que no estan destinades a proliferar. Com a curiositat, s'ha de dir que els lentivirus són capaços d'infectar cèl·lules veïnes sense la necessitat de generar partícules extracel·lulars, simplement es requereix el contacte directe.

Els retrovirus estan demostrant ser unes eines molt valuoses en biologia molecular, i constitueixen un dels mètodes més eficients de propagació de vectors vírics. Com a inconvenient, cal tenir en compte que molts retrovirus indueixen a patir càncer, un exemple n'és el virus causant de la sida (VIH).

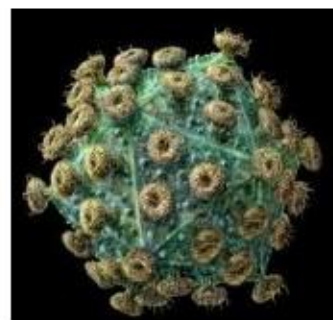


Figura 40: Estructura d'un retrovirus vist al microscopi electrònic

5. L'aportació dels models animals

Els animals de laboratori són una peça fonamental en les ciències biomèdiques.

S'utilitzen com a model per investigar i comprendre les causes i per diagnosticar i tractar malalties que afecten tant a les persones com als animals; a més, fan importants aportacions a la biologia molecular i del desenvolupament i a la producció i control de medicaments i aliments, on en molts casos a data d'avui són insubstituïbles.

L'ús dels animals de laboratori en les investigacions representa un element fonamental en el desenvolupament d'importants avenços en la prevenció i tractament de malalties. Només cal recordar les vacunes com la de la ràbia o el tètanus, el desenvolupament de diversos antibiòtics o la insulina. Però podem anar més enllà, els avenços de la investigació en càncer, cardiologia, transplantaments d'òrgans, la síndrome de la immunodeficiència adquirida o la malaltia de l'Alzheimer, també es deuen a les contribucions dels estudis realitzats amb animals de laboratori. Podríem dir que aquests animals són per a l'investigador un reactiu biològic, els quals es tenen sota unes condicions determinades i només són utilitzats amb una finalitat científica.

No només s'utilitzen els animals com a eina comparativa de les malalties humanes, sinó que també contribueixen en la fabricació de productes per treballar al laboratori, com gran part dels medis de cultius que s'utilitzen durant la generació i el cultiu d'iPS. Molts dels productes amb els quals es treballa al laboratori, contenen algun component d'origen animal, com és el cas del medi condicionat (emprat en el cultiu d'iPS) que conté MEFs, fibroblasts d'embrions de ratolí.

Vist això, no cal dir la gran importància que tenen els diferents models animals a l'hora d'investigar les diferents malalties humanes i el tractament d'aquestes. Avui en dia són imprescindibles per avançar en el món de la investigació biomèdica. Això no vol dir que no s'hagi d'anar, mirant cap al futur, cap a models que substitueixin progressivament els animals vius. De moment, però, cal evitar al màxim els maltractaments o el sofriment dels animals amb tots els mitjans possibles al nostre abast.

5.1. Estudi de la regeneració del cor del peix zebra

Durant la meua estada al laboratori, al mateix departament de control de potència de cèl·lules mare, he treballat també a la investigació de la regeneració del cor del peix zebra. En aquest cas el peix zebra és un clar exemple d'animal de laboratori. L'objectiu de la investigació és saber de quina manera els peixos són capaços de regenerar el cor en un curt període de temps, una habilitat que per als mamífers no és més que un somni.

Tot i que el cor dels mamífers gairebé no mostra la capacitat de regeneració, hi ha una creixent iniciativa per determinar si els cardiomiòcits existents a les cèl·lules progenitores poden ser induïts a produir una resposta regenerativa. En contraposició amb els mamífers, diverses espècies d'animals vertebrats són capaços de regenerar el seu cor, entre ells el peix zebra, que pot arribar a regenerar el seu cor després d'una amputació del 20% del ventricle³⁸. Els primers dies nedaran amb dificultat, però un mes després el seu estat serà totalment normal. Una de les preguntes que es planteja avui en dia la medicina regenerativa és per que els humans no poden fer-ho.

Durant la investigació es demostra que les cèl·lules musculars del cor regenerades deriven de la proliferació dels cardiomiòcits ja diferenciats. A més, es mostra que durant la proliferació de cardiomiòcits hi ha una fase de desdiferenciació limitada, és a dir, en algun moment concret els cardiomiòcits tornen enrere en el seu procés de diferenciació. Específicament, es demostra que el gen PIK1 és un component essencial de la proliferació dels cardiomiòcits durant la regeneració del cor; aquestes dades ens proporcionen la primera evidència de la font de proliferació dels cardiomiòcits durant la regeneració del cor del peix zebra i ens indiquen que les cèl·lules mare no estan significativament involucrades en aquest procés, com es creia anteriorment.

Aquests resultats suggereixen que potser la regeneració en mamífers no és una utopia i que un coneixement més profund dels mecanismes moleculars que indueixen la

³⁸ Cadascuna de les cavitats del cor que reben la sang de les aurícules i l'envien a les artèries. El cor del mamífers, incloent el dels humans, té dos ventricles, mentre que el cor d'altres animals, com els peixos i els amfibis, només en té un.

proliferació dels cardiomiòcits podria ajudar-nos a entendre la manca de regeneració en humans, i tractar de modificar aquest procés si fos necessari.

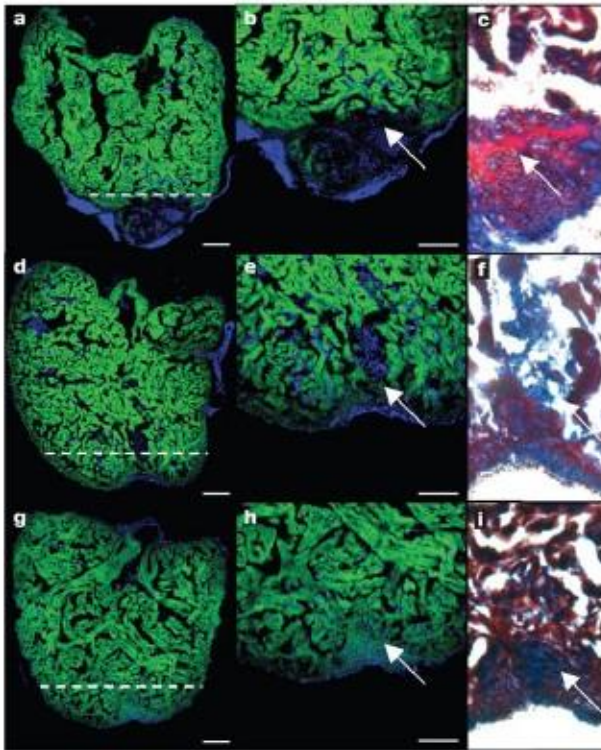


Figura 41: Exemple de regeneració del cor d'un peix zebra. Cardiomiòcits regenerats es deriven de cardiomiòcits diferenciats que tornen a entrar en el cicle cel·lular.

6. Un mes al departament de control de la potència de cèl·lules mare a l'IBEC

L'últim que un sap, és per on començar ³⁹. Em disposava a passar gran part de l'estiu al laboratori intentant entendre alguna de les investigacions que allà es feien. Eren moltíssimes les ganes de començar aquella nova experiència que em portaria a entendre alguna cosa més del desconegut món de les cèl·lules mare i la medicina regenerativa, però potser cada dia que passava al laboratori *sabia més i entenia menys* ⁴⁰.

El temps allà passava molt ràpid, l'ambient era molt agradable i les investigacions seguïen el seu curs. Els primers dies van ser una mica estranys, tenia la sensació que aquell no era el meu lloc, tot semblava massa complicat, amb qualsevol mínim experiment s'havia de tenir molta cura, no estava treballant amb qualsevol cosa.

Tot i que passava entre sis i vuit hores al laboratori, no se'm feia pesat, estava entusiasmada i satisfeta amb mi mateixa perquè realment semblava entendre, al menys en part, el que estava fent. Cada dia que passava aprenia alguna cosa nova i entenia el perquè dels experiments fets anteriorment.

Seguia el dia a dia de les investigacions, fent alguna que altra pràctica contínuament, de vegades però, feia experiments únicament pel meu compte, per la realització del meu treball. Havia de preparar jo tot el material i tenir en compte totes i cadascuna de les coses que s'han de tenir presents, com pot ser l'esterilització, el fet importantíssim de no contaminar res, el temporitzador...

Els mes de juliol va passar volant, el meu treball començava a agafar forma, però encara li calien moltes correccions i alguna pinzellada a la part pràctica, així que vaig visitar el laboratori alguns dies més durant l'agost. Ara mateix poso punt final a aquest treball, tornaré a visitar el laboratori al gener quan hagi de fer la presentació per recollir algunes mostres.

³⁹Blaise Pascal, matemàtic, físic, filòsof i escriptor (1623-1661)

⁴⁰Albert Einstein, físic (1879-1955)

7. Premi Nobel de Medicina 2012

Uns dies després de presentar al meu tutor el treball perquè fes les correccions oportunes, aparegueren als diferents diaris i revistes els titulars següents:

“El Nobel de Medicina premia a los 'padres' de la reprogramación celular” (El Mundo)

“Premio Nobel a la reprogramación celular” (El Periódico)

“El Nobel de Medicina premia la reprogramación de células adultas” (El País i ABC)

“The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012: Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka” (Science)

“Las células madre pluripotentes inducidas se llevan el premio Nobel de Medicina 2012” (SINC)

El premi Nobel de medicina 2012 va ser atorgat al britànic John Gurdon i al japonès Shinya Yamanaka, per la seva investigació amb cèl·lules mare. Van descobrir que, mitjançant una reprogramació cel·lular, les cèl·lules adultes humanes poden transformar-se en qualsevol tipus de teixit corporal.

Gurdon, de la Universitat de Cambridge (Regne Unit), va consolidar les bases de la clonació en experiments realitzats amb granotes l'any 1962. Les seves investigacions van ser claus per la clonació de a l'ovella Dolly⁴¹ i, posteriorment, de mamífers d'altres espècies. Aquest investigador, amb prop de 80 anys, continua actiu treballant al seu laboratori.

Yamanaka, de la Universitat de Kioto, va consolidar les bases de les investigacions actuals amb cèl·lules mare al demostrar el 2006 com es poden obtenir les anomenades cèl·lules mare pluripotents (iPS) a partir de cèl·lules adultes.

El concepte clau que uneix els treballs de Gurdon i Yamanaka és la reprogramació cel·lular, per la qual han obtingut el premi Nobel. Gurdon va reprogramar organismes sencers i Yamanaka, cèl·lules individuals. Gurdon va ser el primer en qüestionar el dogma que el desenvolupament dels organismes era un viatge d'un únic sentit, en demostrar, el 1962, que l'especialització de les cèl·lules és reversible. És a dir, una cèl·lula ja especialitzada pot tornar enrere en el procés de diferenciació.

⁴¹Primer mamífer clonat a partir d'una cèl·lula adulta (1996)

BIBLIOGRAFIA

La informació necessària per realitzar aquest treball l'he extreta de diferents llocs:

Llibres especialitzats

- Diccionari de medicina Oceano Mosby Edició 1996
- Biologia 1 i 2 Grup Promotor Santillana
- IBEC annual report 2011

Articles de revistes de divulgació científica

- Kenneth D. Poss: "Primary contribution to zebrafish regeneration by geta41 cardiomyocytes". *Nature*, 25 de Març de 2010.
- Juan Carlos Izpisua Belmonte: "Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation". *Nature*, 25 de Març de 2010.
- Krishanu Saha and Rudolf Jaenisch: "Technical Challenges in Using Human Induced Pluripotent Stem Cells to Model Disease". *Cell Stem Cell review*, 9 de Novembre de 2009.
- Konrad Hochedlinger: "Reprogramming cells from your own body could give them the therapeutic power of embryonic stem cells, without the political controversy". *Scientific American*, Maig del 2010.
- Anne G. Bang and Melissa K. Carpenter: "Characteristics and Characterization of Human Pluripotent Stem Cells". *Science*, 2009.
- Shin-ichi Nishikawa, Robert A. Goldstein and Concepcion R. Nierras: "The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy". *Perspectives*, Setembre del 2008.
- Manual realitzat pels Instituts Nacionals de la Salut (NIH): "Stem Cell Basics".
- Grup de control de potència de les cèl·lules mares de l'IBEC: "Cèl·lules iPS: una nova manera d'estudiar les malalties". Fira Recerca en Directe, 2011.

Pàgines web

<http://www.pubmed.gov>

<http://www.wikipedia.org>

<http://www.diccionaris.cat>

<http://www.nature.com>

<http://www.sciencemag.org>

<http://www.ibecbarcelona.eu>

<http://www.pcb.ub.edu>

<http://www.umich.edu>

<http://www.unipamplona.edu.co>

<http://www.isscr.org/public>

<http://www.explorestemcells.co.uk>

<http://www.stemcellresearchnews.com>

Informació pròpia

Extreta de les investigacions realitzades durant els mesos de juliol i agost de 2012 als laboratoris de l'IBEC al grup d'Investigació de Control de la Potència de les Cèl·lules mare.