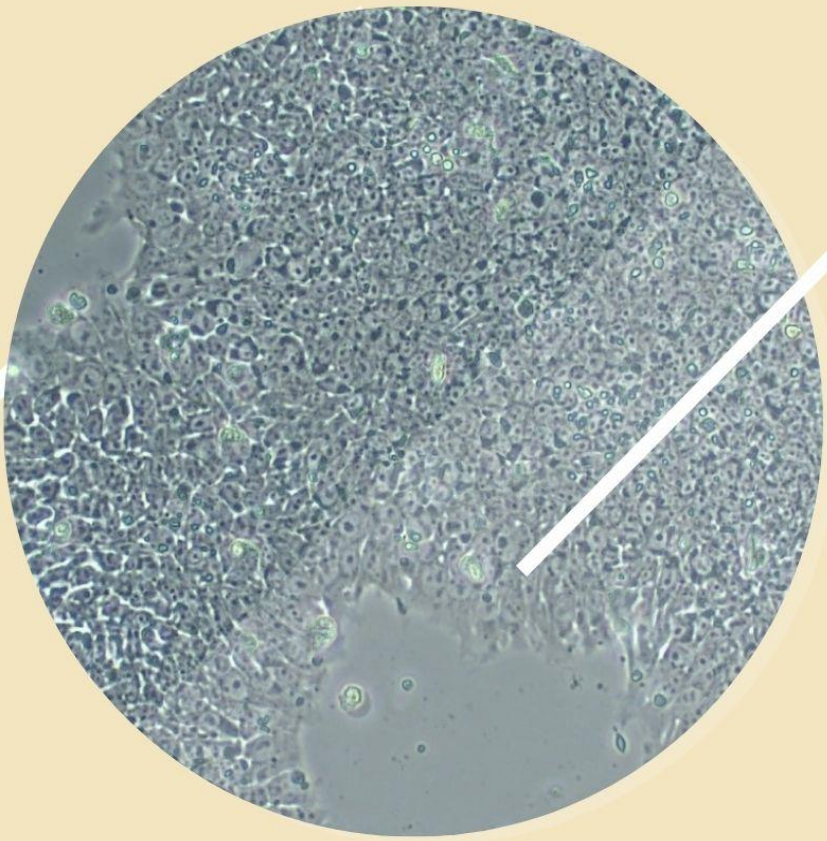
LES CÈL·LULES MARE I LES iPSCs

El futur de la ciència



CRISTINA PÉREZ AGUSTÍN

2n de batxillerat D

Tutor: Òscar Sancenon

15/01/2021

Índex

Introducció 4
1. Les cèl·lules mare 7
1.1. Classificació de les cèl·lules mare segons la potencialitat 8
1.1.1. Cèl·lules mare totipotents 8
1.1.2. Cèl·lules mare pluripotents 9
1.1.3. Cèl·lules mare multipotents 9
1.1.4. Cèl·lules mare unipotents 10
1.2. Classificació de les cèl·lules mare segons la seva obtenció 10
1.2.1. Cèl·lules mare embrionàries 10
1.2.2. Cèl·lules mare adultes o somàtiques 11
2. Les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs) 13
2.1. Procés de reprogramació 13
2.1.1. Material d'origen 13
2.1.2. Els factors de Yamanaka 14
2.2. Procés de diferenciació 16
3. Aplicacions de les cèl·lules mare 17
3.1. La medicina regenerativa i la teràpia cel·lular 17
3.2. El modelatge de malalties 19
3.2.1. Exemple de modelatge amb iPSCs: la Síndrome de Brugada 19
3.3. Estudis de toxicologia 21
3.4. L'ús de cèl·lules mare per a la investigació en la COVID-19 21
3.4.1. Investigació a l'IBEC 21
3.5. Altres aplicacions 23
4. Bioètica en l'ús de cèl·lules mare 24
5. Pràctiques a l'IdIBGi 26
5.1. Inici del protocol de diferenciació d'iPSCs cap a cardiomiòcits 26
5.2. Prova RT-qPCR 33
5.2.1. Resultats de la RT-qPCR 40
6. Centres de recerca que utilitzen cèl·lules mare a Catalunya 42
6.1. Grups d'investigació contactats 42
6.2. El Banc de Línies Cel·lulars de Barcelona (BLCB) 51

6.3. Avantatges i inconvenients de l'ús d'iPSCs segons els investigadors 52
6.3.1. Avantatges 52
6.3.2. Inconvenients 53
6.4. Conclusions sobre l'estat de la investigació amb cèl·lules mare 54
Conclusions 60
Nota d'agraïments 62
Bibliografia 63
Webgrafia 65
Bibliografia d'imatges 68
- Imatges dels annexos 71

Introducció

En un principi, vaig tenir molts dubtes sobre quin tema triar per dur a terme aquest treball, ja que era conscient que hi hauria de dedicar moltes hores. No obstant, tenia clar que volia que estigués relacionat amb la investigació en cèl·lules mare i la medicina, dos camps que sempre m'han interessat molt i dels quals, gràcies a això, ja en tenia algun coneixement. Un dels factors clau a l'hora d'especificar la meva idea va ser el fet de trobar un laboratori on poder realitzar un període de pràctiques. Concretament, el centre que em va oferir la possibilitat d'anar-hi, l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), es dedica a l'estudi de la Síndrome de Brugada mitjançant cèl·lules mare i, per tant, s'adaptava a la perfecció a la meva idea. Finalment, vaig optar per relacionar tot el meu projecte amb la Síndrome de Brugada, una malaltia en què, malgrat els avenços, encara hi ha moltes llacunes per omplir i poca gent coneix. En conseqüència, vaig arribar a la conclusió que fent aquesta recerca podria ampliar en gran mesura els meus coneixements en aquest àmbit i, a la vegada, donar a conèixer aquesta síndrome.

No obstant, a finals del mes de maig, un cop ja tenia bona part del treball enllestida, va sorgir un important contratemps: des del centre d'investigació on m'havien acceptat per dur a terme les pràctiques em van comunicar que, a causa de la pandèmia de la COVID-19, no seria possible que les realitzés. El laboratori hauria de limitar estrictament l'aforament de treballadors i van decidir no acceptar cap estudiant.

Això va suposar un gran problema pel desenvolupament del meu treball, ja que hauria de buscar una nova part pràctica que, degut a l'especificitat del meu tema, no seria fàcil de trobar. A més, també significaria una modificació de la part teòrica.

Després de dies de reflexió, va sorgir una nova idea. Desvincularia el meu projecte de la Síndrome de Brugada per fer un estudi de l'estat de la investigació amb cèl·lules mare a escala de Catalunya. Així mateix, em centraria especialment en les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs), una tipologia molt particular i útil. Per tal d'aconseguir la informació necessària adaptant-me a la situació en què ens trobàvem, vaig seguir la metodologia detallada a continuació.

Per començar, vaig fer una recerca exhaustiva dels grups d'investigació catalans que fan ús de cèl·lules mare. Un cop vaig aconseguir tots els contactes necessaris, uns cinquanta grups, em

vaig disposar a enviar un correu als caps de les investigacions explicant la meva situació i adjuntant un formulari destinat a conèixer aspectes específics de la seva feina.

Evidentment, no vaig rebre resposta de tots ells. Tanmateix, gràcies a l'ajuda dels que van col·laborar, vaig poder recopilar suficient informació. D'una banda, diversos investigadors em van respondre el qüestionari o em van fer arribar múltiples documents sobre els seus projectes. D'altra banda, quatre dels investigadors em van concedir entrevistes extenses per videoconferència que em van permetre extreure més dades útils i tenir un major apropament amb la investigació.

Uns mesos després, tenint la nova part pràctica ja finalitzada, em vaig tornar a posar en contacte amb l'IdIBGi, el centre on anava a realitzar les pràctiques. Em van anunciar que, tot i que no podria anar al seu laboratori durant dues o tres setmanes com havíem planejat inicialment, m'oferien la possibilitat de dur a terme una sèrie d'experiments durant un parell de dies. Més concretament, començaria una ronda de diferenciació d'iPSCs cap a cèl·lules cardíaques i realitzaria una prova PCR. Per tant, vaig decidir combinar els dos marcs pràctics de què disposava.

A conseqüència d'aquests canvis d'enfocament, també vaig haver de modificar els meus objectius i dividir-los en dos grans blocs: l'estudi sobre la situació de la recerca amb cèl·lules mare a Catalunya i l'experimentació amb iPSCs.

Pel primer bloc, em vaig plantejar les següents preguntes: en quin punt es troba la investigació amb cèl·lules mare a Catalunya?, quines perspectives de futur té? A fi de poder resoldre-les, vaig establir una sèrie d'objectius que hauria de complir durant la meva recerca:

- Fer una recopilació dels coneixements i la informació tècnica sobre cèl·lules mare, fent especial incís en les iPSCs.
- Realitzar un estudi teòric dels camps mèdics en què aquesta investigació està tenint més repercussió.
- Analitzar, a partir de la informació aportada pels investigadors, la recerca que està duent a terme cada grup per fer-ne una valoració i treure'n unes conclusions.

En canvi, pel marc experimental em vaig formular una sèrie de preguntes enfocades a l'avaluació de les tècniques utilitzades amb iPSCs:

- És acurat el procés de diferenciació d'iPSCs?

- Són les cèl·lules obtingudes realment semblants a les de la tipologia desitjada?

La metodologia que em caldria seguir per assolir els meus objectius en aquest àmbit consistiria, en primer lloc, en una recerca bibliogràfica dels coneixements existents sobre iPSCs i els seus protocols de diferenciació. Posteriorment, realitzaria els experiments necessaris a l'IdIBGi, els quals documentaria pas per pas i complementaria amb fotografies. Finalment, valoraria els resultats i n'obtindria unes conclusions adequades.

Per tant, el treball està constituït per un marc teòric i un marc pràctic. Al primer s'hi recullen les explicacions i dades més generals sobre cèl·lules mare, que he obtingut a partir d'articles científics i d'Internet. Per contra, a la part pràctica es troba un recull de la informació compartida pels investigadors i de la meva pròpia experiència al laboratori.

A continuació, començaré parlant d'una manera molt general de les cèl·lules mare, centrant-me en les diferents tipologies i les seves aplicacions a la medicina. A més, aprofundiré en les innovadores iPSCs i els processos que impliquen. Posteriorment, mostraré els experiments que vaig dur a terme a l'IdIBGi i els resultats que vaig obtenir. Finalment, presentaré els principals grups d'investigació que fan ús de cèl·lules mare a Catalunya, explicaré els punts bàsics de la investigació de cada un d'ells i faré un balanç de la situació.

1. Les cèl·lules mare

Les cèl·lules mare són cèl·lules indiferenciades, és a dir, que no mostren les característiques fenotípiques[1] de cap llinatge cel·lular concret. Es troben a tots els éssers vius pluricel·lulars i tenen la capacitat de dividir-se i diferenciar-se cap a cèl·lules especialitzades. Per tant, la seva funció principal al nostre organisme és la de generar noves cèl·lules per substituir les que han mort i reparar els teixits malmesos.

D'una banda, les seves dues propietats principals són:

- **L'autorenovació:** duen a terme dos processos diferents que asseguren la continuïtat de la població de cèl·lules mare a l'organisme:
  - La divisió asimètrica**:** s'origina una altra cèl·lula mare idèntica a la progenitora i una cèl·lula filla que es diferenciarà.
  - La divisió simètrica: es produeixen dues cèl·lules mare indiferenciades iguals que la progenitora.
- **Potència cel·lular:** és el potencial que té una cèl·lula mare per diferenciar-se cap a un tipus cel·lular específic. En funció de la potència es distingeixen quatre tipologies cel·lulars diferents (apartat 1.1).

D'altra banda, segons en quin moment les obtenim, diferenciem dos grans grups de cèl·lules mare:

- **Embrionàries:** es troben exclusivament durant el desenvolupament de l'embrió.
- **Adultes:** es troben a diversos òrgans del cos ja format.

Per poder identificar cèl·lules mare experimentalment es comprova si tenen la capacitat de regenerar teixits. A més, es poden il·lustrar les seves propietats mitjançant cultius "in vitro". No obstant, no es coneix amb certesa si aquests cultius reflecteixen de manera fidedigna els mateixos trets que els models "in vivo".

Des de la primera determinació de les seves propietats als anys seixanta a mà d'Ernest McCulloch i James Till, la investigació i les aplicacions mèdiques de les cèl·lules mare han viscut

[1] **Característiques fenotípiques:** aparença externa determinada pels gens.

una gran evolució. Avui en dia tenen un fort impacte en tractaments per a malalties cardiovasculars, cerebrals, sanguínies, deficiències cel·lulars...

Consegüentment, el món de la ciència ha dipositat moltes expectatives en el fet que aquestes cèl·lules poden ser la clau pel desenvolupament de tractaments i fàrmacs innovadors per a malalties que, de moment, no tenen cura, com l'Alzheimer, el Parkinson o la diabetis.

1.1. Classificació de les cèl·lules mare segons la potencialitat

Tal com s'ha dit prèviament, a la natura existeixen 4 tipologies diferents de cèl·lules mare en funció de la seva capacitat de diferenciació. N'hi ha de totipotents, pluripotents, multipotents i unipotents.

La seva potencialitat està estretament lligada a l'edat. En la majoria de casos, les cèl·lules es van fent més específiques a mesura que maduren i pateixen divisions cel·lulars.

1.1.1. Cèl·lules mare totipotents

Les cèl·lules mare totipotents, com bé indica el seu nom (toti = sencer), són les que presenten una major potencialitat. Aquestes es poden trobar durant els primers estadis del desenvolupament embrionari, quan l'òvul fecundat està en fase de segmentació.

Tenen la capacitat de dividir-se per donar lloc a cèl·lules de cada una de les diferents tipologies que trobem a l'organisme; de formar tots els teixits de l'ésser viu, tant embrionaris com extraembrionaris, i de generar la línia germinal de l'organisme, és a dir, les cèl·lules sexuals que tenen la funció de transmetre el material genètic a la descendència. Per tant, es pot dir que

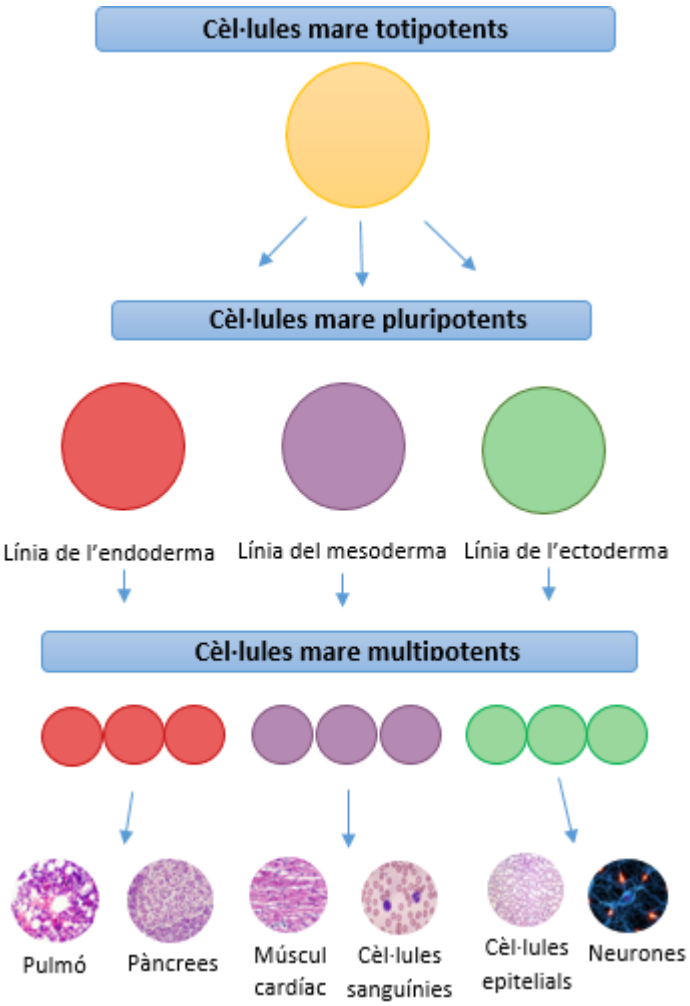


Figura 1: Esquema dels canvis de potencialitat d'una cèl·lula mare durant el seu desenvolupament.

poden formar un nou individu per complet.

A més, tenen la capacitat d'autoreplicar-se un nombre il·limitat de vegades sense perdre la seva elevada potencialitat.

El cultiu d'aquestes cèl·lules mare, que desapareixen quatre dies després de la fecundació per donar lloc a les pluripotents, ha fet possibles noves investigacions relacionades amb l'estudi de l'activació genòmica del zigot, la reescriptura de l'epigenoma[2], el control de malalties i l'enteniment més detallat de les primeres fases del desenvolupament embrionari.

1.1.2. Cèl·lules mare pluripotents

Les cèl·lules mare pluripotents són aquelles que es poden dividir per generar qualsevol dels tres llinatges embrionaris: l'endoderma, l'ectoderma i el mesoderma, que són les tres capes en què es divideix el teixit de l'embrió. Per tant, es poden diferenciar cap a qualsevol dels més de dos-cents tipus de cèl·lules existents al cos humà, però no estan capacitades per donar lloc a un individu completament nou.

Teòricament, aquestes cèl·lules només es poden obtenir a partir del teixit embrionari. No obstant, gràcies als experiments duts a terme per en Shinya Yamanaka, s'ha desenvolupat un mecanisme per poder-ne produir a partir de cèl·lules somàtiques provinents de teixits adults. Aquestes són les anomenades cèl·lules pluripotents induïdes o iPSCs (apartat 2).

1.1.3. Cèl·lules mare multipotents

Les cèl·lules mare multipotents, que deriven de les pluripotents, tenen la capacitat de donar lloc a cèl·lules d'un nombre determinat i limitat de llinatges (multi = diverses). Tot i que no són presents a tot l'organisme, es troben a un gran nombre de teixits adults, com ara la medul·la òssia, la sang, les neurones… Per tant, poden presentar morfologies molt variades.

Malgrat això, tenen una sèrie de desavantatges. Per un costat, la seva velocitat de proliferació és molt més lenta que la d'altres tipologies cel·lulars i, per l'altre, presenten una reduïda capacitat d'expansió, especialment en cultius "in vitro".

La seva funció principal és la de reparar els teixits de l'individu al llarg de la seva vida. A més,

[2] **Epigenoma:** registre de canvis químics que modifiquen o marquen el genoma.

tenen una gran utilitat per dur a terme trasplantaments, ja que poden ser extretes de l'organisme per guiar la seva diferenciació cap a un tipus determinat de cèl·lula del seu llinatge i, finalment, implantar-les altre cop al pacient.

Les cèl·lules hematopoètiques, encarregades de generar les cèl·lules sanguínies, són un bon exemple de multipotencialitat. Aquestes poden produir, per exemple, leucòcits, limfòcits i eritròcits, ja que pertanyen a la seva família.

1.1.4. Cèl·lules mare unipotents

Les cèl·lules mare unipotents són aquelles que, com que han perdut la plasticitat necessària per produir-ne d'altres, únicament poden generar cèl·lules del seu mateix tipus (uni = un).

Malgrat que, a causa de la seva baixa potencialitat, no reben el mateix reconeixement que la resta de cèl·lules mare, continuen jugant un paper indispensable en la renovació de teixits i tenen diverses aplicacions mèdiques.

Les cèl·lules epitelials són un exemple de la seva rellevància. Atès que els humans perdem constantment cèl·lules de la pell, les cèl·lules mare epitelials, que són unipotents, són les encarregades de substituir-les per altres de noves.

1.2. Classificació de les cèl·lules mare segons la seva obtenció

Les cèl·lules mare poden procedir de dues fonts diferents: de l'embrió o de teixits adults. En funció d'on provinguin, tindran diferents potencialitats.

1.2.1. Cèl·lules mare embrionàries

Les cèl·lules mare embrionàries són cèl·lules mare de caràcter pluripotent derivades de la massa interna del blastòcit, que es correspon a la quarta etapa del desenvolupament embrionari, entre quatre i cinc dies després de la fecundació de l'òvul.

Per tal d'obtenir aquestes cèl·lules humanes, es parteix del procés de fecundació "in vitro", ja que es fa ús dels embrions restants per extreure les cèl·lules. Per fer-ho, cal separar

l'embrioblast[3] del trofoblast[4] mitjançant immunocirurgia.

La massa cel·lular interna resultant es diposita sobre unes altres cèl·lules que serviran de suport. Posteriorment, s'hi adhereixen i expandeixen per formar una línia cel·lular embrionària sense diferenciar.

Aquesta classe de cèl·lula és molt valorada per la comunitat científica gràcies a la seva pluripotència i al fet que conserva el cariotip[5]. En conseqüència, les seves utilitats són molt diverses. Podem destacar el seu paper en teràpies de reemplaçament de cèl·lules, investigació de fàrmacs, creació de models de desordres genètics, reparació de l'ADN malmès i altres usos clínics.

1.2.2. Cèl·lules mare adultes o somàtiques

Són cèl·lules mare sense diferenciar, generalment multipotents o unipotents, que es troben entre les cèl·lules específiques d'un teixit adult determinat. Per tant, es poden obtenir de qualsevol persona, independentment de la seva edat.

Es caracteritzen principalment per poder-se autorenovar un nombre indefinit de vegades, fet per què estan constantment substituint cèl·lules mortes i mantenint l'homeòstasi[6] de l'organisme.

En funció del teixit a partir del qual s'obtenen, en podem distingir una gran varietat de tipologies: hematopoètiques (sang), mamàries (glàndules mamàries), intestinals, endotelials (medul·la òssia), neuronals (neurones), olfactives (mucosa olfactiva)...

Aquestes cèl·lules són escasses als teixits i, un cop han estat extretes, la seva capacitat de divisió és molt reduïda, fet que dificulta la generació de grans colònies cel·lulars "in vitro" als laboratoris.

---

[3] **Embrioblast:** estructura cel·lular de l'embrió que formarà les estructures definitives del fetus.

[4] **Trofoblast:** capa de l'embrió que constituirà la placenta.

[5] **Cariotip:** patró cromosòmic d'una espècie.

[6] **Homeòstasi**: tendència a mantenir l'equilibri i l'estabilitat interns en els diferents sistemes biològics.

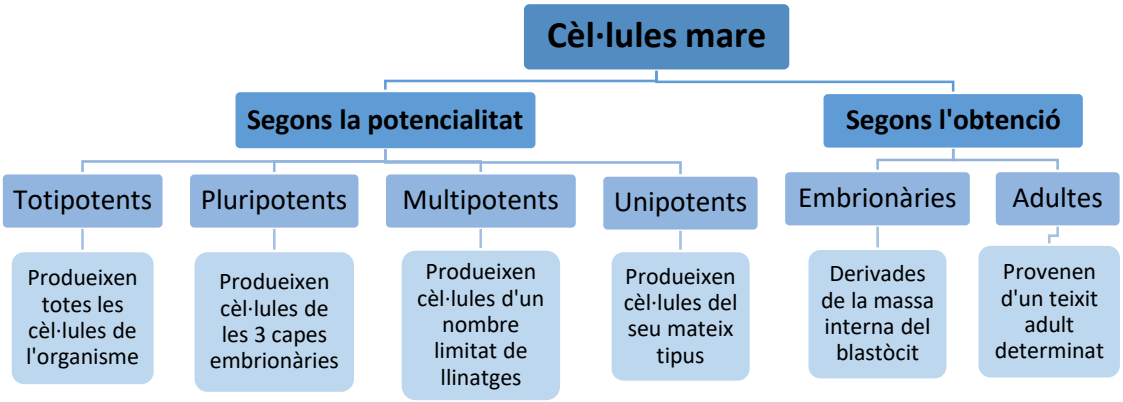


Figura 2: Esquema de les dos classificacions principals de les cèl·lules mare.

2. Les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs)

Les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs) són cèl·lules amb caràcter pluripotent que han estat derivades artificialment a partir de cèl·lules madures no pluripotents (somàtiques) provinents de teixits adults.

L'any 2006, a un laboratori de Kyoto, Japó, en Shinya Yamanaka va ser el primer investigador a descobrir una tècnica efectiva per produir aquestes cèl·lules. Posteriorment, el 2012, va ser guardonat amb el Premi Nobel per les seves investigacions. En aquestes, va demostrar que la introducció de determinats gens associats amb la pluripotència cel·lular (apartat 1.1.2) pot provocar la transformació d'una cèl·lula somàtica procedent d'un teixit qualsevol del cos en una cèl·lula mare pluripotent. Aquest procés s'anomena reprogramació.

Gràcies a les seves propietats, les iPSCs han suposat un gran avenç en la realització d'estudis sobre fisiologia i malalties des d'un punt de vista cel·lular.

2.1. Procés de reprogramació

Tal com s'ha explicat anteriorment, les iPSCs s'obtenen mitjançant la reprogramació de cèl·lules somàtiques cap a cèl·lules mare pluripotents. Aquest procés acostuma a ser lent, triga a produir-se una o dos setmanes als ratolins i tres o quatre als humans.

2.1.1. Material d'origen

El primer pas a seguir per poder obtenir iPSCs és determinar a partir de quin tipus de cèl·lula somàtica obtindrem les cèl·lules mare. Hi ha diverses tipologies de teixits aptes per aquest procediment.

Inicialment, els més utilitzats eren els fibroblasts[7] epitelials, ja que podien ser extrets del pacient mitjançant un procediment relativament fàcil: la biòpsia per punció. Posteriorment, per tal d'evitar intervencions quirúrgiques, es va començar a dur a terme la reprogramació a partir de cèl·lules sanguínies perifèriques, sovint limfòcits T del sistema immunitari. Això va suposar una important millora i va atraure molts pacients voluntaris pel fet que es poden

[7] **Fibroblasts:** cèl·lules pròpies del teixit conjuntiu.

obtenir mitjançant una simple extracció de sang.

Les cèl·lules renals tubulars provinents de l'orina i els queratinòcits[8] són també opcions de fàcil accés i eficaces.

A l'hora de determinar quin teixit és el més adequat, cal tenir en compte diversos factors. Un d'ells és l'efecte de l'ambient. Per exemple, les cèl·lules epitelials poden presentar una taxa de mutacions molt elevada deguda a la seva continuada exposició a radiació ultraviolada.

2.1.2. Els factors de Yamanaka

La reprogramació de cèl·lules somàtiques consisteix principalment en la introducció d'uns gens específics, que són els responsables de conferir caràcter pluripotent a les cèl·lules mare. Per tant, al introduir-se en cèl·lules adultes, aquestes reverteixen el seu estat i recuperen la pluripotència. Per tal de determinar quins són els més efectius, l'equip d'investigació d'en Shinya Yamanaka va posar a prova vint-i-quatre gens diferents controlant si induïen l'expressió de gens propis dels embrions.

Finalment, van trobar els anomenats factors de Yamanaka, els quatre gens: *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* i *c-Myc*. Tot i que hi ha altres combinacions possibles, aquesta és la més eficient.

Aquests gens representen algunes de les característiques pròpies de les cèl·lules pluripotents. D'una banda, els gens *Klf4* i *c-Myc* estan relacionats amb cèl·lules tumorals, fet pel qual aporten una alta capacitat de proliferació. En conseqüència, si únicament s'introduïssin aquests dos gens, es generarien tumors. D'altra banda, un altre requisit de les cèl·lules pluripotents és la capacitat d'obrir i activar les estructures de cromatina[9] amb l'objectiu que els gens que s'expressen en estadis de cèl·lula mare quedin accessibles perquè la maquinaria cel·lular els pugui expressar. Així, trobem que el gen *c-Myc* també presenta la funció de codificar per a proteïnes encarregades "d'afluixar" les estructures cromàtiques.

Per poder dirigir i induir la generació de cèl·lules pluripotents, cal introduir també el gen *Oct3/4*, que dirigeix la reprogramació, i el gen *Sox2*, que manté la pluripotència. De fet, si s'augmenta l'expressió de l'*Oct3/4,* s'incrementa l'eficàcia de la reprogramació. Per tant, hi ha

[8] **Queratinòcit:** cèl·lula predominant a la capa més superficial de la pell, l'epidermis.

[9] **Cromatina**: material genètic de la cèl·lula eucariota que es troba al nucli. Està constituït per molècules d'ADN associades a histones i altres proteïnes.

una estreta relació entre els nivells d'expressió gènica i la reprogramació.

Un cop coneguts els gens necessaris i la tipologia de la cèl·lula d'origen, hi ha dues tècniques principals de reprogramació possibles, és a dir, dues maneres d'introduir els factors de Yamanaka. Una d'elles és mitjançant integracions de transgens[10] d'ADN utilitzant un virus integral. En canvi, l'altra tècnica es caracteritza per no implicar integracions i es duu a terme per mitjà de transferència d'ARN, de virus Sendai ,de vectors episomals[11]...

En un principi, se solien utilitzar mètodes integratius. Es feia ús d'un virus integral, com un retrovirus o un lentivirus, per introduir els factors com a transgens d'ADN. No obstant, van sorgir nombroses preocupacions respecte a la possibilitat que l'expressió dels factors interferís en la posterior diferenciació cap a cèl·lules somàtiques i respecte a la possible introducció de transgens no desitjats al genoma.

Actualment, es disposa de diverses tècniques de reprogramació lliures d'integracions. Segons estudis recents, totes elles presenten un grau d'eficàcia semblant i, per tant, se seleccionen en funció de les possibilitats i necessitats dels centres d'investigació.

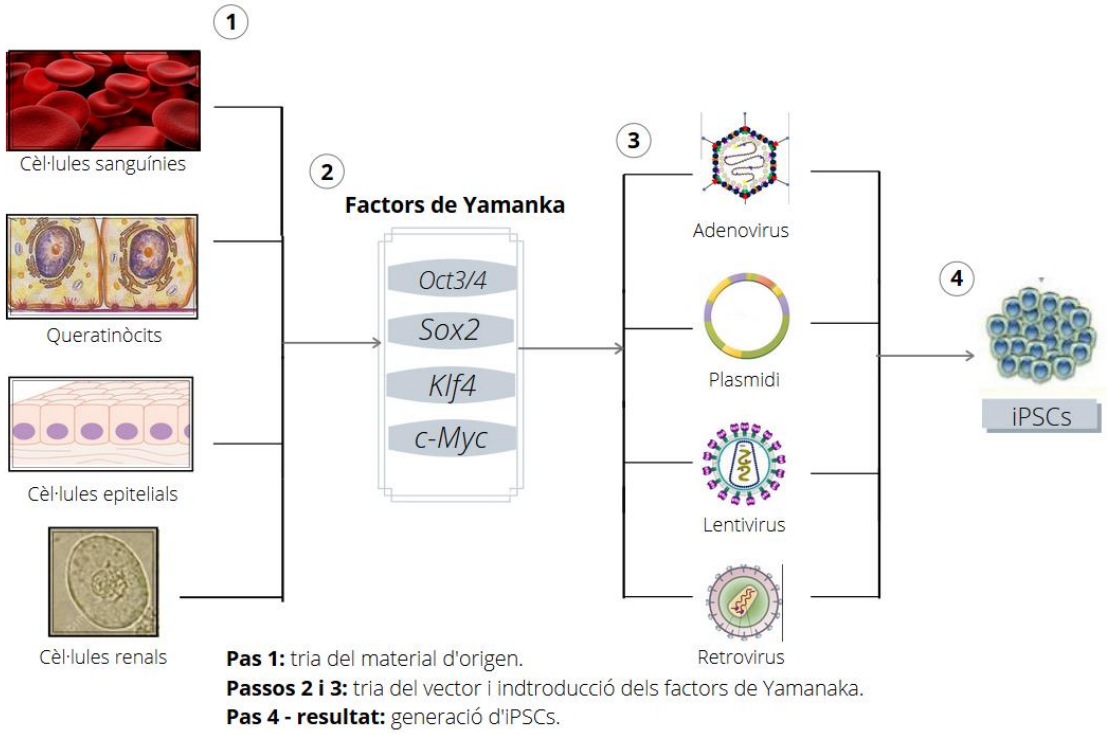


Figura 3 : Esquema del procés de reprogramació.

[10] **Transgens**: gens transferits mitjançant enginyeria genètica.

[11] **Vector episomal:** plasmidi al qual se li ha integrat per recombinació un fragment determinat d'ADN anomenat episoma, que és una unitat extracromosòmica.

Es pot dur a terme mitjançant adenovirus que, a diferència d'altres virus, no incorpora el seu genoma a l'ADN de la cèl·lula hoste. Un altre exemple n'és l'ús del virus Sendai, que és especialment eficaç en fibroblasts i cèl·lules sanguínies, però no gaire útil per a la generació d'iPSCs amb utilitats clíniques, com els trasplantaments.

2.2. Procés de diferenciació

Anomenen diferenciació el procés pel qual qualsevol cèl·lula mare pluripotent s'especialitza cap a una tipologia cel·lular concreta, adquirint així la seva morfologia i funcionalitat. La diferenciació té lloc de manera completament natural al nostre organisme, però també pot ser controlada i induïda en cultius cel·lulars "in vitro", com és el cas de les iPSCs. Els mecanismes de diferenciació varien molt en funció de la cèl·lula que es vol obtenir. No obstant, tots ells impliquen un canvi en el patró d'expressió i en tota la xarxa de regulació gènica, que és característica de cada varietat cel·lular. Tot i que la durada del protocol acostuma a ser llarga, és molt variable segons la tipologia de cèl·lula a obtenir.

Gràcies a la pluripotència de les iPSCs, la diferenciació pot dirigir-se cap als tres llinatges cel·lulars principals: ectoderma, endoderma i mesoderma.

Llavors, en funció de les diverses combinacions de substàncies solubles que es poden afegir als medis de cultiu, com els factors de creixement, les citoquines[12], els àcids o les vitamines, les cèl·lules es diferencien cap a una tipologia concreta o una altra.

Es tracta de protocols dividits en diverses fases o etapes, és a dir, segons van passant els dies, s'han d'anar afegint o extraient substàncies del medi. Cadascuna d'elles anirà guiant l'iPSC cap a la tipologia especialitzada desitjada.

[12] **Citoquines:** proteïnes que regulen la funció de les cèl·lules que les produeixen sobre altres tipologies cel·lulars. Són agents responsables de la comunicació intercel·lular.

3. Aplicacions de les cèl·lules mare

Els darrers anys, totes les tipologies de cèl·lules mare esmentades anteriorment, especialment les iPSCs, han mostrat tenir múltiples aplicacions en diversos àmbits de la investigació mèdica i científica.

No obstant, com es tracta d'un camp molt innovador i recent, bona part de les seves possibles utilitats estan encara en fase d'estudi i experimentació. Tot i així, actualment ja permeten tractar un nombre considerable de malalties.

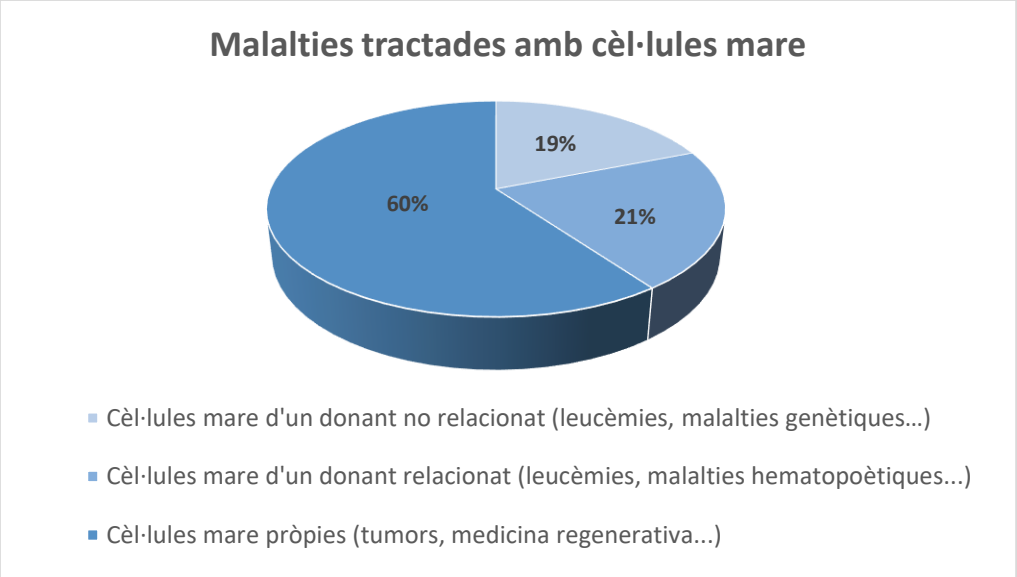


Figura 4: Malalties tractades mitjançant l'ús de cèl·lules mare segons la seva font d'origen.

La major part dels tractaments existents amb cèl·lules mare són realitzats amb cèl·lules del mateix pacient, ja que, d'aquesta manera, s'elimina el risc de rebuig immunològic. Seguidament, trobem les teràpies amb cèl·lules d'un donant relacionat, és a dir, d'un familiar, que també produeixen una baixa resposta immunològica gràcies als anticossos comuns. Finalment, l'ús de cèl·lules mare d'una persona no relacionada amb el pacient constitueix la minoria dels procediments a causa de la dificultat que suposa trobar donants suficientment compatibles amb el receptor.

3.1. La medicina regenerativa i la teràpia cel·lular

Una de les especialitats en què s'està realitzant el major nombre d'estudis amb cèl·lules mare és la medicina regenerativa. Aquest camp està constituït pel conjunt de tractaments que

requereixen l'ús de material biològic del mateix pacient, que poden ser cèl·lules o teixits, per tractar diferents malalties. Dit d'una altra manera, es basa a utilitzar els mateixos mecanismes que realitzen les cèl·lules del nostre organisme en les zones que estan malmeses, regenerant-les o reparant-les perquè tornin a funcionar correctament. Les tres àrees d'actuació més importants d'aquest tipus de medicina són la teràpia cel·lular, l'enginyeria de teixits i l'enginyeria genètica.

Les cèl·lules mare juguen un paper fonamental en la teràpia cel·lular. Aquesta consisteix en la regeneració o el cultiu de nous teixits mitjançant iPSCs provinents del mateix pacient per tal de reparar o substituir aquells teixits o òrgans que no funcionen correctament. Per exemple, s'està plantejant la possibilitat de tractar malalties neurodegeneratives, com ara l'Alzheimer, lesions de medul·la o insuficiències cardíaques, mitjançant aquesta tècnica. Tot i que el seu ús sembla prometedor, la teràpia cel·lular també presenta uns riscos considerables. Un dels principals és el fet que, com que les cèl·lules utilitzades per reparar els teixits provenen de cèl·lules mare de caràcter pluripotent, és a dir, amb una gran capacitat de proliferació, cal avaluar si poden arribar a causar tumors.

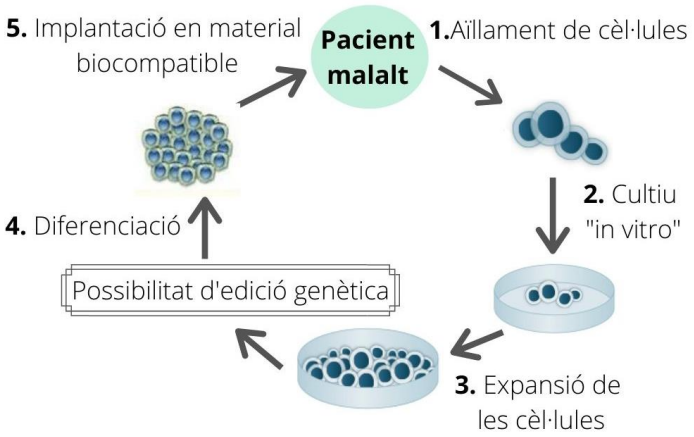


Figura 5: Esquema del procediment de teràpia cel·lular.

Una altra branca de la teràpia cel·lular és el trasplantament de cèl·lules mare provinents del cordó umbilical. Aquestes cèl·lules són multipotents hematopoètiques, és a dir, sanguínies, fet per què poden generar qualsevol classe de cèl·lula de la sang, fins i tot les immunològiques. Per tant, el seu trasplantament pot ser útil per a la regeneració de les línies sanguínies de pacients amb malalties a la sang, com ara la leucèmia. Per dur a terme aquesta mena de tractaments, s'han començat a crear bancs de cèl·lules de cordó umbilical en què els pares poden guardar reserves de les cèl·lules dels fills tant pel seu propi ús com per donar a altres pacients. Així, en cas de desenvolupar una malaltia d'aquesta classe, es pot tenir l'assegurança de disposar de cèl·lules mare totalment compatibles per tractar-la.

3.2. El modelatge de malalties

El modelatge de malalties s'ha convertit en una eina indispensable per entendre les bases moleculars de moltes patologies i, a la vegada, per desenvolupar nous tractaments.

Consisteix en el cultiu "in vitro" de cèl·lules portadores de la malaltia que es vol estudiar per tal d'examinar les seves reaccions i mecanismes.

Malgrat els intents inicials de dur a terme aquest procediment fent ús de cèl·lules animals, aquestes metodologies van resultar ineficients a causa de les diferències fisiològiques i les insuficients interaccions cel·lulars que s'hi creaven.

Per tant, finalment, es va desenvolupar la millor tècnica pel modelatge de malalties fins al moment: l'ús de cèl·lules mare específiques dels mateixos pacients. Un dels majors avantatges que presenta aquest mètode és la possibilitat d'aïllar les cèl·lules en diferents moments de l'evolució de la malaltia. El modelatge es pot dur a terme amb cèl·lules mare adultes, embrionàries o iPSCs. Mentre que les dues primeres tipologies presenten diverses limitacions, com el fet que les adultes no es poden diferenciar cap a qualsevol cèl·lula o els problemes bioètics que impliquen les embrionàries, les iPSCs suposen la solució a totes elles. Aquestes són especialment útils per modelar malalties de caràcter genètic i per a mutacions puntuals.

De la mateixa manera, són molt efectives per generar models de malalties neurodegeneratives, com ara l'Alzheimer o l'atròfia muscular espinal, i per estudiar disfuncions hereditàries de la medul·la òssia.

3.2.1. Exemple de modelatge amb iPSCs: la Síndrome de Brugada

La Síndrome de Brugada és una malaltia cardiovascular hereditària descrita l'any 1992 per tres germans: en Ramon, en Pere i en Josep Brugada.

Està inclosa dins de les canalopaties[13] i es caracteritza per la presència d'alteracions a l'electrocardiograma dels pacients.

Malgrat el caràcter genètic d'aquesta malaltia, només entre un 25% i un 30% dels casos estan associats a mutacions en gens, principalment el *SCN5A*. A la resta de pacients, al voltant d'un

[13] **Les canalopaties**: són trastorns de l'excitabilitat de la membrana muscular cardíaca causats per anomalies genètiques en proteïnes de les cèl·lules del cor que tenen la funció de controlar i regular la seva activitat elèctrica.

75%, la causa de l'aparició de la síndrome és desconeguda. Per tant, a partir del diagnòstic genètic dels pacients, s'utilitzen models cel·lulars per provar experimentalment les variants de significat incert que es troben en el genoma d'aquests malalts. Així, es comprova si estan associades a la Síndrome de Brugada o si, per contra, són mutacions comunes que no tenen cap efecte significatiu.

Per poder estudiar aquestes variants i la seva possible implicació a la malaltia, l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), que es dedica a investigar aquesta patologia, utilitza models cel·lulars de cardiomiòcits derivats d'iPSCs.

Per generar aquests models es parteix de fibroblasts epitelials de pacients amb la Síndrome de Brugada i de subjectes sans a les cèl·lules dels quals se'ls ha implantat una mutació. En ambdós casos les cèl·lules són reprogramades mitjançant virus Sendai.

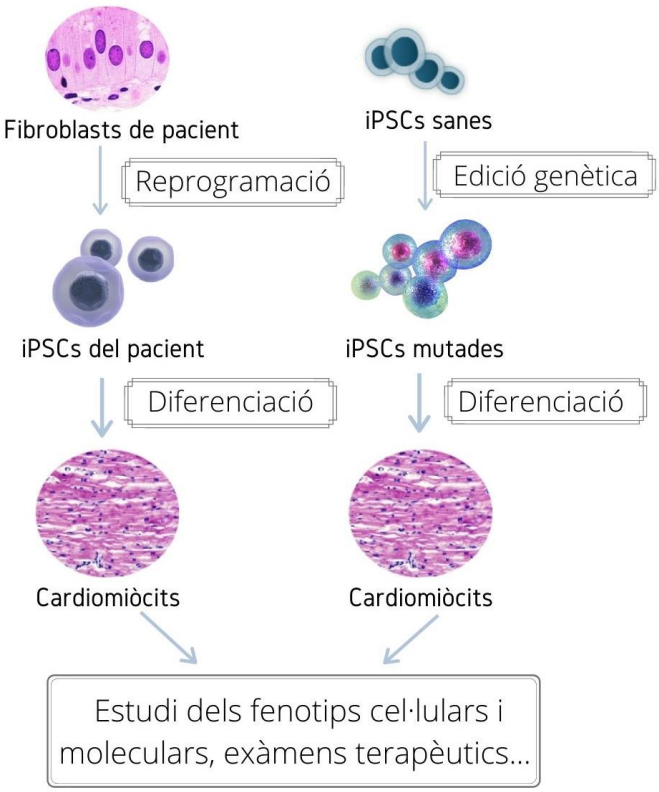


Figura 6: Esquema del desenvolupament de models cel·lulars de cardiomiòcits derivats d'iPSCs.

Posteriorment, es creen colònies d'iPSCs, que són diferenciades cap a cardiomiòcits. D'una banda, s'utilitza l'ARN[14] d'aquestes cèl·lules per fer seqüenciacions en temps real destinades a avaluar l'expressió dels seus gens. D'altra banda, els cardiomiòcits són sotmesos a estudis de les seves corrents elèctriques.

[14] **ARN:** àcid ribonucleic. És un àcid nucleic format per ribonucleòtids que desenvolupa diverses funcions a l'organisme, com la direcció de la síntesi de proteïnes i la regulació l'expressió gènica.

3.3. Estudis de toxicologia

L'ús de cèl·lules mare també ha suposat una important millora dels estudis de toxicologia aplicats a les múltiples substàncies químiques a què estem exposats diàriament. Més concretament, són especialment útils per veure de quina manera aquestes substàncies poden afectar els fetus en desenvolupament, ja que moltes de les malalties o disfuncions amb què neixen els nadons són degudes a factors ambientals. Aquestes alteracions del desenvolupament causades per l'entorn estan incloses dins del terme "toxicitat del desenvolupament" i les substàncies que ho provoquen s'anomenen teratògens.

No obstant, aquestes proves "in vitro" no poden simular amb exactitud la complexitat que implica el desenvolupament d'un fetus ni les interaccions fetus-mare que tenen lloc "in vivo". Un exemple d'aquestes diferències és el fet que no es pot formar una placenta madura a partir d'iPSCs. Per tant, no és possible estudiar l'arribada de tòxics a la sang del fetus a través d'aquesta.

3.4. L'ús de cèl·lules mare per a la investigació en la COVID-19

La COVID-19, popularment coneguda com a "coronavirus" per la forma que presenta l'agent patogen, ha suposat la pandèmia més greu viscuda per la nostra societat en dècades. Es tracta d'una malaltia respiratòria causada pel virus SARS-CoV-2 els símptomes més comuns de la qual són la febre, la tos seca i la pèrdua de l'olfacte i el gust. No obstant, també hi ha casos asimptomàtics i d'altres amb afectacions molt més greus.

A causa de la descontrolada expansió de la malaltia, nombrosos centres d'investigació d'arreu del món han dedicat els seus recursos i instal·lacions a la recerca de possibles tractaments o vacunes seguint tècniques molt variades. Entre aquestes trobem l'ús de cèl·lules mare.

3.4.1. Investigació a l'IBEC

A l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) s'està duent a terme un important projecte per desenvolupar un fàrmac que bloquejaria els efectes de la COVID-19 a la seva etapa primerenca d'infecció. Es tracta del projecte liderat per la professora d'investigació Núria Montserrat, anomenat "ACE2-ORG", que ha estat finançat amb més de 300.000 euros pel fons

COVID-19 de l'Institut de Salut Carlos III. També compten amb la col·laboració d'un laboratori suec, un d'austríac i un de navarrès.

Aquest projecte es fonamenta en la generació de models cel·lulars que simulen el funcionament d'òrgans renals i cardíacs a la placa de cultiu. Es tracta d'organoides[15] derivats de cèl·lules mare utilitzats per tal d'identificar les respostes cel·lulars i moleculars que presenta la replicació de la Sars-CoV-2 en els microteixits.

Aquestes proves han demostrat posseir una gran eficàcia en la recerca de teràpies per tractar la COVID-19. Un dels fàrmacs que s'han identificat com a potencialment útils, desenvolupat l'any 2003 per tractar la SARS, consisteix a causar una confusió al virus. El seu funcionament es basa en que les cèl·lules humanes presenten els anomenats receptors ACE2, que són l'entrada per on el virus incideix mitjançant les seves proteïnes S. Llavors, el paper d'aquest fàrmac, anomenat APN01, és aconseguir que les proteïnes S del virus s'uneixin a ell en comptes de als receptors de la cèl·lula.

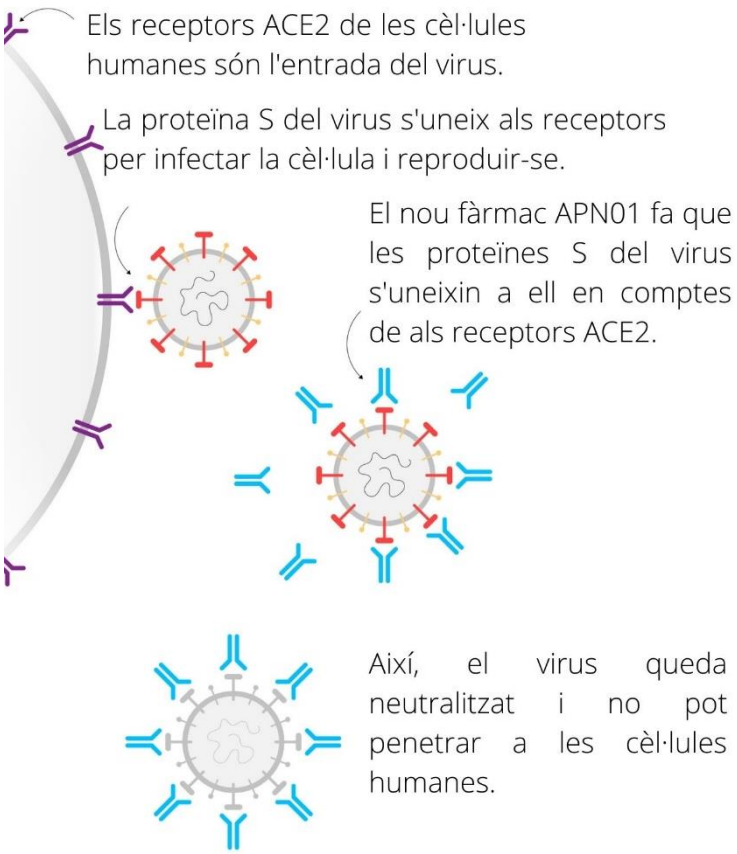


Figura 7: Esquema del mecanisme d'actuació del fàrmac APN01.

A causa dels bons resultats "in vitro", s'ha començat a posar a prova en dos-cent pacients infectats per la COVID-19 a Alemanya, Àustria i Dinamarca. No obstant, l'equip de l'IBEC té previst posar a prova nous fàrmacs per continuar amb la investigació.

[15] **Organoide:** òrgan tridimensional mínim crescut "in vitro".

3.5. Altres aplicacions

Malgrat que les cèl·lules mare presenten un especial potencial per a la investigació en les àrees esmentades anteriorment, també poden ser utilitzades per a la recerca en molts altres àmbits.

D'una banda, s'estan convertint en una eina molt interessant pel testament de nous fàrmacs. Per tal de desenvolupar aquesta funció es combinen les seves capacitats en el modelatge de malalties i en les proves de toxicologia. A grans trets, aquests estudis consisteixen a desenvolupar un model cel·lular de la malaltia d'interès a partir d'iPSCs d'un pacient per poder posar a prova el funcionament dels nous fàrmacs desenvolupats. A la vegada, es pot comprovar si aquests resulten tòxics per l'ésser humà o si, per contra, són segurs per la salut.

D'altra banda, també poden tenir un paper important a l'hora de tractar diversos càncers. Això es deu al fet que són molt útils per estudiar el desenvolupament que viuen les cèl·lules durant la formació d'un organisme. Des del moment en què l'òvul ha estat fecundat, permeten observar amb deteniment i precisió els mecanismes de divisió, replicació i diferenciació. Posseir un ampli coneixement sobre aquests processos és indispensable per tractar el càncer, ja que és una malaltia causada per la divisió i diferenciació anormal o descontrolada de les cèl·lules. Per tant, mitjançant aquests estudis, es pot obtenir nova informació útil sobre el sorgiment dels tumors, necessària per desenvolupar noves estratègies i tractaments.

Actualment, la manipulació de cèl·lules mare ja és utilitzada per disminuir les seqüeles o efectes secundaris d'alguns tractaments pel càncer, com ara la quimioteràpia. Aquests procediments consisteixen en l'extracció i congelació d'algunes de les cèl·lules mare de la medul·la òssia i de la sang, que poden ser malmeses si es sotmeten a altes dosis de quimioteràpia. Un cop finalitzat el tractament, es tornen a trasplantar al pacient perquè restaurin els teixits. D'aquesta manera, es poden subministrar dosis de quimioteràpia més altes, per tal d'augmentar-ne l'efectivitat, i disminuir notablement els efectes secundaris negatius.

4. Bioètica en l'ús de cèl·lules mare

Malgrat l'important paper que han jugat les cèl·lules mare en la ciència recentment, impliquen una sèrie de qüestions que han portat a plantejar-se l'ètica en el seu ús i obtenció.

Per començar, cal analitzar per separat les quatre principals tipologies, ja que aquestes comporten problemes i polèmiques molt diferents.

D'una banda, les cèl·lules mare adultes multipotents i unipotents no aixequen gaire revoltes ètiques perquè, sempre que hi hagi el consentiment dels pacients, la seva obtenció no té objeccions morals.

D'altra banda, malgrat ser molt útils pel desenvolupament de noves teràpies als laboratoris gràcies a la seva pluripotència, les cèl·lules mare embrionàries són les que presenten més inconvenients des del punt de vista de la bioètica. Això es deu al fet que, com bé indica el seu nom, provenen de l'embrió i la seva obtenció n'implica la destrucció. El primer debat s'obre en el fet de si cal considerar els embrions com a persones, ja que si es tractessin d'un conjunt de cèl·lules qualsevol, no suposarien una controvèrsia tan gran. En canvi, si es decideix que són persones, la seva manipulació representaria una important vulneració dels seus drets humans.

Actualment, encara no s'ha arribat a cap acord sobre la seva classificació com a persones i només ha estat acceptat que són individus. Hi ha experts que defensen que, des del moment en què es fusionen els gàmetes, l'embrió ja no és un potencial ésser humà, sinó que és un ésser humà en si mateix. No obstant, n'hi ha d'altres que creuen que per considerar un individu com a persona cal que tingui consciència pròpia i racionalitat madura, requisits que els embrions no compleixen. Cal destacar que els últims arguments reben molt poca acceptació social perquè exclouen una bona part de la població de la seva condició humana, com els nadons acabats de néixer o les persones amb certes discapacitats.

Si suposem l'acceptació de l'embrió com a persona, s'obre un segon debat. Aquest consisteix a determinar si és correcte "fabricar" o "produir" embrions exclusivament per obtenir-ne les cèl·lules, ja que això equival a donar-li la vida a una nova persona únicament per després acabar amb ella i treure'n una utilitat. A més, també s'ha qüestionat la moralitat d'utilitzar els embrions restants de les fecundacions "in vitro".

A causa d'això, l'ús d'aquests embrions està prohibit en alguns països com Irlanda, Itàlia o Alemanya, però segueix essent permès en determinades situacions a Espanya, Dinamarca i Suècia, entre molts altres estats.

Tot i que les cèl·lules mare embrionàries continuen suposant molts problemes ètics, el desenvolupament de les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs) ha suposat un gran avenç en aquest camp. Aquestes permeten obtenir cèl·lules pluripotents, com les embrionàries, a partir de cèl·lules somàtiques procedents d'adults. Així, es poden aconseguir cèl·lules amb el mateix potencial i grau d'utilitat sense haver de destruir embrions.

Per tant, les iPSCs són la solució al principal problema ètic que presenta l'ús de cèl·lules mare en la ciència, però, al mateix temps, n'impliquen un de nou. Es tracta de la possibilitat d'utilitzar aquestes cèl·lules per produir gàmetes i embrions humans, acció que suposaria la clonació d'éssers humans, trencant així amb els principis més elementals de l'ètica.

5. Pràctiques a l'IdIBGi

Com a part experimental del treball, vaig realitzar un reduït període de pràctiques a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi). Atès que aquest centre estudia la Síndrome de Brugada, una malaltia cardiovascular de caràcter genètic, els seus grups de recerca estan especialitzats en la diferenciació d'iPSCs cap a cèl·lules cardíaques.

A continuació, us presentaré els dos experiments que vaig dur a terme sota el monitoratge dels investigadors del centre per tal de posar en pràctica els coneixements teòrics prèviament adquirits. D'una banda, vaig iniciar un protocol de diferenciació d'iPSCs cap a cardiomiòcits. No obstant, a conseqüència de la situació epidemiològica en què ens trobàvem, només vaig poder assistir al laboratori durant dos dies, fet per què no vaig poder realitzar el protocol complet, que té una durada de trenta dies.

D'altra banda, vaig dur a terme una prova RT – qPCR per comprovar l'eficàcia del protocol de diferenciació.

5.1. Inici del protocol de diferenciació d'iPSCs cap a cardiomiòcits

L'objectiu final d'aquest protocol és la diferenciació de cèl·lules pluripotents induïdes cap a cardiomiòcits, adoptant així les seves característiques genotípiques i fenotípiques. Consta de diversos passos distribuïts al llarg de trenta dies en què s'intenta simular el que succeeix durant el desenvolupament embrionari d'aquestes cèl·lules a l'organisme.

El procediment que vaig poder dur a terme al laboratori consisteix en una preparació prèvia de les cèl·lules, que cal realitzar dos dies abans que aquestes es comencin a diferenciar. Es tracta dels anomenats "passes cel·lulars", una de les parts del procediment que requereix més elaboració. Aquest es basa en la sembra d'un determinat nombre de cèl·lules en la placa de cultiu on la diferenciació es durà a terme.

Les iPSCs que vaig utilitzar en aquesta ronda de diferenciació havien estat reprogramades per personal del centre mitjançant virus Sendai a partir de fibroblasts epitelials. La metodologia que vaig seguir és la següent:

1. Per començar, vaig preparar el medi de cultiu que més endavant afegiria a les iPSCs en un tub d'assaig.

1.1. Primer, vaig etiquetar el tub indicant components que hi afegiria.

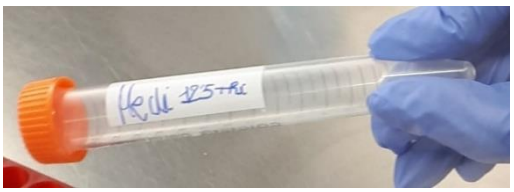


Figura 8: Etiqueto el tub d'assaig pel medi de cultiu.

1.2. Tot seguit, utilitzant un pipetejador i una pipeta amb capacitat de 25 mL, vaig introduir 12'5 mL d'mTeSR1[16] al tub.

Figura 9: Pipetejo 12'5 mL d'mTeSR1 del tub on es troba inicialment.

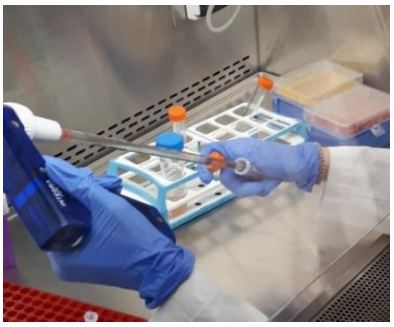


Figura 10: Afegeixo l'mTeSR1 al tub d'assaig pel medi de cultiu.

1.3. Després, amb una micropipeta de 100 µL de volum, vaig afegir-hi 12'5 µL de ROCKi[17].

Figura 11: Mesuro 12'5 µL de ROCKi del microtub en què es troba inicialment.

Figura 12: Transfereixo el ROCKi al tub pel medi de cultiu.

2. Un cop preparat el medi, vaig tancar el tub d'assaig i el vaig dipositar a una gradeta. Posteriorment, vaig agafar una placa de cultiu amb Matrigel[18], que havia estat a l'incubador a una temperatura de 37°C durant una hora i mitja. Gràcies a aquest temps d'incubació, a la superfície inferior del pouets s'hi havia format una capa que serviria de

[16] **mTeSR1:** medi que contribueix en el manteniment de la pluripotència de les cèl·lules mare.

[17] **Inhibidor ROCK (ROCKi):** substància que millora la supervivència de les cèl·lules.

[18] **Matrigel:** substància gelatinosa utilitzada per crear matrius proteiques pels cultius cel·lulars.

suport per a una millor adherència de les cèl·lules. Malgrat que la placa de cultiu disposava de dotze pouets, només en vaig utilitzar els sis situats a la zona dreta.

Figura 13: Placa de cultiu amb Matrigel..

3. Seguidament, fent ús d'una micropipeta de 200 µL de volum, vaig extreure el Matrigel restant dels sis pouets de la placa on s'havia format la capa d'adherència per dipositar-los en una nova placa. D'aquesta manera, la substància podria ser reutilitzada en un altre experiment.

Figura 14: Extrec el Matrigel de la placa prèviament incubada amb una micropipeta.

Figura 15: Reparteixo el Matrigel en una nova placa.

4. Fet això, vaig tancar la nova placa amb Matrigel reutilitzable per guardar-la a una nevera.

Figura 16: Placa amb Matrigel per reutilitzar.

5. Tot seguit, amb un pipetejador i una pipeta de 5mL, vaig afegir el medi de cultiu prèviament preparat a la placa en què s'havia format la capa d'adherència. Concretament, vaig dipositar 2 mL del medi a cada un dels sis pouets.

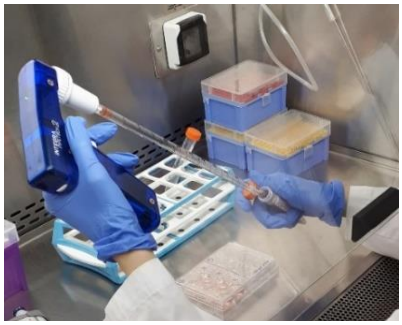


Figura 17: Pipetejo 12 mL del medi de cultiu preparat en passos anteriors.

Figura 18: Aboco 2mL de medi de cultiu a cada pouet.

6. Posteriorment, vaig agafar la placa que contenia les iPSCs, que havia estat guardada a l'incubador fins al moment, i vaig aspirar el medi en què es trobaven. No obstant, les cèl·lules no van ser aspirades amb la resta de substàncies, ja que estaven adherides a la superfície inferior del pouet.

Figura 19: Aspiro el medi en què es troben les iPSCs.

7. A continuació, vaig afegir 1'5 mL de tampó fosfat salí (PBS)[19] al pouet amb iPSCs amb un pipetejador i una pipeta de 5mL. Moments després, ho vaig aspirar per rentar la placa, eliminant així qualsevol residu del medi.

Figura 20: Pipetejo 1'5 mL de tampó fosfat salí.

Figura 21: Afegeixo el tampó fosfat salí al pouet amb les iPSCs.

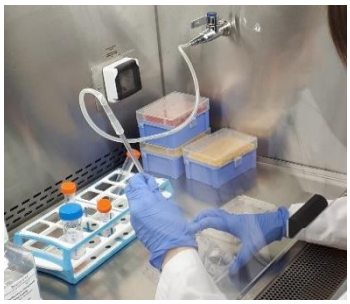


Figura 22: Aspiro el tampó fosfat salí per eliminar els residus.

[19] **Tampó fosfat salí (PBS):** solució aquosa salina que, juntament amb d'altres, serveix per desfer aglomeracions cel·lulars.

8. Seguidament, vaig afegir-hi 1 mL d'àcid etilendiaminatetraacètic (EDTA)[20] utilitzant un pipetejador i una pipeta de 5 mL i vaig introduir la placa a un incubador a 37º C perquè les cèl·lules se separessin entre si.

Figura 23: Pipetejo 1 mL d'EDTA del tub on es troba inicialment.

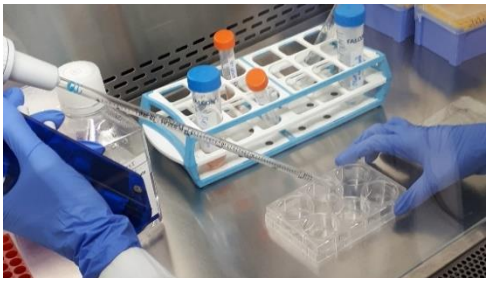


Figura 24: Introdueixo l'EDTA al pouet amb iPSCs.

9. Un cop passats 4 minuts, vaig aspirar l'EDTA i vaig colpejar acuradament la placa pels quatre costats per separar totes les cèl·lules.

10. Posteriorment, fent ús d'una micropipeta amb una capacitat de 1000µL, vaig afegir 700µL d'mTeSR1 des de la part superior de cada pouet per arrossegar les cèl·lules. Gràcies a això, vaig poder recollir-les i transferir-les a un tub de 50 mL, que vaig etiquetar amb el nom "cells". A més, vaig afegir-hi 7 µL d'inhibidor ROCK (ROCKi) per millorar la supervivència de les cèl·lules.

Figura 25: Extrec 700 µL de mTeSR1 del tub on es troba inicialment.

Figura 26: Aboco l'mTeSR1 al pouet per arrossegar les iPSCs.

Figura 27: Introdueixo la suspensió de cèl·lules en un tub d'assaig etiquetat com a "cells".

11. Després, vaig introduir 10 µL de la suspensió cel·lular en un microtub per poder contar el nombre de cèl·lules vives. Per fer-ho, vaig utilitzar una màquina especialitzada, la "Countess II FL".

[20] **Àcid etilendiaminatetraacètic (EDTA):** àcid hidrosoluble útil per separar les cèl·lules entre si i de la superfície de la placa.

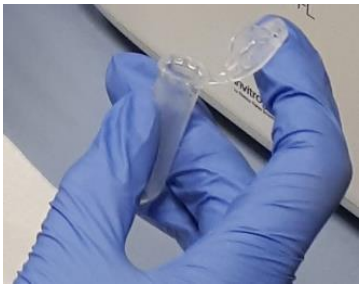


Figura 28: Microtub amb la suspensió cel·lular.

Figura 29: Màquina "Countess II FL" per contar les cèl·lules.

12. Per poder introduir les cèl·lules a l'aparell, vaig preparar la mostra en un portaobjectes i un cobreobjectes específics.

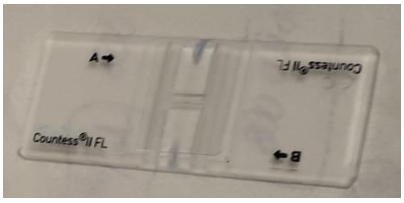


Figura 30: Portaobjectes i cobreobjectes específics per a la "Countess II FL".

13. Abans d'introduir-hi les cèl·lules, vaig afegir a la mostra 10 µL de "Trypan blue"[21] amb una micropipeta de 10 µL de volum i ho vaig barrejar. Tot seguit, vaig agafar 10 µL d'aquesta barreja per dipositar-la al portaobjectes.

Figura 31: Agafo 10 µL de "Trypan blue" del tub on es troba inicialment.

Figura 32: Afegeixo el "Trypan blue" al microtub amb la suspensió d'iPSCs.

Figura 33: Extrec 10 µL de la suspensió cel·luar.

14. Per fer-ho, vaig introduir la punta de la micropipeta molt acuradament entre el portaobjectes i el cobreobjectes i vaig alliberar la barreja.

[21] **"Trypan blue":** colorant blau que travessa les cèl·lules mortes i les tenyeix.

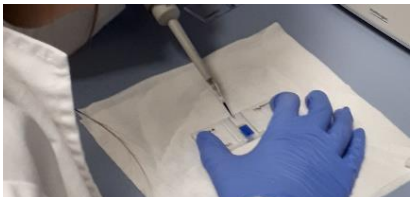


Figura 34: Introdueixo la punta de la micropipeta entre el portaobjectes i el cobreobjectes.

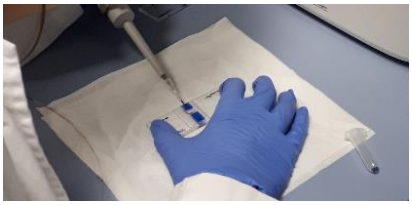


Figura 35: Començo a alliberar la suspensió cel·lular.

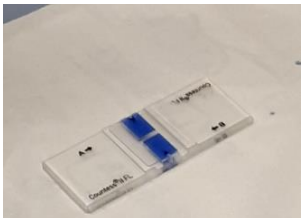


Figura 36: Suspensió cel·lular entre el portaobjectes i el cobreobjectes.

15. Seguidament, vaig introduir la mostra a la "Countess II FL" i aquesta en va contar el nombre cèl·lules vives i mortes.

Figura 37: Pantalla de la "Countes II FL" indicant el nombre i el percentatge de cèl·lules vives i mortes a la mostra.

16. Aproximadament, hi havia 1'3 x 10^6 cèl·lules vives per mL, és a dir, per 1000 µL de dissolució. Per tant, mitjançant un factor de conversió, vaig determinar els µL de suspensió cel·lular que caldrien per tenir vuit-centes mil cèl·lules, que és la quantitat que se sol afegir als pouets per a la diferenciació.

Aquest és el càlcul que vaig dur a terme:

$$800.000\ cèl \cdot lules \times \frac{1000\ \mu L\ de\ dissolució}{1'3\ x\ 10^6\ cèl \cdot lules} = 616\ de\ suspensió$$

17. Finalment, amb una micropipeta de 1000 µL, vaig afegir 616 µL de la suspensió d'iPSCs guardada al tub "cells" a cadascun dels pouets que havia preparat prèviament amb el medi de cultiu. Un cop omplerts, vaig tornar a guardar la placa a la incubadora.

Figura 38: Agafo 616 µL de suspensió d'iPSCs del tub d'assaig "cells".

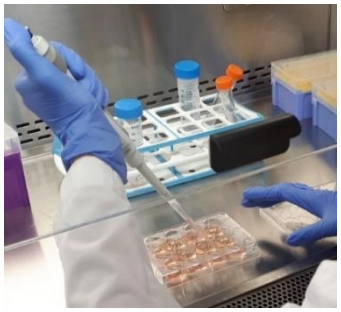


Figura 39: Diposito la suspensió als pouets amb medi de cultiu.

Aquesta placa seria la utilitzada per a la resta del protocol de diferenciació, que consistiria a canviar el medi de cultiu i afegir-hi diverses substàncies, com l'heparina o la insulina. No obstant, com he explicat anteriorment, a causa de la situació en què ens trobàvem, no va resultar possible continuar-la.

5.2. Prova RT-qPCR

Una PCR, és a dir, una reacció en cadena de la polimerasa, consisteix en l'obtenció de moltes còpies d'un fragment d'ADN a partir d'una quantitat de material molt inferior. Per tant, podem dir que permet l'amplificació de fragments d'ADN. Aquest mètode té utilitats molt variades, com ara la detecció dels microorganismes causants d'una malaltia.

No obstant, la PCR que vaig realitzar a l'IdIBGi es va tractar d'una PCR en temps real, també coneguda com a qPCR, en què hi ha un monitoratge de l'amplificació a mesura que es produeix. Més concretament, va ser una qPCR amb transcriptasa inversa (RT-qPCR). En conseqüència, va ser necessari un procés previ de transcripció inversa, que implica la síntesi d'una molècula d'ADN de doble cadena a partir d'una molècula d'ARN. L'enzim encarregat d'aquest procés s'anomena "transcriptasa inversa" i l'ADN resultant, anomenat c-ADN, s'utilitza com a mostra per a la qPCR.

L'objectiu de la RT-qPCR que vaig dur a terme va ser comprovar si les iPSCs es diferencien correctament cap a cardiomiòcits fent un anàlisi de la seva expressió gènica, concretament dels gens implicats en la pluripotència i dels gens cardíacs essencials. Per tant, vaig poder determinar si el procés de diferenciació és efectiu o no.

Per tal de realitzar aquest experiment, vaig fer ús de c-ADN de dues tipologies cel·lulars diferents: iPSCs i cardiomiòcits derivats d'iPSCs. D'aquesta manera, vaig poder comparar les diferents expressions genètiques que presenten. La metodologia que vaig seguir va consistir en la introducció de quatre sondes TaqMan, que són seqüències curtes de nucleòtids[22] amb un marcador fluorescent, a les mostres de c-ADN. Les sondes que vaig utilitzar són: la sonda "Nanog", que només reconeix el gen *Nanog,* característic de les iPSCs; la sonda "TNNT2", que reconeix un gen propi dels cardiomiòcits, el *"TNNT2",* i les sondes "PPIA" i "18S", que funcionen com a normalitzadors ("Norm1" i "Norm2") o grups control, ja que reconeixen els

[22] **Nucleòtids:** unitats estructurals bàsiques dels àcids nucleics.

gens *PPIA i 18S*, presents a totes les tipologies cel·lulars.

Per assegurar que els cardiomiòcits han estat diferenciats correctament, únicament s'haurien de reconèixer tres gens: el *TNNT2,* el *PPIA* i el *18S*. En canvi, a les iPSCs s'hi haurien de detectar els gens *Nanog, PPIA i 18S.*

El procés de reconeixement dels gens és dut a terme per una màquina especialitzada que sotmet les mostres a temperatures molt elevades. No obstant, perquè aquest anàlisi sigui possible, cal una acurada preparació prèvia de les mostres, ja que qualsevol error en les proporcions pot causar que els resultats de la prova no siguin fiables. Per realitzar aquest procediment al laboratori, vaig seguir la següent metodologia:

1. Per començar, vaig efectuar una sèrie de càlculs per determinar el nombre de microtubs i la quantitat de cada substància que necessitaria durant tot l'experiment. Malgrat que vaig obtenir les quantitats estrictament necessàries dels productes, les vaig incrementar per tenir-ne en excés. Com que les micropipetes no són completament exactes i hi pot haver petits errors, aquest pas té una gran importància per assegurar que hi hagi suficient volum de totes les substàncies.

   Per efectuar els càlculs inicials, vaig partir d'unes proporcions preestablertes a protocols globalment validats.

2. Seguidament, vaig agafar les mostres de c-ADN de cardiomiòcit, de c-ADN d'iPSC i el "TaqMan Fast Advanced Master Mix"[23] del congelador. Atès que s'han de conservar a molt baixa temperatura, les vaig introduir a un recipient de poliestirè amb glaç triturat. A més, vaig abocar aigua lliure de nucleases[24] a un tub "Falcon" i també el vaig guardar al gel.

Figura 40: Introdueixo el c-ADN d'iPSC i el c-ADN de cardiomiòcit en un recipient amb glaç triturat.

Figura 41: Afegeixo aigua lliure de nucleases a un tub "Falcon" i la conservo al gel.

[23] **"TaqMan Fast Advanced MasterMix":** substància que aporta els productes necessaris per la prova PCR.

[24] **Nucleases:** enzims que degraden l'ADN.

3. Després, vaig preparar els tretze microtubs que utilitzaria al llarg de l'experiment. Els vaig situar a una gradeta específica i els vaig anomenar segons contingut que hi dipositaria.

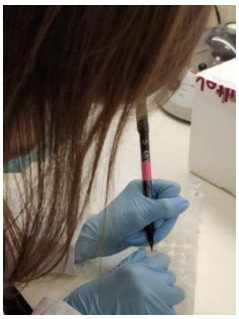


Figura 42: Etiqueto els microtubs segons el seu futur contingut.

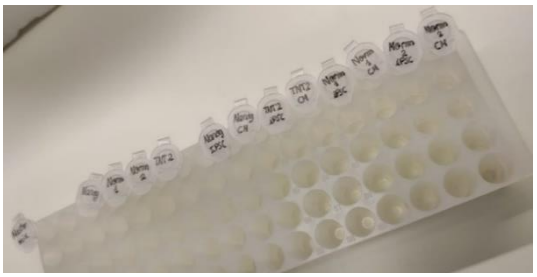


Figura 43: Els 13 microtubs etiquetats com a: "MasterMix", "Nanog", "TNNT2", "Norm 1", "Norm 2", "Nanog iPSC", "Nanog CM", "TNT iPSC", "TNT CM", "Norm 1 iPSC", "Norm 1 CM", "Norm 2 iPSC" i "Norm 2 CM"

4. Posteriorment, vaig realitzar la primera preparació al tub "Master Mix". Fent ús d'una micropipeta de 200 µL, vaig afegir-hi 180 µL de "TaqMan Fast Advanced MasterMix" i 126 µL d'aigua lliure de nucleases. Moments després, vaig tancar el microtub i el vaig guardar al glaç per mantenir-lo a la temperatura adequada

Figura 44: Pipetejo 180 µL de "TaqMan Fast Advanced MasterMix" del seu pot inicial.

Figura 45: Aboco el "TaqMan Fast Advanced MasterMix" al microtub etiquetat com a "MasterMix".

Figura 46: Mesuro 126 µL d'H_2O lliure de nucleasa del tub on es troba inicialment.

Figura 47: Diposito l'H_2O lliure de nucleasa al tub "MasterMix".

5. Un cop feta la barreja, vaig treure del congelador els quatre microtubs que contenien les sondes TaqMan, molt sensibles als canvis de temperatura i al contacte amb la llum, i els vaig guardar al recipient amb gel.

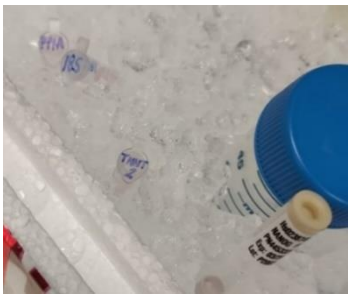


Figura 48: Microtubs amb les quatre sondes TaqMan: "PPIA", "18S", "Nanog" i "TNNT2".

6. Tot seguit, vaig emplenar quatre microtubs amb noves mescles. Cada un d'ells contindria una sonda diferent barrejada amb el "MasterMix" preparat a passos anteriors.

6.1. Primer, utilitzant una micropipeta de 100 µL, vaig afegir 68 µL del tub "MasterMix" a cada un dels quatre microtubs.

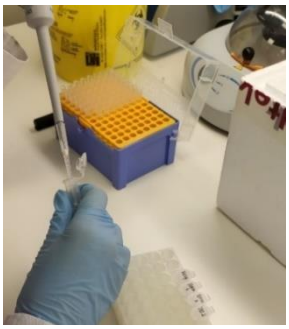


Figura 49: Agafo 68 µL del tub "MsterMix".

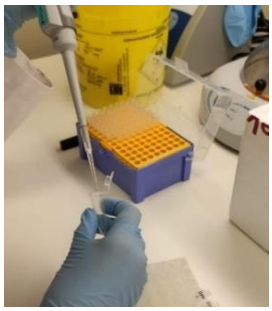


Figura 50: Aboco el "MasterMix" a cada un dels 4 microtubs.

6.2. Després, vaig dipositar 4 µL de la sonda corresponent a cada microtub. Per tant, en van resultar quatre microtubs, el nom i la composició dels quals és la següent:

- Tub "Nanog": "MasterMix" + sonda "Nanog"
- Tub : "TNNT2": "MasterMix" + sonda "TNNT2"
- Tub "PPIA": "MasterMix" + sonda "PPIA"
- Tub "18S" : "MasterMix" + sonda "18S"

Figura 51: Pipetejo 4µL de cada sonda (en aquest cas de la "Nanog") del tub on es troben inicialment.

7. A continuació, vaig dipositar els quatre nous microtubs al recipient amb glaç, vaig llençar el tub "MasterMix" i em vaig disposar a omplir-ne els últims vuit.

7.1. Per fer-ho, amb una micropipeta de 100 µL vaig afegir 31'5 µL de la barreja "Nanog" a dos dels microtubs, 31'5 µL de la barreja "TNNT2" a uns altres dos, 31'5 µL de la barreja "PPIA" a dos dels microtubs restants i 31'5 µL de la barreja "18S" als dos últims.

7.2. Instants després, vaig introduir 3'5 µL de C-ADN d'iPSC a quatre dels microtubs amb sondes diferents i 3'5 µL de c-ADN de cardiomiòcit als altres quatre microtubs fent

ús d'una micropipeta de 10 µL. Finalment, vaig obtenir vuit microtubs, cada un d'ells amb un dels següents continguts:

1. Sonda "Nanog" + c-ADN d'iPSC
2. Sonda "Nanog" + c-ADN de cardiomiòcit
3. Sonda "TNNT2" + c-ADN d'iPSC
4. Sonda "TNNT2" + c-ADN de cardiomiòcit
5. Sonda "PPIA" + c-ADN d'iPSC
6. Sonda "PPIA" + c-ADN de cardiomiòcit
7. Sonda "18S" + c-ADN d'iPSC
8. Sonda "18S" + c-ADN de cardiomiòcit

Figura 52: Pipetejo 3'5 µL de c-ADN (en aquest cas d'iPSC).

8. Posteriorment, vaig posar els vuit microtubs a una centrífuga de sobretaula per integrar les substàncies i els vaig introduir al recipient amb gel.

Figura 53: Insereixo els microtubs a la centrífuga.

Figura 54: Els últims 8 microtubs guardats al gel.

9. Seguidament, vaig agafar una placa de tres-cents vuitanta-quatre pouets per dipositar-hi la quantitat de cada substància necessària per fer la qPCR.

Figura 55: Placa amb 384 pouets específica per a proves PCR.

10. Per tal de dipositar les substàncies, vaig omplir vint i quatre dels pouets seguint la següent distribució:

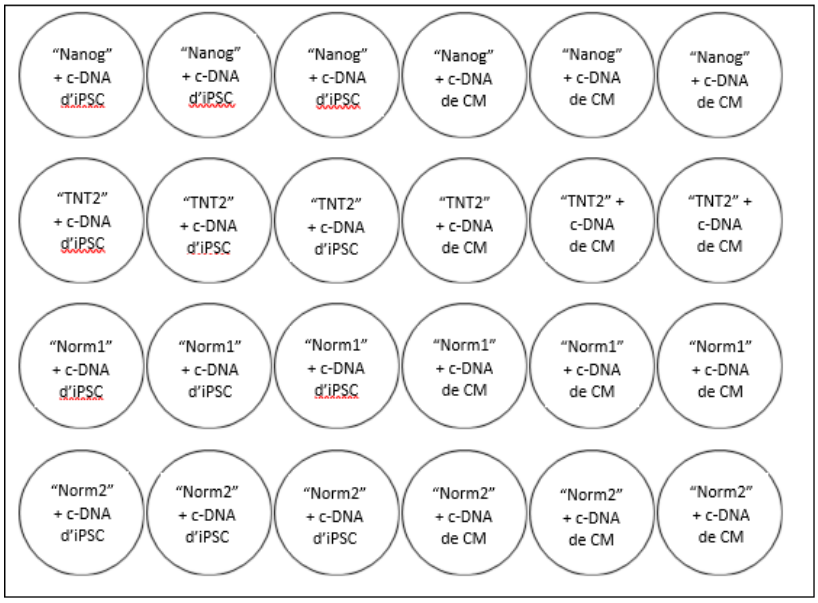


Figura 56: Distribució de les mostres a la placa.

Com es pot veure a la imatge, hi ha tres repeticions de cada mostra per assegurar la fiabilitat dels resultats en cas que hi hagi errors en la preparació d'alguna d'elles.

11. Per omplir-los, vaig dipositar 10 µL de la mostra corresponent a cada pouet utilitzant micropipeta de 10 µL de volum.

Figura 57: Diposito 10 µL de la mostra corresponent als pouets de la placa.

12. Un cop omplerts els vint-i-quatre pouets, vaig tancar la placa mitjançant un protector de plàstic amb l'ajuda d'una làmina específica per evitar que la mostra s'evapori.

Figura 58: 24 pouets de la placa.

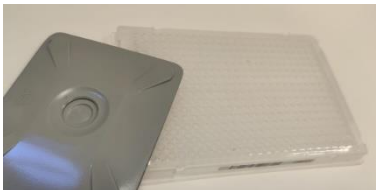


Figura 59: Placa tapada amb el plàstic protector juntament amb la peça utilitzada per fixar-lo.

13. Tot seguit, amb l'objectiu de barrejar i integrar bé totes les substàncies, vaig dipositar la placa a una ultracentrífuga i la vaig fer rotar durant un petit període de temps.

Figura 60: Placa amb les mostres dins de la ultracentrífuga.

14. Finalment, amb les mostres completament preparades, vaig dirigir-me a la "QuantStudio 7 flex", una màquina especifica per fer proves PCR. Vaig configurar una sèrie d'aspectes tècnics a l'ordinador connectat i hi vaig introduir la placa.

Figura 61: Màquina de PCR "QuantStudio 7 flex".

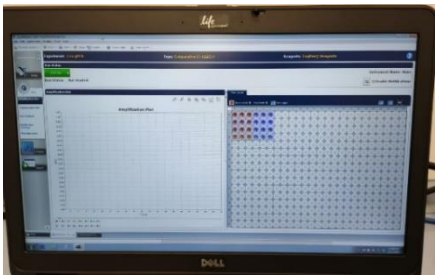


Figura 62: Configuro la màquina a través d'un ordinador connectat.

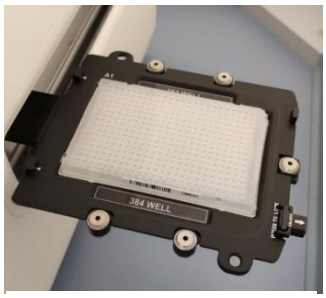


Figura 63: Insereixo la placa al suport a mida de la màquina.

15. Després de quaranta-un minuts d'espera, vaig obtenir el gràfics i les dades resultants.

Figura 64: Compte enrere per la finalització de la RT-qPCR.

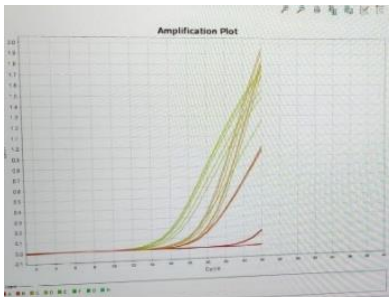


Figura 65: Gràfics en formació durant la RT-qPCR.

5.2.1. Resultats de la RT-qPCR

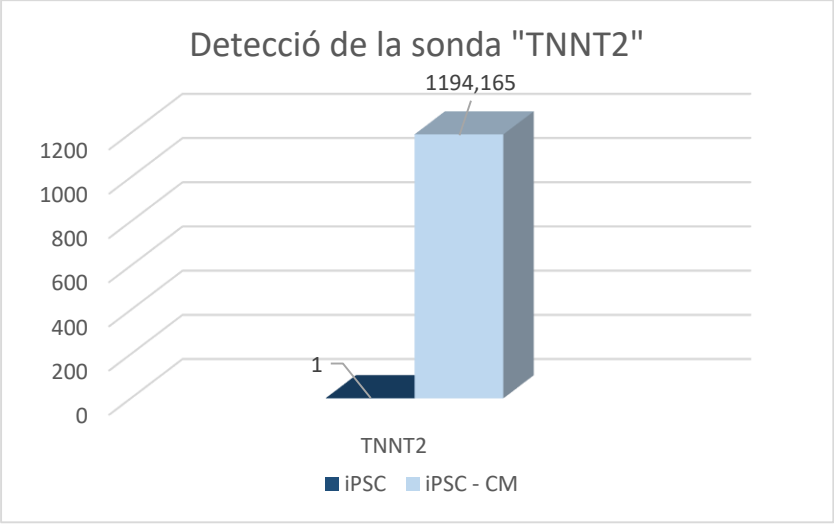


Figura 66: Detecció de la sonda "TNNT2" a la prova RT-qPCR

Tal com mostren els gràfics finals, la sonda "TNNT2", que emet fluorescència en presència d'un gen propi dels cardiomiòcits, presenta una abundant expressió a les mostres on s'hi havia afegit c-ADN provinent de cardiomiòcits derivats d'iPSCs. En canvi, a les iPSCs s'expressa de manera negligible. Per tant, es pot concloure que les cèl·lules cardíaques havien estat diferenciades amb èxit i, per tant, que el protocol seguit és efectiu.

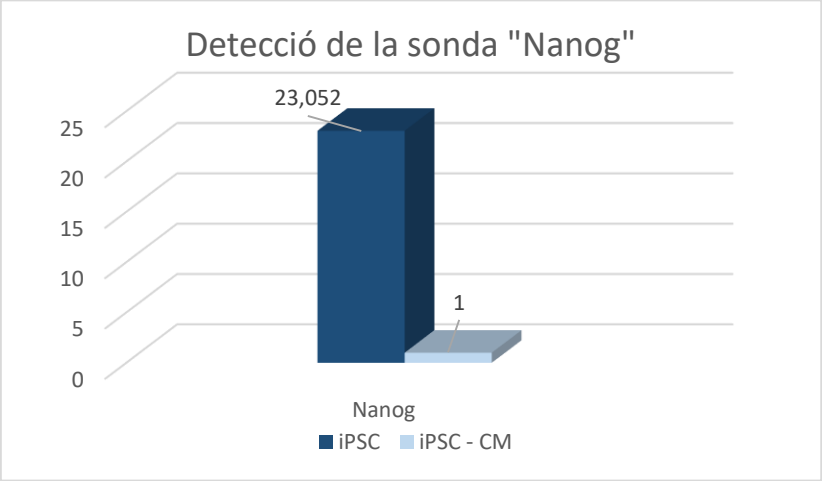


Figura 67: Detecció de la sonda "Nanog"

A més, disposem de la resta de sondes per comparar i validar els resultats. D'una banda, la sonda "Nanog" només es detecta significativament a les mostres amb c-ADN d'iPSC, ja que reconeix un gen característic d'aquesta tipologia cel·lular. Per tant, el fet que no s'expressi a les mostres de c-ADN de cardiomiòcit és una segona comprovació de la seva correcta diferenciació.

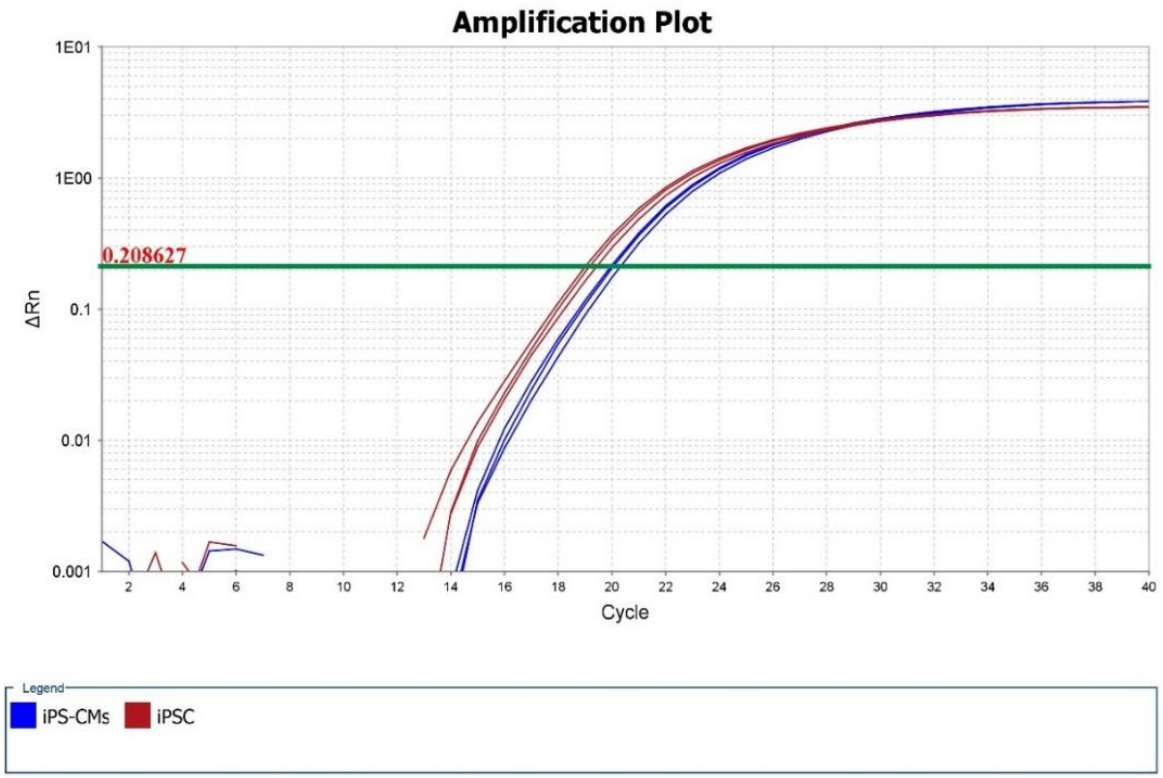


Figura 68: "Amplification plot" de la sonda "PPIA"

D'altra banda, les dues sondes control o normalitzadors es detecten tant als cardiomiòcits com a les iPSCs. El seu reconeixement es pot apreciar al "Amplification Plot"[25] generat durant la realització de la RT-qPCR. Aquest gràfic ha d'interpretar-se de la manera següent: el número de cicles (abscisses) representa el nombre de vegades que un gen ha necessitat amplificar-se perquè la màquina detecti la senyal fluorescent de les sondes de manera significativa. Un menor nombre de cicles suposa una major expressió del gen i a la inversa. En el cas dels normalitzadors, s'espera que s'expressin de manera semblant en ambdues mostres, és a dir, en el mateix cicle i, a més, que l'expressió tingui lloc en els cicles inicials.

Efectivament, tal com mostra el gràfic anterior, corresponent a la sonda "PPIA", a la qPCR hi ha una detecció igual del gen *PPIA* a la mostra de c-ADN d'iPSCs que a la de cardiomiòcits. Aquest patró d'expressió indica que les mostres havien estat preparades correctament i, per tant, que els resultats són fiables. El segon normalitzador, la sonda "18A", presenta un comportament anàleg al de l'anterior.

[25] **"Amplification plot":** gràfic creat durant una RT-qPCR que representa l'acumulació de producte, és a dir, l'expressió de cada mostra respecte al nombre de cicle del procés.

6. Centres de recerca que utilitzen cèl·lules mare a Catalunya

A Catalunya es troben diversos centres d'investigació integrats per grups que fan ús de cèl·lules mare com a eina pel desenvolupament dels seus projectes. Després d'intentar contactar amb gairebé cinquanta grups de recerca, la comunicació ha resultat exitosa en onze casos.

A continuació, presentaré un recull dels grups amb què he pogut contactar, organitzats en funció del centre a què pertanyen. Per començar, faré una explicació dels objectius, metodologia de treball i perspectives de futur dels grups en què he realitzat entrevistes als investigadors. Posteriorment, parlaré breument de la resta de grups, que han contestat un formulari sobre la seva feina i, en alguns casos, han fet possible l'accés a algun dels seus articles. Així mateix, aprofundiré en la feina que duu a terme el Banc de Línies Cel·lulars de Barcelona. Finalment, faré una valoració de la situació i en trauré unes conclusions.

A més, als annexos estan documentats la resta de grups d'investigació catalans amb què la comunicació no ha estat efectiva, juntament amb una breu introducció al seu projecte.

6.1. Grups d'investigació contactats

CENTRE: Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge – IDIBELL

- **Àrea de medicina regenerativa**

Vaig contactar amb l'Ángel Raya, cap de l'àrea de medicina regenerativa de l'IDIBELL i investigador principal del grup "Potència de cèl·lules mare", qui em va concedir una entrevista per parlar detalladament dels seus projectes i mètodes d'investigació.

Aquest centre, que rep finançament provinent de fons privats i públics catalans, espanyols i europeus, va començar a treballar amb iPSCs humanes l'any 2007, poc després d'en Yamanaka.

L'àrea de medicina regenerativa s'estructura entorn dues línies d'investigació principals. D'una banda, intenten generar estratègies per tractar pacients amb malalties degeneratives, fent especial incís en les cèl·lules del cor, la ceguera retinal i les cèl·lules sense nucli de la sang. D'altra banda, treballen en el modelatge cel·lular, que ja ha estat aplicat en un gran nombre de patologies.

Per realitzar la reprogramació cap a iPSCs poden partir de qualsevol cèl·lula somàtica del pacient. No obstant, en la majoria de casos el material d'origen són les cèl·lules perifèriques de la sang. A més, solen utilitzar virus no integratius, com el Sendai, o plasmidis episomals per introduir els factors de pluripotència. Posteriorment, un cop obtenen entre 12 i 14 clons de cada mostra, els expandeixen i els conserven mitjançant criopreservació[26].

El primer pas de la seva metodologia de diferenciació es basa a caracteritzar les cèl·lules per saber si realment són pluripotents i en una diferenciació estàndard cap a derivats d'endoderma, ectoderma o mesoderma.

El següent pas del protocol varia en funció de la cèl·lula que volen obtenir. A partir dels coneixements de què disposen sobre el que succeeix a la diferenciació del teixit d'interès durant el desenvolupament embrionari, afegeixen les substàncies necessàries per reproduir el procés "in vitro".

Gràcies a les seves múltiples avantatges i l'ampli ventall de possibilitats que presenten, consideren que les iPSCs continuaran essent indispensables per a les seves investigacions en medicina regenerativa i enginyeria de teixits durant molt de temps.

Valorant els avenços més recents dels grups que composen aquesta àrea, els seus resultats més destacats en l'últim any han estat:

- L'augment de la maduració dels cardiomiòcits.
- El desenvolupament d'un model de neurofibromatosi[27] que fa possible estudiar la procedència d'aquest tumor, que fins al moment és d'origen desconegut.
- Els avenços en projectes d'estudi del Parkinson, que duen a terme en col·laboració amb grups externs. Van diferenciar iPSCs a astròcits, fet que els va permetre veure que aquestes cèl·lules cerebrals poden emmalaltir les neurones sanes.

- Grup "Potència de cèl·lules mare"

Un dels grups que formen part de l'àrea de medicina regenerativa és el de "Potència de cèl·lules mare", que es dedica a la investigació en reparació i regeneració cardíaca.

[26] **Criopreservació:** procés pel qual les cèl·lules són conservades per refredament a temperatures inferiors als 0ºC, usualment a uns -196ºC.

[27] **Neurofibromatosi:** trastorn genètic per què es formen tumors al teixit nerviós.

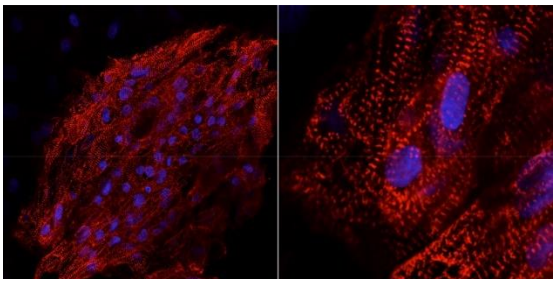


Figura 69: Cardiomiòcits derivats d'iPSCs.

La seva feina té com a objectiu la millora de la massa muscular dels cors que no funcionen correctament mitjançant la producció de cèl·lules musculars cardíaques, cardiomiòcits, fent ús de protocols basats en iPSCs. No obstant, com que les cèl·lules que s'obtenen utilitzant aquestes tècniques són força immadures, no s'acoblen elèctricament bé i, malgrat que milloren la massa muscular, provoquen errors de ritme o arrítmies. Amb la finalitat de solucionar aquest inconvenient, treballen per l'obtenció d'un grau de maduració òptim utilitzant teixits tridimensionals, com els organoides.

CENTRE: Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer – IDIBAPS

- **Grup "Plasticitat i reparació tissular en malalties hepàtiques"**

Després de posar-me en contacte amb el grup, vaig entrevistar a dues de les seves estudiants de doctorat: la Raquel Martínez i la Júlia Vallverdú.

Aquest grup, que està finançat mitjançant fons públics, es centra en la generació de models "in vitro" de cèl·lules hepàtiques diferenciades a partir d'iPSCs procedents de pacients. El seu objectiu principal és el modelatge de malalties hepàtiques cròniques, com ara la NASH[28]. Totes elles estan estretament relacionades amb l'estil de vida i poden derivar en afectacions més greus, com la cirrosi o el càncer. No obstant, malgrat que hi ha diversos compostos en fases avançades de proves clíniques, encara no hi ha cap tractament eficient i validat.

La comprovació del funcionament d'aquests tractaments consisteix en un protocol de prova basat en 3 etapes de testament bàsiques: tests en models de cèl·lules del fetge derivades d'iPSCs, tests en ratolins i, finalment, proves en un grup reduït de persones.
La investigació d'aquest grup està destinada a la primera fase d'aquest procediment, ja que pretenen desenvolupar models d'iPSCs complexos que mimetitzin el funcionament del fetge i siguin útils pel cribratge de fàrmacs.

Per realitzar els seus estudis, fan ús d'iPSCs que adquireixen ja reprogramades per un centre

[28] **NASH:** esteatosi hepàtica no alcohòlica. És una malaltia que provoca l'acumulació de greix al fetge, inflamació i lesions a les cèl·lules hepàtiques.

especialitzat. Posteriorment, les diferencien cap a dues tipologies diferents de cèl·lules hepàtiques: els hepatòcits i les cèl·lules estrellades hepàtiques.

En el cas dels hepatòcits, disposen de molts protocols diferents. Això es deu al fet que, des del sorgiment de les iPSCs, la investigació havia estat exclusivament centrada en aquestes cèl·lules, que conformen el 80% del contingut cel·lular del fetge.

En canvi, han desenvolupat un nou protocol per a la diferenciació cap a cèl·lules estrellades hepàtiques que, malgrat que no havien rebut gaire atenció per part de la comunitat científica, juguen un paper molt important en el desenvolupament de malalties

Fins al moment, un dels avenços més importants que han dut a terme és el desenvolupament d'un esferoide, és a dir, una estructura 3D que es forma quan s'agreguen cèl·lules estrellades a hepatòcits. És especialment útil perquè, com que conté dos tipus de cèl·lules diferents i aquestes estableixen interaccions entre si, el seu funcionament presenta una major semblança al que trobaríem en el fetge d'un pacient real.

Així, les seves principals perspectives de futur utilitzant iPSCs es basen a augmentar la complexitat dels models "in vitro" amb la intenció de generar "minifetges". D'aquesta manera, pretenen disminuir les diferències sorgides entre les respostes dels models cel·lulars de laboratori i les dels pacients, per així agilitzar les proves de validació de fàrmacs.

- **Grup "Malaltia del Parkinson i altres trastorns neurodegeneratius del moviment: recerca clínica i experimental"**

Un dels investigadors de l'equip, en Rubén Fernández, em va proporcionar informació molt diversa sobre la metodologia que segueixen.

Aquest grup, finançat per mitjà de fons públics i privats, es dedica a l'estudi de la clínica de la malaltia del Parkinson, una patologia caracteritzada per la pèrdua de les neurones dopaminèrgiques[29] de la substància negra [30]compacta del cervell.

Mentre que aquestes cèl·lules són inaccessibles en pacients vius, les que s'obtenen a partir de la diferenciació d'iPSCs representen un model "in vitro" vàlid per a l'estudi de la malaltia.

[29] **Neurones dopaminèrgiques:** conjunt de neurones que utilitzen la dopamina com a neurotransmissor primari.

[30] **Substància negra:** zona del cervell que forma part dels ganglis basals. Està relacionada amb el moviment, l'alerta, la visió i l'audició.

També presenten un important avantatge respecte als estudis post-mortem, que es realitzen als estadis finals de la malaltia, quan la majoria d'aquestes neurones ja han degenerat.

Per generar les iPSCs, parteixen de fibroblasts de pacients, que converteixen en cèl·lules fenotípicament indiferenciades (iPSCs) mitjançant l'expressió dels 3 factors *Oct4, Sox2* i *Klf4*, introduïts amb retrovirus. Posteriorment, les diferencien cap a neurones dopaminèrgiques.

Fent ús d'aquesta metodologia, pretenen estudiar les bases moleculars del Parkinson i col·laborar en el seu diagnòstic i tractament.

CENTRE: Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)

- **Grup "Teràpia gènica i cel·lular"**

En Jordi Barquinero, cap del grup, em va respondre el qüestionari i em va facilitar un article molt detallat sobre la seva investigació.

El seu projecte, finançat amb fons públics, es basa a la creació d'un model de la malaltia Reial, un tipus d'hemofília[31] B, a partir d'iPSCs. Utilitzant aquest sistema, tenen la intenció de confirmar experimentalment el mecanisme mutagen de la malaltia.

Per generar les iPSCs, introdueixen els gens de pluripotència a queratinòcits i fibroblasts fent ús de vectors episomals.

Un cop les han obtingut, les diferencien cap a hepatòcits seguint un protocol que mimetitza el desenvolupament del ronyó. Posteriorment, analitzen l'mARN[32] del seu gen F9.

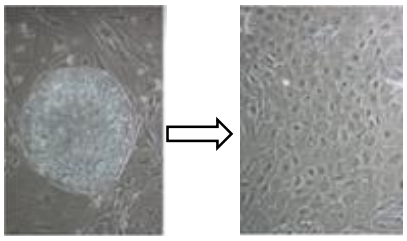


Figura 70: iPSCs (dia 0) vs. hepatòcits (dia 27).

En estudis recents, aquests experiments han demostrat l'empalmament anormal prèviament previst a la transcripció del gen F9.

CENTRE: Institut de Bioenginyeria de Catalunya – IBEC

- **Grup "Biosensors per bioenginyeria"**

Una estudiant de doctorat del grup, la Laura Clua, em va proporcionar informació sobre la

[31] **Hemofília:** malaltia genètica que impedeix que la sang coaguli correctament.

[32] **mARN:** ARN missatger. És una molècula d'ARN transcrita a partir d'una plantilla d'ADN que serveix de model per a la síntesi de productes proteics.

seva recerca mitjançant la resposta al formulari proposat.

El seu projecte, que rep finançament públic i privat, consisteix a utilitzar la medicina regenerativa per diferenciar iPSCs cap a cèl·lules del pàncrees per tal de generar un teixit tridimensional que pugui secretar insulina.

Reprogramen ells mateixos les iPSCs i, un cop les han obtingut, duen a terme un complex procés de diferenciació, que consta de 5 etapes, cap a cèl·lules productores d'insulina.

En obtenir les cèl·lules diferenciades, les encapsulen en hidrogels de col·lagen per així generar els teixits pancreàtics en tres dimensions.

En un futur pròxim, pretenen fer trasplantaments a pacients amb diabetis.

CENTRE: Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias – IGTP

- **Grup "Càncer hereditari"**

Vaig posar-me en contacte amb l'Eduard Serra, cap del projecte, i amb la Meritxell Carriol, coordinadora del laboratori, qui em va respondre una sèrie de preguntes.

Aquest grup es dedica a l'estudi d'una malaltia hereditària anomenada Neurofibromatosis de tipus 1 (NF1). Els pacients afectats per aquesta patologia presenten mutacions al gen *NF1*, fet per què tenen predisposició a generar neurofibromes, una classe de tumors benignes del sistema nerviós perifèric que es poden malignitzar. Aquests són originats pel llinatge de les "cèl·lules de Schwann".

El seu objectiu és generar models cel·lulars a partir d'iPSCs que permetin reproduir la formació de neurofibromes "in vitro" per estudiar l'origen cel·lular dels tumors.

La feina que duen a terme els investigadors consisteix a generar iPSCs a partir de neurofibromes plexiformes de pacients mitjançant l'ús del virus Sendai.

Posteriorment, les diferencien cap a la cresta neural durant vint dies i, seguidament, cap a cèl·lules de Scwhann durant trenta dies.

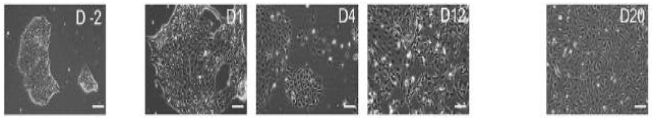


Figura 71: Representació fotogràfica del procés de diferenciació cap a cèl·lules mare de la cresta neural durant els dies -2, 1, 4, 12 i 20 (últim).

La seva principal observació ha estat que les iPSCs procedents de neurofibromes es poden diferenciar correctament fins a l'estadi de cresta neural. No obstant, mentre que les cèl·lules

no tumorals deixen de proliferar a l'estadi de cèl·lules de Schwann, les tumorals continuen i generen esferes, semblants a petits tumors. A més, injectades a ratolins, poden provocar tumors similars a neurofibromes.

En un futur, pretenen fer ús de la tecnologia d'edició gènica CRISPR/Cas9 per introduir mutacions a les iPSCs tumorals i fer models de tumors malignes.

CENTRE: Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona – IBUB

- **Grup "Genètica molecular humana"**

El cap de la investigació, en Daniel Grinberg, em va respondre al formulari.

El seu grup, que està íntegrament finançat per fons públics, treballa en l'àmbit de les malalties neurològiques fent ús de coneixements en genètica i biologia molecular i cel·lular. Com que les cèl·lules cerebrals no poden ser obtingudes a partir dels mateixos pacients, la seva feina es centra en la generació de models cel·lulars útils per assajar estratègies terapèutiques destinades a tractar la malaltia de Sanfilippo[33].

Per tant, produeixen iPSCs a partir de fibroblasts de pacients amb aquesta patologia per després poder diferenciar-les cap a les neurones d'interès. Per reprogramar els fibroblasts fan ús de 3 dels factors de Yamanaka: l'*Oct4*, el *Klf4* i el *Sox2*.

Després d'haver obtingut les iPSCs, les diferencien cap a dues tipologies cel·lulars cerebrals: les neurones i els astròcits**.**

A més, també generen neurones amb mutacions específiques mitjançant la tecnologia d'edició genòmica anomenada "CRISPR/Cas9".

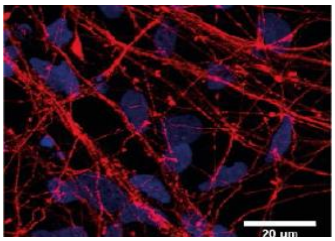


Figura 72: Neurones vistes al microscopi.

Un cop han generat les cèl·lules necessàries per realitzar els estudis, es dediquen a testar tractaments enfocats a eliminar l'heparà sulfat, un substrat que acostuma a acumular-se a les cèl·lules dels pacients.

Com a objectiu de futur, tenen intenció de generar organoides, és a dir, "minicervells", a partir d'iPSCs.

[33] **Síndrome de Sanfilippo:** malaltia genètica, degenerativa i incurable que afecta el sistema nerviós central dels infants.

- **Grup "Genètica molecular de distròfies retinals hereditàries"**

La Gemma Marfany, investigadora principal del grup, va completar el formulari i em va facilitar un dels seus articles.

El seu grup, finançat per organitzacions públiques i privades, es centra a identificar nous gens causants de la ceguesa hereditària fent ús de models cel·lulars i animals i iPSCs. Mitjançant aquests estudis, pretenen determinar les funcions d'aquests gens tant en condicions fisiològiques com mutades amb la finalitat de desenvolupar teràpies amb major eficàcia que disminueixin o curin aquesta classe de malalties.

Fan ús d'iPSCs de dues procedències diferents: dels fibroblasts d'un pacient amb ceguesa hereditària i dels de la seva germana, que no està afectada per la malaltia. En ambdós casos, per dur a terme la reprogramació, van introduir els factors *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* i *c-Myc* amb virus Sendai i van deixar proliferar les cèl·lules als medis de cultiu adequats. Finalment, van demostrar l'expressió dels marcadors de pluripotència per mitjà d'un anàlisi d'immunofluorescència i per citometria[34].

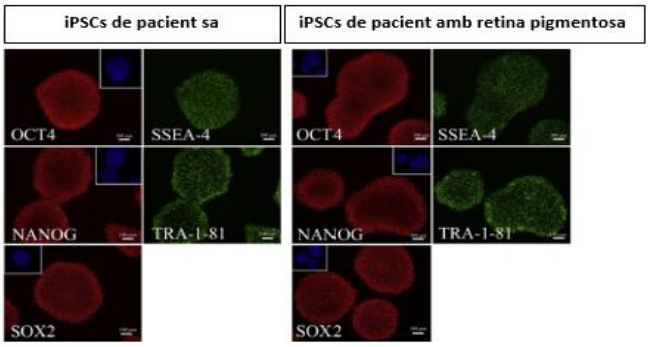


Figura 73: Anàlisi d'immunofluorescència.

Per dur a terme el posterior protocol de diferenciació formen un cos embrionari, que és un agregat tridimensional de cèl·lules mare pluripotents, i canvien el seu medi de cultiu periòdicament. Un cop obtenen les cèl·lules desitjades, les estudien i analitzen.

El seu resultat més destacat ha estat la generació d'organoides de retina, similars a "miniretines", tant de pacients com de subjectes sans.

CENTRE: Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques – IMIM

- **Grup "Cèl·lules mare del càncer i metàstasi"**

El cap del grup, l'Antoni Celà, em va respondre el formulari amb informació molt detallada sobre la seva recerca.

[34] **Citometria**: anàlisi de les característiques de la cèl·lula mitjançant una inspecció al microscopi.

Malgrat que treballen en diversos projectes, estan principalment centrats en l'estudi dels mecanismes que comparteixen les cèl·lules mare normals de la mama i les cèl·lules canceroses. D'aquesta manera, pretenen entendre com les últimes treuen avantatge de les primeres per sobreviure i perquè el càncer progressi.

A partir d'aquests coneixements sobre els tumors i el seu comportament, tenen com a objectiu trobar noves dianes terapèutiques.

A l'hora de realitzar estudis, aïllen cèl·lules mare adultes de la glàndula mamària per fer exploracions "in vitro" tant a nivell transcriptòmic[35] com funcional.

Un dels principals resultats que han obtingut és el descobriment que totes dues tipologies cel·lulars presenten una baixa resposta als interferons (IFN) alliberats pel sistema immunitari.

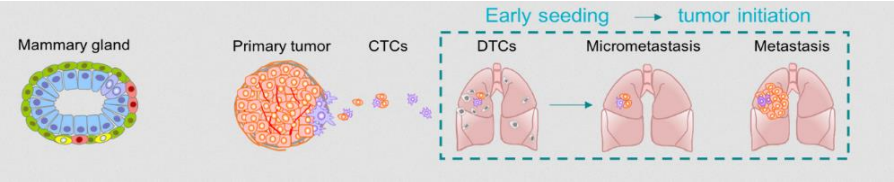


Figura 74: Procés de transformació d'un tumor primari a la glàndula mamària en una metàstasi al pulmó.

CENTRE: Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona – IRB Barcelona

- **Grup "Càncer colorectal"**

La Clara Morral, estudiant de post-doctorat, em va respondre el formulari.

El projecte d'aquest grup, que rep suport econòmic tant de fons públics com privats, es centra en la identificació de processos específics de les cèl·lules mare tumorals mitjançant l'ús de cèl·lules mare adultes del càncer de còlon.

Per dur a terme els seus estudis, comencen per obtenir mostres de cèl·lules mare dels pacients i establir cultius primaris. Posteriorment, les manipulen genèticament per poder estudiar les seves vulnerabilitats i identificar dianes terapèutiques.

La seva conclusió principal ha estat que les cèl·lules mare estudiades són altament dependents de la producció d'ARN ribosomal i de la síntesi de proteïnes. Gràcies a aquests coneixements,

[35] **Nivell transcriptòmic:** conjunt total de molècules d'ARNm.

es podran generar nous fàrmacs que afectin aquests processos biològics i siguin eficaços en el tractament del càncer.

A més, una de les seves perspectives de futur és la implantació de tècniques d'edició gènica.

6.2. El Banc de Línies Cel·lulars de Barcelona (BLCB)

Vaig realitzar una entrevista a la Begoña Aran, coordinadora del Banc de Línies Cel·lulars. Es tracta d'una unitat del Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB), composada per laboratoris de cultiu cel·lular i caracterització, entre d'altres.

Principalment, aquest banc es dedica a la derivació, el manteniment i la preservació de cèl·lules mare pluripotents induïdes, que generen per tal que altres investigadors puguin fer recerca. No obstant, aquestes no poder ser utilitzades per tractar pacients, ja que són portadores de la mutació de la patologia.

D'una banda, els passos que segueixen per fer un cultiu de cèl·lules mare embrionàries són els següents:

1. Aïllen la massa cel·lular interna de l'embrió en estadi de blastòcit.
2. La cultiven sobre una monocapa de fibroblasts humans, que aporten al medi una sèrie de factors que ajuden a mantenir les cèl·lules indiferenciades mentre creixen.
3. Si tot funciona correctament, les cèl·lules es multipliquen. Un cop la colònia cel·lular és molt gran, es comencen a realitzar els anomenats "passes cel·lulars". Aquests consisteixen a dividir el cultiu en fragments, que es dipositen sobre altres plaques amb nous fibroblasts.

Acostumen a fabricar ells mateixos el medi de cultiu mitjançant un medi basal a què afegeixen factors de creixement, glutamina, sèrum i altres factors.

Posteriorment, com que les cèl·lules creixen a gran velocitat, solen congelar-les i guardar-les per necessitats futures. Això ho duen a terme per mitjà de la tècnica de criopreservació, en què utilitzen sèrum fetal i DMSO (dimetil sulfòxid) per evitar que es formin cristalls que puguin llisar les cèl·lules.

D'altra banda, quan generen iPSCs utilitzen diferents tècniques de reprogramació en funció de les preferències dels investigadors. Malgrat que inicialment feien ús de retrovirus, els

mètodes que solen utilitzar actualment són el virus Sendai i els factors episomals. A més, fan ús dels quatre factors de Yamanaka: l'*Oct4*, el *Sox2*, el *c-Myc* i el *Klf4*.

Un cop realitzat aquest procés, comproven si les cèl·lules generades són pluripotents detectant l'expressió de marcadors específics.

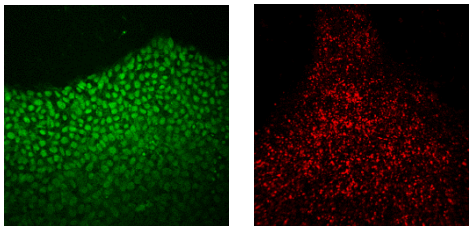


Figura 75: Cèl·lules mare pluripotents tenyides amb els marcadors de pluripotència Nanog (verd) i SSEA3 (vermell).

Malgrat que no ofereixen el servei de diferenciació a grups externs, els investigadors del centre del qual forma part el banc, el CMRB, sí que en diferencien per realitzar projectes propis.

Els protocols que segueixen varien segons els factors de creixement, citoquines, àcids i vitamines que necessita cada tipologia cel·lular.

Els dos principal projectes de futur del banc són:

- Una col·laboració amb el Banc de Sang i Teixits (BST) per produir iPSCs en condicions GMP (Good Manufacturing Practice), que consisteixen principalment en l'ús de sales blanques[36] i de productes d'origen no animal. Gràcies a aquest protocol, les iPSCs generades sí que podrien ser utilitzades per a teràpies en pacients.
- Generar set línies cel·lulars d'iPSCs amb els anticossos més comuns als humans per tal de desenvolupar nous tractaments.
- Diferenciar iPSCs a cèl·lules mare de la retina per tractar atròfies retinals i intentar que els pacients recuperin part de la visió.

6.3. Avantatges i inconvenients de l'ús d'iPSCs segons els investigadors

6.3.1. Avantatges

Després de contactar amb grups molt diversos i dur a terme una exhaustiva recerca d'informació, es poden determinar quins són els principals avantatges que suposen les iPSCs respecte a altres tipologies de cèl·lules mare.

Des d'un punt de vista general, pel simple fet de ser mare, estan dotades d'una molt alta

[36] **Sales blanques:** sales dissenyades per obtenir baixos nivells de contaminació.

capacitat de divisió que els permet expandir-se molt ràpidament. D'aquesta manera, els centres poden obtenir una quantitat il·limitada de cèl·lules, fet que facilita la realització d'estudis. A la vegada, com que són pluripotents, permeten generar qualsevol tipologia cel·lular que es vulgui, fins i tot aquelles cèl·lules de difícil obtenció a l'organisme.

D'una banda, són especialment útils en la investigació de patologies genètiques, ja que, com poden ser produïdes específicament a partir de cèl·lules del mateix pacient, es pot tenir en compte el "background" genètic dels malalts.

D'altra banda, són indispensables per dur a terme teràpia cel·lular. No només asseguren que no hi hagi rebuig, sinó que són les úniques cèl·lules que poden repoblar "in vivo" i mantenir l'homeòstasi en els diferents teixits. De fet, en molts casos, el trasplantament d'aquestes cèl·lules pot substituir el trasplantament d'òrgans. Aquest punt és de vital importància ja que, mentre que hi ha una important escassetat d'òrgans, aquestes cèl·lules es poden fer créixer indefinidament. Fins i tot, podrien permetre tractar malalties que actualment no poden ser intervingudes amb trasplantaments d'òrgans.

A més, són ideals per realitzar teràpia gènica gràcies al fet que poden ser modificades genèticament amb facilitat.

6.3.2. Inconvenients

Malgrat que les iPSCs són una eina amb grans perspectives de futur, també presenten alguns riscos i inconvenients que cal tenir en compte a l'hora de treballar amb elles.

Un dels punts més destacats és la dedicació i gran quantitat de feina que requereixen. Treballar amb aquestes cèl·lules és un procés lent i és necessari que el personal estigui molt ben format, ja que s'han de seguir protocols específics molt precisos. A més, els recursos i materials utilitzats tenen costs molt elevats.

A l'hora de desenvolupar tractaments, cal tenir presents els nombrosos efectes secundaris que poden provocar. Les iPSCs presenten una alta probabilitat de contaminació, fet que pot resultar en mutacions genètiques. A més, els organoides que generen no sempre presenten un comportament idèntic al de l'òrgan real. De la mateixa manera, les cèl·lules obtingudes acostumen a ser bastants immadures i no permeten la detecció de problemes que únicament sorgeixen en graus de maduració superiors.

No obstant, la contraindicació que més preocupació causa en el moment d'introduir aquestes cèl·lules a un organisme és el possible desenvolupament de tumors, altrament dit, el risc oncogènic. Com que les iPSCs posseeixen una taxa de proliferació molt elevada, suposen el perill que, un cop al cos del malalt, creixin descontroladament i generin un tumor.

Finalment, cal contemplar que, en la majoria de casos, quan s'avaluen els tractaments "in vitro" només s'estudien els efectes de la teràpia en un òrgan concret. En conseqüència, no es pot predir quina repercussió pot tenir en la resta de l'organisme.

6.4. Conclusions sobre l'estat de la investigació amb cèl·lules mare

A partir de la informació aportada per diversos investigadors i investigadores de múltiples grups de recerca catalans, es poden extreure una sèrie de conclusions respecte a l'estat de la investigació amb cèl·lules mare i iPSCs a Catalunya.

A continuació, hi ha una enumeració de diferents centres que acullen grups especialitzats a treballar amb aquestes tipologies cel·lulars. Cal destacar que tots ells, excepte un, es troben situats a Barcelona, que és on es concentren la majoria d'institucions científiques.

Aquests són els setze centres i els seus respectius àmbits d'actuació i localització:

- **Centre de Regulació Genòmica (CRG):** investigació bàsica en biomedicina, fent especial incís en la genòmica i la proteòmica[37]. (Barcelona)
- **Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL):** investigació en biomedicina centrada en el càncer, les neurociències, la medicina translacional i la medicina regenerativa. (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona)
- **Vall d'Hebron – Institut de Recerca (VHIR):** investigació bàsica, clínica i translacional a les àrees de l'oncologia, la biologia vascular i el metabolisme, les neurociències, les malalties infeccioses, les malalties digestives i hepàtiques, les malalties immunomesurades... (Barcelona)
- **Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB):** investigació en biologia molecular i cel·lular i biologia estructural i computacional centrant-se en el càncer, l'envelliment, el metabolisme i els mecanismes de les malalties. (Barcelona)

[37] **Proteòmica:** estudi bioquímic de les proteïnes.

- **Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC):** investigació en bioenginyera i nanomedicina. Són experts en els camps de la regeneració de teixits, la biomecànica, la dinàmica molecular, la biomimètica, els òrgans "en-un-xip", la migració cel·lular, les cèl·lules mare... (Barcelona)
- **Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS):** recerca biomèdica especialitzada en diversos àmbits, com l'agressió biològica, la bioenginyeria, el metabolisme, les neurociències i l'oncologia. (Barcelona)
- **Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM):** investigació en biomedicina i ciències de la salut amb projectes específics pel càncer, l'epidemiologia i la salut pública, la informàtica biomèdica, les neurociències i els processos inflamatoris i cardiovasculars. (Barcelona)
- **Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Tries i Pujol (IGTP):** recerca focalitzada en ciències del comportament i abús de drogues, immunologia i inflamació, malalties cardiovasculars, malalties infeccioses, malalties hepàtiques, càncer, neurociència, metabolisme... (Badalona, Barcelona)
- **Sant Pau Institut de Recerca (IbSantPau):** investigació en els camps de les malalties cardiovasculars, les malalties genètiques, l'oncologia, les malalties neurològiques i mentals, l'uronefrologia, l'epidemiologia... (Barcelona)
- **Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi):** recerca en biomedicina especialitzada en oncohematologia, malalties cardiovasculars, metabolisme, inflamació i neurociències. (Salt, Girona)
- **Vall d'Hebron Institut d'Oncologia (VHIO):** investigació per a teràpies personalitzades i específiques contra el càncer. (Barcelona)
- **Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC):** recerca contra la leucèmia centrada en l'epigenètica, la biologia del càncer i l'hematologia experimental i clínica. (Badalona, Barcelona)
- **Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB):** investigació sobre els mecanismes genètics i cel·lulars del desenvolupament embrionari i de l'autorenovació i diferenciació de les cèl·lules mare. A més, acullen el Banc de Línies Cel·lulars. (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona)

- **Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB):** investigació biomèdica amb programes de metabolisme i plasticitat cel·lular, genètica humana i descobriment de fàrmacs. (Barcelona)
- **Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB):** recerca en biologia molecular i biomedicina amb quatre departaments dedicats a la biologia cel·lular, al desenvolupament, a la regulació genòmica i a la biologia estructural. (Barcelona)
- **Recerca a la Universitat Pompeu Fabra (UPF):** investigació en biologia cel·lular i molecular, en informàtica biomèdica, en genètica i neurociències... (Barcelona)

Un cop presentats tots els centres, es pot fer una anàlisi de les característiques generals dels seus projectes i metodologies.

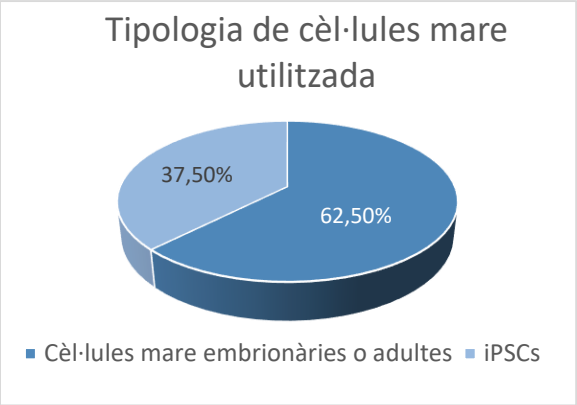


Figura 76: Gràfica comparativa de l'ús d'iPSCs i l'ús de cèl·lules mare embrionàries i adultes a Catalunya.

Per començar, en aquest gràfic es pot veure clarament la proporció de grups que estudien o utilitzen iPSCs respecte als que només treballen amb altres tipologies de cèl·lules mare. A causa del seu recent descobriment, la complexitat dels seus procediments i l'elevat cost que suposen, les iPSCs són les cèl·lules mare menys comunes a les investigacions catalanes. De fet, les embrionàries i les adultes són utilitzades per gairebé el doble de grups.

Formant part de projectes amb objectius molt diversos, tots tres tipus cel·lulars han tingut una gran repercussió en una àmplia varietat camps mèdics i científics.

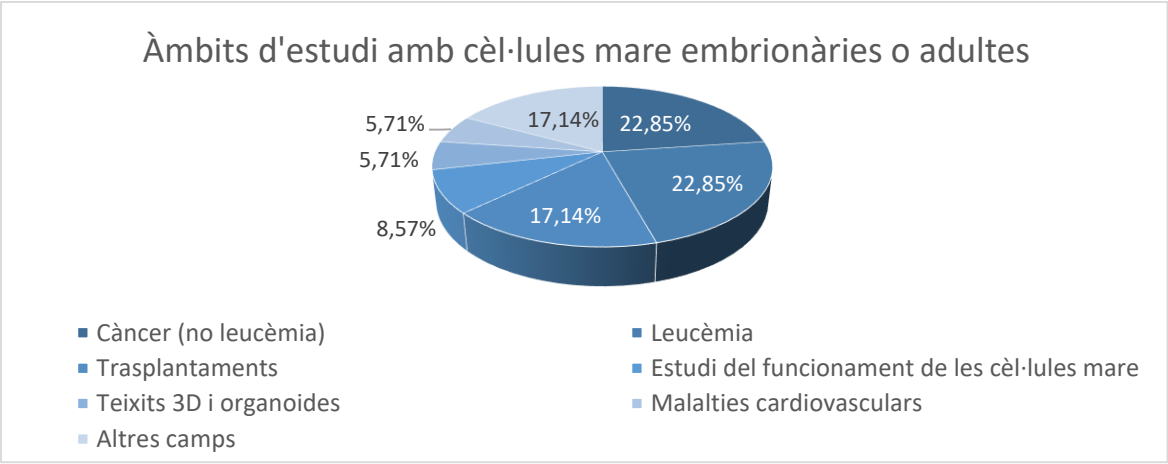


Figura 77: Gràfica comparativa dels àmbits en què s'estudia o es treballa amb cèl·lules mare embrionàries o adultes a Catalunya.

L'anterior gràfic mostra els diferents camps en què les cèl·lules mare provinents d'embrions i de cèl·lules somàtiques han jugat un paper destacat en els últims anys. Representant gairebé la meitat de la seva utilitat, els càncers, especialment la leucèmia, han estat les seves principals àrees d'impacte. Han permès l'estudi de la naturalesa de les cèl·lules mare tumorals, comparant-les amb la resta de cèl·lules de l'organisme, per així assolir un major coneixement sobre el sorgiment, el comportament i la proliferació d'aquestes malalties. En conseqüència, han fet possible l'establiment de noves dianes terapèutiques que guiaran el desenvolupament de futurs tractaments.

Per contra, tal com indica el següent gràfic, la repercussió de les iPSCs a la investigació del càncer ha quedat en un segon pla. Primerament, cal aclarir que gairebé tots els projectes en què aquestes cèl·lules estan involucrades tenen objectius destinats a la medicina regenerativa o el modelatge de malalties, que són les seves principals àrees d'incidència. Per tant, com que constituirien el 100% del gràfic, aquests camps es donen per suposats com a eina d'estudi de cada un dels àmbits esmentats a continuació.

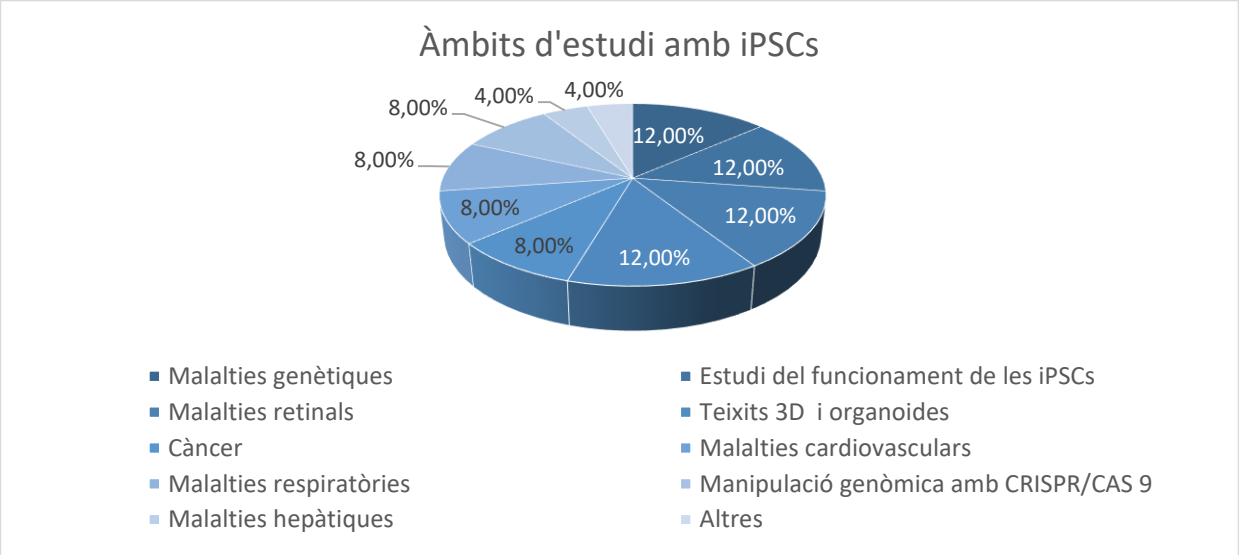


Figura 78: Gràfica comparativa dels àmbits en què s'estudia o es treballa amb iPSCs a Catalunya

Així, les iPSCs han tingut un paper especialment important en les malalties genètiques i retinals. En el primer cas, presenten un gran potencial gràcies al fet que poden ser diferenciades cap a cèl·lules amb la mutació desitjada al genoma. Per tant, combinant aquests coneixements amb l'eina de modificació genètica CRISPR/Cas9, que permet la introducció i la extracció de gens, es poden dur a terme innovadors projectes per tal d'entendre els efectes, el comportament i la transmissió a la descendència de les malalties hereditàries. En el cas de

les patologies relacionades amb la degeneració de la retina, les iPSCs destaquen en la recerca dedicada a la ceguera retinal. Fins i tot, el seu ús podria resultar útil per la recuperació d'una part de la visió dels pacients.

Tot i que en un menor grau, també han comportat un important avenç en l'estudi de malalties de caràcter respiratori i hepàtic.

A més, hi ha una sèrie d'àmbits en què totes tres tipologies de cèl·lula mare han tingut un impacte considerable. D'una banda, un dels més rellevants és el desenvolupament de teixits tridimensionals o organoides, una nova tecnologia en què molts grups estan interessats. El principal avantatge que suposen aquestes estructures és el fet que simulen un òrgan real a l'organisme, ja que estan constituïts per la unió de diverses tipologies de cèl·lula que estableixen interaccions entre si. D'aquesta manera, es poden estudiar els efectes de nous fàrmacs i teràpies a escala d'òrgan, en comptes de centrar-se en una única tipologia cel·lular.

Així mateix, les cèl·lules mare estan suposant una important revolució en el terreny dels trasplantaments. El seu ús soluciona la problemàtica causada per la manca d'òrgans i, fins i tot, possibilita la realització de nous trasplantaments de cèl·lules inaccessibles a l'organisme, com les cerebrals.

D'altra banda, hi ha nombrosos grups exclusivament dedicats a estudiar els processos i el funcionament d'aquestes cèl·lules, sense focalitzar-se en cap patologia específica. Atès que les cèl·lules mare continuen essent un camp força desconegut per a la comunitat científica, aquest és un pas indispensable per seguir avençant i millorant les tecnologies existents.

De manera secundària, també han resultat útils per l'estudi d'altres malalties, com les de caràcter cardiovascular, permetent així investigar els seus orígens i el cribratge de fàrmacs.

Respecte a les iPSCs i les metodologies més recurrents a l'hora de manipular-les, s'aprecia una clara predominança de les tècniques de reprogramació que fan ús de virus Sendai o de vectors episomals. Aquesta tendència es deu a que, com he esmentat anteriorment, són tècniques no integratives que eviten la introducció de transgens no desitjats al genoma de les cèl·lules. Si ens centrem en els factors de pluripotència utilitzats, malgrat petites variacions en les combinacions, els més comuns són els quatre factors originals de Yamanaka: l'*Oct3/4*, el *Sox2*, el *Klf4* i el *c-Myc.* De la mateixa manera, com a conseqüència de la seva accessibilitat, els materials d'origen més utilitzats són els fibroblasts epitelials i les cèl·lules perifèriques de la

sang. No obstant, en funció de les necessitats dels diferents grups, hi ha una àmplia varietat de cèl·lules vàlides.

En conclusió, resulta evident que les cèl·lules mare s'han convertit en una eina indispensable pels mons de la ciència i de la medicina, ja que estan permetent dur a terme estudis i descobriments que anys enrere haurien semblat inimaginables. Més concretament, les iPSCs han suposat una veritable revolució metodològica gràcies a l'ampli ventall de possibilitats que ofereixen. Per tant, malgrat que els seus coneixements ja són aplicats a una varietat considerable d'àmbits, tot indica que els pròxims anys viuran una gran expansió i contribuiran en estudis relacionats amb tota classe de malalties. Les més prometedores perspectives de futur de les iPSCs a Catalunya es troben a la medicina regenerativa, especialment a la teràpia cel·lular, i al desenvolupament d'organoides tridimensionals, que augmentaran la fiabilitat i l'eficàcia de les proves utilitzades per testar nous tractaments.

Conclusions

Un cop enllestit el meu treball de recerca, en puc fer un balanç i treure'n unes conclusions.

Després de mesos de feina i investigació, he pogut respondre satisfactòriament totes les preguntes plantejades inicialment, complint simultàniament els meus objectius teòrics i experimentals.

D'una banda, he dut a terme una anàlisi de la situació en què es troba la investigació amb cèl·lules mare a Catalunya. Mitjançant un cribratge dels grups de recerca que en fan ús i la seva posterior col·laboració, he pogut determinar el següent:

- La medicina regenerativa, l'estudi del càncer i les malalties degeneratives són els àmbits en què les cèl·lules mare i les iPSCs estan tenint un major impacte actualment.
- Les seves perspectives de futur més prometedores es troben en els camps anteriorment esmentats, juntament amb la generació de teixits tridimensionals i la implantació de tecnologies d'edició gènica, com la CRISPR/Cas9.
- A l'hora de treballar amb iPSCs, el mètode de reprogramació més utilitzat és la introducció dels quatre factors de Yamanaka mitjançant Virus Sendai o vectors episomals en cèl·lules perifèriques de la sang o fibroblasts epitelials.

D'altra banda, centrant-nos en el marc experimental, a partir dels experiments duts terme a l'IdIBGi per realitzar i validar un protocol de diferenciació d'iPSCs, he extret diverses conclusions:

- Els protocols de diferenciació utilitzats als centres d'investigació són procediments molt pautats i altament efectius que requereixen una gran dedicació per part dels investigadors.
- Les cèl·lules diferenciades a partir d'iPSCs presenten les característiques fenotípiques i els marcadors gènics propis de les cèl·lules de la mateixa tipologia que trobem a l'organisme dels pacients. Per tant, són eines efectives i útils per a la investigació.

La realització d'aquesta part del treball m'ha permès entendre de manera més realista en què consisteix la feina dels investigadors, especialment els nivells de pressió a què estan sotmesos, i la complexitat de les metodologies que han de seguir. A més, com que ha suposat el meu primer contacte amb un laboratori professional, he pogut reflexionar sobre la concepció

errònia que s'acostuma a tenir d'aquesta professió i sobre l'indispensable paper que juga a les nostres vides.

Malgrat els bons resultats del meu projecte, durant el seu desenvolupament he hagut d'afrontar diversos inconvenients que n'han dificultat la realització. No obstant, gràcies a aquestes complicacions, he après a buscar solucions en períodes de temps curts i a saber valorar raonadament diferents alternatives.

Així mateix, gràcies a l'interès que em provoca la temàtica del treball, he pogut adquirir fàcilment nombrosos coneixements de l'àmbit de la biomedicina que em resultaran molt útils pels meus futurs estudis. A la vegada, aquesta recerca m'ha generat nous dubtes i inquietuds respecte als subtemes tractats. De fet, alguns d'ells podrien estendre's en un nou treball, com ara un estudi més extens sobre medicina regenerativa o sobre el desenvolupament i les utilitats dels models de malalties basats en iPSCs.

Finalment, com que he hagut de disseminar i adaptar grans quantitats d'informació molt especialitzada, he millorat les meves capacitats de redacció i anàlisi de dades.

En conclusió, considero que la realització del meu treball de recerca ha estat una experiència molt enriquidora, tant en l'àmbit personal com en l'acadèmic, gràcies a la qual he canviat per complet la meva percepció de la investigació medico-científica.

Nota d'agraïments

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies a tots els centres i investigadors que han participat en la part pràctica del treball, ja que sense ells aquesta recerca no hauria estat possible. Així mateix, vull fer una menció particular a l'IdIBGi i a tot el seu equip d'investigadors per agrair-los el fet d'haver-me ofert la oportunitat d'utilitzar les seves instal·lacions i haver-me guiat en la realització de les pràctiques malgrat la complicada situació en què ens trobàvem.

En segon lloc, vull fer un especial agraïment al meu tutor, l'Òscar Sancenon, per donar-me totes les pautes necessàries per desenvolupar el meu treball de recerca, ajudar-me i aconsellar-me en tot moment.

Finalment, vull agrair a la meva família el seu suport constant i la seva confiança plena en les meves capacitats.

Bibliografia

- Liang, Ping; Sallam, Karim; Wu, Haodi. «Patient-Specific and Genome-Edited Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes Elucidate Single-Cell Phenotype of Brugada Syndrome». *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 68, núm. 19 (Nov-2016), p. 2086-2096
- Musunuru, Kiran; Sheikh, Farah; Gupta, Rajat M; Houser, Steven R.; Maher, Kevin O., «Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiovascular Disease Modeling and Precision Medicine». *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, vol. 11, núm. 1 (Gen-2018)
- Daimim Houria; Khelil, Amel Haj; Neji, Ali; Hamda, Khaldoun Ben. «Role of SCN5A coding and non-coding sequences in Brugada syndrome onset: What's behind the scenes?». *Biomedical Journal*, vol. 42, núm. 4 (Ago-2019), p. 252-260
- Carrió, Meritxell; Mazuelas, Helena; Richaud-Patin, Yvonne; Lázaro, Conxi; Raya, Ángel; Serra, Eduard. «Reprogramming Captures the Genetic and Tumorigenic Properties of Neurofibromatosis Type 1 Plexiform Neurofibormas». *Stem Cell Reports*, vol. 12, núm. 2 (feb-2019), p. 411-426
- Bolinches-Amorós, Arantza; Léon, Marian; del Buey Furió, Verónica; Marfany, Gemma, Gonzàlez-Duarte, Roser; Erceg, Slaven; Lukovic, Dunja. «Generation of an iPSC line from a retinitis pigmentosa patient carrying a homozygous mutation in CERKL and a healthy sibling». *Stem Cell Research*, vól. 38 (jul-2019)
- Martorell, L.; Luce, E.; Vazquez. J.L.; Richaud-Patin, Y.; Jimenez-Delgado, S.; Raya, A.; Barquinero. J.; «Advanced cell-based modeling of the royal disease: characterization of the mutated F9 mRNA». *Journal of Thrombosis and Haemostasis,* vol. 15, núm. 11 (Ago 2017), p. 2188-2197
- Woong Hang, Ji; Yoon, Young-sup; «Induced pluripotent stem cells: Emerging Techniques for Nuclear Reprogramming». *Antioxidants and Redox Signaling,* vol. 15, núm. 7 (Oct – 2011), p. 1799 – 820
- Pimentel Parra, G.A; Murcia-Ordóñez, B.; «Células madre, una nueva alternativa médica». *Perinatología y reproducción humana,* vol. 31, núm. 1 (Nov – 2017), p. 28-33

- Singh Mahla, Ranjeet; «Stem Cells Applications in Regenerative Medicinie and Disease Therapeutics». *International Journal of Cell Biology* (Jul – 2016)
- Lliu, Shuyu; Yin, Nuoya; Faiola, Francesco; «Prospects and Frontiers of Stem Cell Toxicology». *Stem cells and development, vol. 26, núm. 21 (Nov – 2017), p. 1528 – 1539*
- Luz, Anthony L.; Tokar, Erik J.; «Pluripotent Stem Cells i Developmental Toxicity Testing: A Review of Methodological Advances». *Toxicological Sciences,* vol. 165, núm. 1 (Set – 2018), p. 31-39
- Rubin, Lee L.; Haston, Kelly M.; «Stem cell biology and drug discovery». *BMC Biology,* vol. 9, núm. 45 (Jun – 2011)
- Cepero Noriega, Fara Luisa; Hernandez, Hernandez, Bárbara Aymée; Carrero Texidor, Yenisset; «Aspectos bioéticos en los tratamientos con células madre». *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 30, núm. 4 (dic – 2011), p.528 – 536
- Hyun, Insoo; «The bioethics of stem cell research and therapy». *The journal of clinical investigation,* vol. 120, núm. 1 (Gen – 2010), p. 71 – 75

Webgrafia

- *What are stem cells, and what do they do?* MedicalNewsToday. 2018. https://www.medicalnewstoday.com/articles/323343.php#donating-and-harvesting (11/01/20)
- *What are totipotent stem cells?* TechnologyNetworks. 2019. https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/what-are-totipotent-stem-cells-319771 (22/01/20)
- *Cell potency: Totipotent vs pluripotent vs multipotent Stem Cells*. Technology Networks. 2018. https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cell-potency-totipotent-vs-pluripotent-vs-multipotent-stem-cells-303218 (22/01/20)
- *Células madre pluripotentes.* CélulasMadreWeb. https://www.celulasmadreweb.com/pluripotentes/ (22/01/20)
- *Células madre: qué son y qué hacen.* MayoClinic. 2019. https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/bone-marrow-transplant/in-depth/stem-cells/art-20048117 (02/02/20)
- *Uso clínico y ético de las células madre pluripotentes inducidas.* http://udep.edu.pe/hoy/files/2018/08/Arti%CC%81culo-cienti%CC%81fico-de-revista-Medicina-e-Morale.pdf (02/02/20)
- *Induced pluripotent stem cells: the future of tissue regeneration*. Huntington's Outreach Project for Education, at Stanford. 2011. https://hopes.stanford.edu/induced-pluripotent-stem-cells-the-future-of-tissue-generation/ (04/02/20)
- *Derivaciones del electrocardiograma.* MyEKG. 2020. https://www.my-ekg.com/generalidades-ekg/derivaciones-cardiacas.html (26/04/2020)
- *Application of stem cells.* ViTA 34. 2020. https://www.vita34.de/en/stem-cells/application/ (28/04/2020)
- *Aplicaciones de las células madre.* Vidacord. 2020. http://www.vidacord.es/proceso-conservacion-cordon-umbilical/aplicaciones-celulas-madre (28/04/2020)
- *Dosis altas de quimioterpia y trasplante de células madre para el linfoma no Hodgkin.* American Cancer Society. 2020. https://www.cancer.org/es/cancer/linfoma-no-hodgkin/tratamiento/celulas-madre-de-la-medula-osea.html (30/04/2020)

- *Cèl·lules mare embrionàries i meidcina regenerativa.* Mètode. 2011. https://metode.cat/revistes-metode/monografics/cellules-mare-embrionaries-i-medicina-regenerativa.html (30/04/2020)
- *Utilitzan celulas madre para tratar el COVID-19.* Muyinteresante. 2020. https://www.muyinteresante.es/salud/articulo/actualidad-utilizan-celulas-madre-para-tratar-el-covid-19 (08/06/2020)
- *Identifiquen un fàrmac capaç de bloquejar el coronavirus en etapes primerenques*. El Perdiódico. 2020. https://www.elperiodico.cat/ca/societat/20200402/descobriment-farmac-bloqueig-coronavirus-covid-19-7915649 (08/06/2020)
- *UPF.* https://www.upf.edu/web/biomed/programmes (18/06/2020)
- *Induced Pluripotent Stem Cell Differentiaation Protocols.* MeRCK. 2020. https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/ipsc-differentiation.html (11/06/2020)
- *Stem cells.* Wikipedia. *2020.* https://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell (11/06/20)
- *Canalopatías*. Wikipedia. 2019. https://es.wikipedia.org/wiki/Canalopat%C3%ADa (11/06/20)
- *Cell potency.* Wikipedia. 2020. https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_potency#Totipotency (11/06/20)
- *Stem Cells for Modeling Human Disease.* Intechopen. 2016. https://www.intechopen.com/books/pluripotent-stem-cells-from-the-bench-to-the-clinic/stem-cells-for-modeling-human-disease (11/06/2020)
- *Bioética de las Células Madre.* http://aebioetica.org/revistas/2002/47-48-49/89.pdf (14/06/2020)
- *"El uso correcto de las células madre inducidas requiere de la ética".* Udep. 2018. http://udep.edu.pe/hoy/2018/el-uso-correcto-de-las-celulas-madre-inducidas-requiere-de-la-etica/ (14/06/2020)
- *IDIBELL.* 2020. https://idibell.cat/recerca/ (16/06/2020)
- *CRG.* 2013. https://www.crg.eu/en/research-0 (16/06/2020)
- *IRBBARCELONA.* 2020. https://www.irbbarcelona.org/ca/research (16/06/2020)
- *IBEC.* 2020. http://www.ibecbarcelona.eu/ca/research-groups/ (16/06/2020)

- *IDIBAPS.* 2020. https://www.clinicbarcelona.org/ca/idibaps/arees-de-recerca (16/06/2020)
- *IMIM.* https://www.imim.es/ (16/06/2020)
- *IdIBGI:* https://www.idibgi.org/ca (18/06/2020)
- *IGTP.* http://www.germanstrias.org/about-us/ca-index (18/06/2020)
- *Sant Pau Institut de Recerca.* http://www.recercasantpau.cat/institut/iib-sant-pau/presentacio/ (18/06/2020)
- *VHIO.* https://www.vhio.net/ca/ (18/06/2020)
- *IBUB.* http://www.ub.edu/ibub/research/ (18/06/2020)
- *IBMB.* 2020. https://www.ibmb.csic.es/en/research-groups/ (18/06/2020)

Bibliografia d'imatges

- **Figura portada:** cedida pel grup d'investigació de l'IdIBGi.
- **Figura 1:** creació pròpia.
- **Figura 2:** creació pròpia.
- **Figura 3:** creació pròpia.
- **Figura 4:** creació pròpia.
- **Figura 5:** creació pròpia.
- **Figura 6:** creació pròpia.
- **Figura 7:** creació pròpia a partir de "https://elpais.com/ciencia/2020-04-03/doscientos-enfermos-probaran-un-farmaco-que-ha-bloqueado-el-coronavirus-en-minirrinones-humanos.html".
- **Figura 8:** creació pròpia.
- **Figura 9:** creació pròpia.
- **Figura 10:** creació pròpia.
- **Figura 11:** creació pròpia.
- **Figura 12:** creació pròpia.
- **Figura 13:** creació pròpia.
- **Figura 14:** creació pròpia.
- **Figura 15:** creació pròpia.
- **Figura 16:** creació pròpia.
- **Figura 17:** creació pròpia.
- **Figura 18:** creació pròpia.
- **Figura 19:** creació pròpia.
- **Figura 20:** creació pròpia.
- **Figura 21:** creació pròpia.
- **Figura 22:** creació pròpia.
- **Figura 23:** creació pròpia.
- **Figura 24:** creació pròpia.
- **Figura 25:** creació pròpia.
- **Figura 26:** creació pròpia.
- **Figura 27:** creació pròpia.

- **Figura 28:** creació pròpia.
- **Figura 29:** creació pròpia.
- **Figura 30:** creació pròpia.
- **Figura 31:** creació pròpia.
- **Figura 32:** creació pròpia.
- **Figura 33:** creació pròpia.
- **Figura 34:** creació pròpia.
- **Figura 35:** creació pròpia.
- **Figura 36:** creació pròpia.
- **Figura 37:** creació pròpia.
- **Figura 38:** creació pròpia.
- **Figura 39:** creació pròpia.
- **Figura 40:** creació pròpia.
- **Figura 41:** creació pròpia.
- **Figura 42:** creació pròpia.
- **Figura 43:** creació pròpia.
- **Figura 44:** creació pròpia.
- **Figura 45:** creació pròpia.
- **Figura 46:** creació pròpia.
- **Figura 47:** creació pròpia.
- **Figura 48:** creació pròpia.
- **Figura 49:** creació pròpia.
- **Figura 50:** creació pròpia.
- **Figura 51:** creació pròpia.
- **Figura 52:** creació pròpia.
- **Figura 53:** creació pròpia.
- **Figura 54:** creació pròpia.
- **Figura 55:** creació pròpia.
- **Figura 56:** creació pròpia.
- **Figura 57:** creació pròpia.
- **Figura 58:** creació pròpia.

- **Figura 59:** creació pròpia.
- **Figura 60:** creació pròpia.
- **Figura 61:** creació pròpia.
- **Figura 62:** creació pròpia.
- **Figura 63:** creació pròpia.
- **Figura 64:** creació pròpia.
- **Figura 65:** creació pròpia.
- **Figura 66:** creació pròpia.
- **Figura 67:** creació pròpia.
- **Figura 68:** creació pròpia.
- **Figura 69:** enviada per l'investigador Ángel Raya.
- **Figura 70:** creació pròpia basada en una de l'article: Martorell, L.; Luce, E.; Vazquez. J.L.; Richaud-Patin, Y.; Jimenez-Delgado, S.; Raya, A.; Barquinero. J.; «Advanced cell-based modeling of the royal disease: characterization of the mutated F9 mRNA». *Journal of Thrombosis and Haemostasis,* vol. 15, núm. 11 (Ago 2017), p. 2188-2197.
- **Figura 71:** Carrió, Meritxell; Mazuelas, Helena; Richaud-Patin, Yvonne; Lázaro, Conxi; Raya, Ángel; Serra, Eduard. «Reprogramming Captures the Genetic and Tumorigenic Properties of Neurofibromatosis Type 1 Plexiform Neurofibormas». *Stem Cell Reports,* vol. 12, núm. 2 (feb-2019), p. 411-426.
- **Figura 72:** enviada per l'investigador Daniel Grinberg.
- **Figura 73:** Bolinches-Amorós, Arantza; Léon, Marian; del Buey Furió, Verónica; Marfany, Gemma, Gonzàlez-Duarte, Roser; Erceg, Slaven; Lukovic, Dunja. «Generation of an iPSC line from a retinitis pigmentosa patient carrying a homozygous mutation in CERKL and a healthy sibling». *Stem Cell Research, v*ól. 38 (jul-2019).
- **Figura74:**https://www.imim.cat/media/upload//imatges/grups/celia/Home%20page2.png (12/06/2020).
- **Figura 75:** enviada per la investigadora Begoña Aran.
- **Figura 76:** creació pròpia.
- **Figura 77:** creació pròpia.
- **Figura 78:** creació pròpia.

- **Imatges dels annexos**

- **Figura portada:** creació pròpia.
- **Figura 1:** creació pròpia.
- **Figura 2:** creació pròpia.
- **Figura 3:** creació pròpia.
- **Figura 4:** creació pròpia.
- **Figura 5:** creació pròpia.
- **Figura 6:** creació pròpia.
- **Figura 7:** creació pròpia.
- **Figura 8:** creació pròpia.
- **Figura 9:** creació pròpia.
- **Figura 10:** creació pròpia.
- **Figura 11:** creació pròpia.
- **Figura 12:** creació pròpia.
- **Figura 13:** creació pròpia.
- **Figura 14:** creació pròpia.
- **Figura 15:** creació pròpia.
- **Figura 16:** creació pròpia.
- **Figura 17:** creació pròpia.
- **Figura 18:** creació pròpia.
- **Figura 19:** creació pròpia.
- **Figura 20:** creació pròpia.
- **Figura 21:** creació pròpia.
- **Figura 22:** creació pròpia.
- **Figura 23:** creació pròpia.
- **Figura 24:** creació pròpia.
- **Figura 25:** creació pròpia.
- **Figura 26:** creació pròpia.
- **Figura 27:** creació pròpia.
- **Figura 28:** creació pròpia.
- **Figura 29:** creació pròpia.

- **Figura 30:** creació pròpia.
- **Figura 31:** creació pròpia.
- **Figura 32:** creació pròpia.
- **Figura 33:** creació pròpia.
- **Figura 34:** creació pròpia.
- **Figura 35:** creació pròpia.
- **Figura 36:** creació pròpia.