
L'EFICÀCIA DELS AGENTS DE DIFERENCIACIÓ EN LA CURA DE L'APL

Nom: ChromosomicVirus

Tutora: [REDACTED]

Curs: 2020-21

12/01/21

RESUM

Durant dècades, la quimioteràpia, caracteritzada per la seva alta citotoxicitat i per l'obstacle clínic que suposen els seus efectes secundaris, ha estat el tractament més emprat per a la cura del càncer. Tanmateix, el càncer és un terme que engloba un gran conjunt de malalties relacionades altament complexes i variables, fet que possibilita l'aparició de nous tractaments cada cop més especialitzats i suposadament més eficaços.

És aquí on entra en acció l'actuació dels agents de diferenciació, uns medicaments alternatius per a un tipus de càncer molt específic, la leucèmia promielocítica aguda (APL), el segell distintiu del qual és l'expressió de la proteïna de fusió PML/RAR α . Nombrosos estudis han informat sobre el paper prometedori que exerceixen aquests medicaments, en específic d'ATRA, a l'hora de combatre i obtenir millors resultats en pacients que pateixen d'aquesta malaltia. Per tal de determinar si realment l'ATRA (tot i tenir un efecte sinèrgic en combinació amb ATO) induïx a una diferenciació, si més no, parcial dels promielòcits, es va realitzar un seguit d'experiments basats en tècniques de recompte cel·lular i anàlisi morfològica

Les dades recollides, efectivament, van demostrar que el tractament per a l'APL administrat amb ATRA mostra beneficis potencials que els medicaments quimioterapèutics, en ser citotòxics, no presenten: la capacitat d'inhibir la progressió de l'APL sense interferir en els paràmetres de supervivència cel·lular, proporcionant una nova perspectiva esperançadora de les estratègies clíniques alternatives.

RESUMEN

Durante décadas, la quimioterapia, caracterizada por su alta toxicidad y por el obstáculo clínico que suponen sus efectos secundarios, ha sido el tratamiento más utilizado en la cura contra el cáncer. Con todo, el cáncer es un término que comprende un gran conjunto de enfermedades relacionadas sumamente complejas i variables, hecho que posibilita la aparición de nuevos tratamientos cada vez más especializados y supuestamente más eficaces.

Es aquí donde entra en acción la intervención de los agentes de diferenciación, unos medicamentos alternativos para un tipo de cáncer muy específico, la leucemia promielocítica aguda (APL), cuyo sello distintivo es la expresión de la proteína de fusión PML/RAR α . Numerosos estudios han informado sobre el papel prometedori que ejercen estos medicamentos, en específic de ATRA, a la hora de combatir y obtener mejores resultados en pacientes que sufren esta enfermedad. A fin de determinar si realmente ATRA (todo y tener un efecto sinèrgic en combinación con ATO) induce a una diferenciación, si más no, parcial de los promielocitos, se realizó un seguimiento de experimentos basados en técnicas de recuento celular y análisis morfológico.

Los datos recogidos, efectivamente, demostraron que el tratamiento para la APL administrado con

ATRA muestra beneficios potenciales que los medicamentos quimioterapéuticos, al ser citotóxicos, no presentan: la capacidad de inhibir la progresión de la APL sin interferir en los parámetros de supervivencia celular, proporcionando una nueva perspectiva esperanzadora de las estrategias clínicas alternativas.

ABSTRACT

For decades, chemotherapy, characterized by its high toxicity levels and the clinical barrier of its side effects, has been the most widely used treatment in the cure for cancer. However, cancer is a term that includes a large group of highly complex and variable related diseases, which allows the emergence of new treatments increasingly specialized allegedly more effective.

This is where the intervention of differentiation agents comes into play, a kind of alternative treatments for a very specific type of cancer, acute promyelocytic leukemia (APL), whose hallmark is the expression of the PML/RAR α fusion protein. Numerous studies have reported on the promising role of these drugs, specially ATRA, in combating and obtaining better results in patients suffering from this disease. In order to determine whether ATRA (while having a synergistic effect in combination with ATO) actually induces a differentiation, if not partial, of promyelocytes, experiments based on cell counting techniques and morphological analysis where conducted.

The data collected, indeed, demonstrated that treatment for APL administrated with ATRA shows potential benefits that chemotherapeutic drugs, due to its toxicity, do not present: the ability to inhibit the progression of APL without interfering with the parameters of cell survival, providing a new perspective of hopeful alternative clinical strategies

AGRAÏMENTS

Voldria agrair la col·laboració de totes aquelles persones i institucions que han fet possible la realització d'aquest treball.

En primer lloc al grup d'investigació [REDACTED] [REDACTED] per haver-me ofert la possibilitat de realitzar els meus experiments a les seves instal·lacions i per oferir-me nombrosos coneixements, explicacions i recursos els quals no podria haver accedit mai pel meu compte.

En segon lloc, A [REDACTED], al qui ha estat el meu mentor, per instruir-me, per la seva cordialitat, paciència i dedicació i sobretot per obrir-me els ulls en la importància que suposen el món de la ciència i la investigació en el benestar de la humanitat.

Finalment a la [REDACTED], la qui ha estat la meva tutora en el treball de recerca, per la seva implicació i dedicació.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. MOTIVACIÓ	1
1.2. MARC GENÈRIC I SITUACIÓ DEL TREBALL.....	1
1.3. HIPÒTESI.....	1
1.4. OBJECTIUS GENERALS DEL TREBALL.....	2
1.5. FONTS D'INFORMACIÓ I METODOLOGIA	2
2. MARC TEÒRIC	3
2.1. QUÈ ÉS UNA INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA?.....	3
2.2. EL CÀNCER	3
2.2.1. QUÈ ÉS? VISIÓ GENERAL DEL CÀNCER.....	3
2.2.2. DESENVOLUPAMENT I PROGRESSIÓ DEL CÀNCER	5
2.2.3. COM APAREIX? FACTORS DE RISC	6
2.2.4. TIPUS DE CÀNCER SEGONS EL TIPUS DE TEIXIT.....	8
2.3. LEUCÈMIA.....	8
2.3.1. EN QUÈ CONSISTEIX LA LEUCÈMIA?.....	9
2.3.2. L'ORIGEN DE LA LEUCÈMIA	10
2.3.3. SÍMPTOMES.....	11
2.3.4. DIAGNÒSTIC	11
2.3.5. FACTORS DE RISC.....	12
2.4. LEUCÈMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA (APL).....	13
2.4.1. ORIGEN DE L'APL	13
2.4.2. SÍMPTOMES.....	14
2.4.3. DIAGNÒSTIC	15
2.5. TRACTAMENT DE L'APL	16
2.5.1. FUNCIÓ BIOLÒGICA D'ATRA	18
2.5.2. EFECTES SECUNDARIS D'ATRA.....	19
2.5.3. ALTRES TRACTAMENTS.....	20
3.PART PRÀCTICA	21
3.1. OBJECTIUS	21
3.2. MÈTODES GENERALS.....	21
3.2.1. LÍNEA CEL.LULAR DE TREBALL	21
3.2.2. DESCONGELACIÓ DE CÈL.LULES EN SUSPENSÍO	22
3.2.3. RECOMPTE CEL.LULAR I EXÀMEN DE VIABILITAT	24
3.3. DISENY EXPERIMENTAL	25
EXPERIMENT I: ANÀLISI DE VIABILITAT CEL.LULAR I RECOMPE CEL.LULAR ENTRACTAMENT ESTÀNDARD AMB ATRA A DIFERENTS TEMPS	25

EXPERIMENT II: ASSAIG DE DOSI-RESPOSTA EN PRESENCIA DELS TRACTAMENTS COMUNS	27
EXPERIMENT III: ANÀLISI MORFOLÒGICA NUCLEAR DE LA DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR DESPRÉS DE TRACTAMENT AMB ATRA 1 μ M DURANT 5 DIES.....	29
3.4. RESULTATS EXPERIMENTALS I DISCUSSIÓ.....	35
3.4.1. REDUCCIÓ INSUFICIENT DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR DESCONTROLADA EN TRACTAMENT ESTÀNDARD AMB ATRA.....	35
3.4.2. DETERMINACIÓ DE LA CORBA DE DOSI-RESPOSTA EN PRESENCIA D'ATRA	38
3.4.3. DETERMINACIÓ DE LA CORBA DE DOSI-RESPOSTA EN PRESENCIA DE CISPLATÍ.....	40
3.4.4. EL TRACTAMENT AMB ATRA INDUEIX LA DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR.....	41
4.CONCLUSIONS	45
5.WEBGRAFIA I REFERÈNCIES	46
6.ANEX 1: DIARI DE LABORATORI I BIBLIOTECA DE FOTOS	48
7.ANEX 2: GLOSSARI	72
8.ANEX 3: ENTREVISTA AL GRUP D'INVESTIGACIÓ D'ENGINYERIA DE PROTEÏNES I ENZIMOLOGIA	76

1. INTRODUCCIÓ

1.1. MOTIVACIÓ

Des de ben petita, m'he sentit molt atreta pel món de la investigació biomèdica, especialment per aquelles disciplines de la salut que treballen per tal d'afavorir el coneixement sobre l'ésser humà i el seu desenvolupament, i així donar respostes i solucions a tots els problemes de salut que ens afecten avui dia.

Per tant, la motivació personal que m'ha portat a dur a terme aquest treball ha estat la imminent curiositat que sentia cada cop que algú parlava sobre els últims avenços en medicina i farmacologia, i el desig de poder conèixer-los de primera mà.

He focalitzat la recerca en el tractament contra el càncer, ja que és una malaltia molt recurrent que afecta milers de persones en tot el món. La investigació del càncer ha promès esperances i ha generat decepcions. Malgrat els últims avenços en medicina, els tractaments per a la majoria de tipus de càncer continuen sent massa dolorosos, massa perjudicials, massa cars i massa poc efectius. El càncer es presenta com a la malaltia del present i del futur, que va persistint en el temps. Només la investigació de nous i millors tractaments serà capaç de dilatar el temps que passa entre una mort i la següent.

1.2. MARC GENÈRIC I SITUACIÓ DEL TREBALL

El treball consisteix en una investigació biomèdica, de tipus comparativa, sobre l'efectivitat dels tractaments no quimioterapèutics per a la leucèmia promielocítica aguda, en específic, d'ATRA. Vaig escollir aquest tipus de càncer d'entre tots els altres després de llegir un article que parlava sobre l'efectivitat dels agents de diferenciació com a medicament alternatiu a l'hora de combatre la leucèmia promielocítica aguda. La imminent curiositat que em va despertar el fet de poder combatre un càncer sense la necessitat de fer ús de tractaments agressius basats en quimioteràpia em va conduir a focalitzar el meu treball en l'anàlisi del funcionament d'ATRA.

Així doncs, l'objectiu i fil que conduirà tota la recerca és fer un seguiment del tractament un cop s'ha administrat a les cèl·lules canceroses per tal de comprovar la seva efectivitat i veure quin és el seu mètode d'acció.

1.3. HIPÒTESI

Els agents de diferenciació no són tant efectius com els medicaments quimioterapèutics.

Els agents de diferenciació no són capaços de curar la leucèmia promielocítica aguda per si sols. Els agents de diferenciació no indueixen mort cel·lular.

1.4. OBJECTIUS GENERALS DEL TREBALL

Els objectius de la recerca són els següents:

1. Conèixer de primera mà com es produeix una recerca biomèdica.
2. Aprendre a treballar amb la total precisió que requereix el treball al laboratori.
3. Profunditzar en els meus coneixements sobre la leucèmia tractada i sobre el càncer en general.
4. Determinar l'eficàcia que presenten els agents de diferenciació a la cura contra el càncer.
5. Comprovar que el grau d'efectivitat d'un medicament ve determinat per diversos factors.
6. Conèixer la raó per la qual ATRA no s'administra sol.
7. Gaudir del procés i de l'aprenentatge tant acadèmic com personal que em proporcionarà poder completar el meu treball.

1.5. FONTS D'INFORMACIÓ I METODOLOGIA

En primer lloc, abans de començar la meua estada al laboratori i procedir amb la realització dels experiments, vaig haver de documentar-me sobre la leucèmia promielocítica aguda, ja que era un tipus de càncer el qual no em sentia gens familiaritzada. Per tal de fer això, he hagut de prescindir de qualsevol mena de font d'informació primària i decantar-me per fonts secundàries, totes aquelles que vaig haver de sintetitzar i aprendre a interpretar. Vaig consultar nombrosos articles d'internet, que tot i ser força complexos i específics, van acabar resultant ser informatius.

Tot seguit, realitzada la prèvia documentació, vaig poder començar la part pràctica del meu treball mitjançant fonts d'informació empíriques tals com l'experimentació i l'observació. El disseny dels experiments, a diferència de la seva realització, no em va resultar gaire difícil, ja que la gran majoria d'ells es basen en tècniques de laboratori comunes i molt emprades en l'àmbit global, com vindria ser el cas del cultiu cel·lular, l'anàlisi morfològic cel·lular o la corba dosi-resposta.

Principalment, vaig poder comprovar la meua hipòtesi i totes les preguntes, dubtes i qüestions que em van anar sorgint a mesura que avançava amb el treball gràcies a la resposta afirmativa per part del laboratori de la Universitat Autònoma de Barcelona davant la meua proposta d'experimentar amb cèl·lules mare l'efectivitat i el comportament d'aquests medicaments alternatius.

Mentre anava completant la meua part pràctica i els experiments s'anaven realitzant amb més o menys èxit, també vaig decidir fer una entrevista a l'equip d'investigació del laboratori de proteïnes de l'UAB per tal de conèixer una mica més sobre el seu ofici.

2. MARC TEÒRIC

2.1. QUÈ ÉS UNA INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA?

Ja que el meu treball es pot definir com a investigació biomèdica, aquest és un concepte bàsic que s'ha d'esmentar i tractar prèviament a tots els altres conceptes que s'aniran presentant al llarg del treball.

Com a concepte general, la investigació biomèdica és una ciència que engloba tots els estudis mèdics i de comportament relacionats amb la salut humana. Aquesta està dissenyada amb l'objectiu de profunditzar en el coneixement dels mecanismes moleculars, bioquímics, cel·lulars, genètics, fisiopatològics¹ i epidemiològics² de malalties i problemes de salut. Segons el Pla Nacional d'Investigació Científica, Desenvolupament i Innovació Tecnològica (2004-2007), la investigació biomèdica és un instrument clau per incrementar el benestar social i millorar la qualitat i expectativa de vida dels ciutadans.

Podríem dir que és una ciència que engloba moltes altres ciències, és a dir, presenta un treball conjunt per part de la medicina, la biologia, la bioquímica, la biologia molecular i la genètica per tal de donar respostes i solucions a tots els problemes de salut que ens envolten.

El concepte d'investigació biomèdica és molt recent i una mica ambigu i engloba diverses maneres de fer investigació que se subdivideixen en:

- **La investigació bàsica o preclínica:** Aquesta persegueix aconseguir un millor coneixement dels mecanismes moleculars, bioquímics i cel·lular implicats en l'etiopatogènia³ de les malalties i la determinació de la importància de l'epigenètica⁴.
- **La investigació clínica:** Aquesta es troba més focalitzada en els pacients, estudiant la prevenció, el diagnòstic i el tractament de les malalties. Es focalitza en els assaigs clínics, que són els encarregats de determinar els efectes clínics, farmacològics i farmacocinètics⁵ dels medicaments per tal de determinar la seva seguretat i eficàcia.
- **La investigació epidemiològica en salut pública o en serveis de salut:** Tenint per objecte la població, estudia la freqüència, la distribució i els determinants de les necessitats de salut de la població, els seus factors de risc i l'impacte d'aquests en la salut pública.

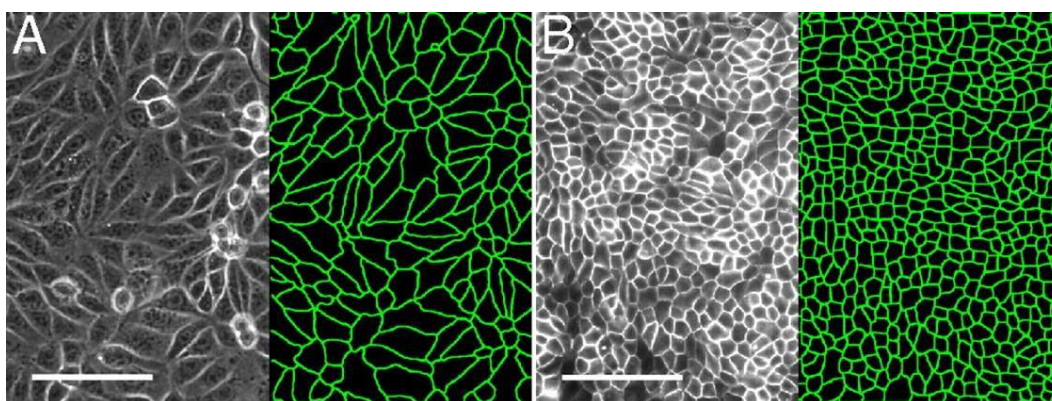
Així doncs, la investigació biomèdica és una eina necessària per a l'èxit de qualsevol estratègia que tingui com a objectiu millorar la salut dels ciutadans.

2.2. EL CÀNCER

2.2.1. QUÈ ÉS? VISIÓ GENERAL DEL CÀNCER

La paraula càncer és el nom que es dona a un conjunt de malalties relacionades, un terme molt ampli que comprèn més de 200 tipus de malalties(1). Tot i que cadascuna d'aquestes malalties pot ser considerada independent, ja que poden tenir unes característiques completament diferents a les de

la resta de càncers, totes elles presenten un denominador comú: la presència de cèl·lules canceroses. Aquest tipus de cèl·lules corresponen a unes cèl·lules anormals que presenten una gran capacitat d'invasió i metastasi, independència de senyals de creixement, inestabilitat a tota mena d'estímuls que inhibeixen el creixement i un potencial de replicació il·limitat(2). En altres paraules, són cèl·lules que creixen descontroladament de manera que acaben sobrepasant el nombre de cèl·lules normals, dificultant així el funcionament correcte del cos. A més a més, es corresponen a cèl·lules les quals no presenten cap mena de funció fisiològica i la seva descontrolada i anormal divisió dona lloc a la disseminació de tots els teixits que es troben al seu voltant(2).



Il·lustració 1: La inhibició per contacte és un dels senyals de creixement de les quals les cèl·lules canceroses es desenten. Es correspon a un mecanisme regulador en el qual les cèl·lules (monocapa) en cultiu deixen de reproduir-se un cop estableixen contacte entre si. Podem veure com les cèl·lules de la fotografia B han proliferat molt més que les cèl·lules de la fotografia A. Això és a causa de l'alta capacitat de reproducció i el potencial de replicació il·limitat que presenten les cèl·lules canceroses (B). Font: Alberto Puliàfito, Lars Hufnagel, Pierre Neveu, Sebastian Streichan, Alex Sigal, D. Kuchnir Fyngenson, and Boris I. Shraiman.

Quan parlem de tumors, que no és el mateix que càncer, ens referim a les masses anormals de teixit corporal on es troben localitzades aquestes cèl·lules canceroses(3).

Principalment, els tumors poden ser de dues classes: cancerosos o no cancerosos.

Els tumors cancerosos o malignes, són aquells els quals les seves cèl·lules presenten la capacitat d'estendre's sobre teixits propers fins a envair-los (infiltració). A més a més, poden tenir la capacitat de traslladar-se i moure's a diferents regions del cos per mitjà del sistema circulatori o limfàtic formant nous tumors lluny del tumor inicial. Aquesta característica l'anomenem metastasi. Només es tracta de càncer si parlem d'aquest tipus de tumor.

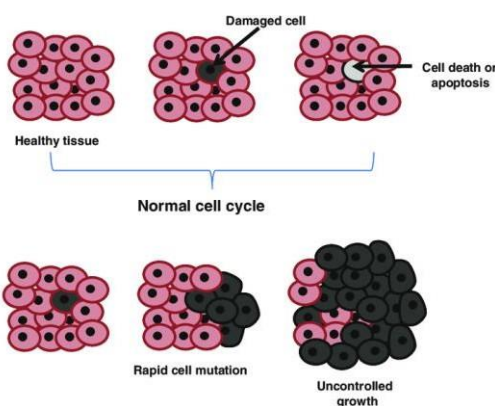
En canvi, quan parlem de tumors no cancerosos o benignes ens referim a tots aquells tipus de neoplàsies⁶ que no són càncer. Aquests només creixen en una única part del cos degut al fet que no presenten capacitats invasores. Generalment, no implica una gran amenaça per a la salut de l'afectat, ja que s'acostuma a recórrer a la cirurgia per tald'extreure'ls. No obstant, alguns tot i manca de propietats invasores, poden arribar a ocasionar greus problemes si per exemple el tumor produeix un efecte de massa al pressionar qualsevol òrgan. Tanmateix, alguns tenen la capacitat de fer-se

malignes, un exemple, el teratoma⁷(3).

2.2.2. DESENVOLUPAMENT I PROGRESSIÓ DEL CÀNCER

Abans d'entendre com es desenvolupa el càncer, s'ha de tenir una breu idea del procés de **renovació cel·lular** que pateix el nostre organisme constantment. S'estima que cada 7-10 anys, l'organisme pateix una renovació total de les seves cèl·lules (amb excepció d'algun teixit concret).

Representa que aquest està format per un conjunt de cèl·lules específiques que van creixent i dividint-se de manera controlada i periòdica. Aquestes, un cop es troben envellides, moren de manera programada, ja que no tenen cap utilitat en el manteniment correcte del nostre cos (procés de senescència).



Il·lustració 2: Mort de la cèl·lula mutada per apoptosi (procés 1) en el cicle cel·lular normal. Proliferació descontrolada de la cèl·lula mutada que acabarà generant càncer (procés 2). L'apoptosi⁸ es diferencia de la senescència perquè aquesta última s'encarrega de la mort programada de cèl·lules envellides, que no tenen per què haver patit una mutació. Font: Nanoparticles in Lung Cancer Therapy - Recent Trends.

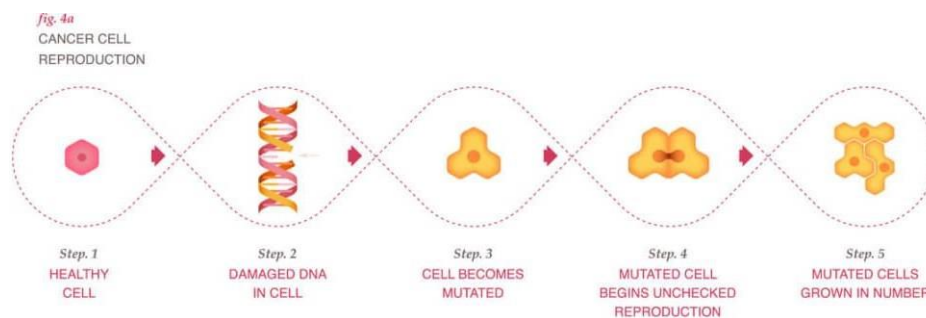
L'èxit d'aquest procés és degut a un comportament normal de la cèl·lula, que es troba controlada per l'acció del material genètic. Representa que el material genètic comprèn cadenes d'unitats d'àcid desoxiribonucleic (ADN) que es troben disposades en un ordre particular i comprimides en estructures condensades anomenades cromosomes, dins del nucli de la cèl·lula. L'ordre en el qual es troben disposades les diferents unitats de l'ADN, així com la seva estructura tridimensional, dicta quina proteïna i la quantitat d'aquesta ha de produir cada cèl·lula.

L'efecte que provoca una mutació tumoral generalment s'associa amb l'alteració de proteïnes específiques del control de la reproducció i senescència de les cèl·lules.

En referència a això, cal esmentar que el càncer de cada persona és una combinació única de mutacions, que a mesura que avança, es van acumulant atorgant-li una enorme variabilitat que dificulta l'existència de medicaments eficaços específics.

Tanmateix, no totes les mutacions adquirides per una única cèl·lula han de conduir a càncer, és la identitat de la mutació i l'ordre i velocitat amb què la cèl·lula l'adquireix qui determina si es desenvoluparà un càncer i el temps que trigarà a fer-ho(4). Aquesta naturalesa progressiva que

presenta el càncer ens proporciona la capacitat de poder detectar-lo precoçment i d'alguna manera intentar prevenir-lo.



Il·lustració 3: Progressió del càncer. Cèl·lula sana muta fins a convertir-se en una cèl·lula tumoral a causa de danys en l'ADN. Aquesta cèl·lula tumoral es reproduirà i proliferarà descontroladament fins a superar el nombre de cèl·lules sanes. Font: National Breast Cancer Foundation.

El càncer s'inicia quan una cèl·lula sana es transforma en cèl·lula tumoral a causa d'una mutació específica. Malgrat que la mutació produïda durant la iniciació del tumor és irreversible, normalment és insuficient per a desenvolupar càncer, no obstant si les cèl·lules iniciades tornen a patir més mutacions procedents d'agents carcinògens (gens iniciadors de tumor), les probabilitats de producció (i establiment) de noves mutacions i de creixement dins del teixit de procedència augmenten. Aquestes mutacions transformen la cèl·lula mutada en una cèl·lula cancerosa. La cèl·lula cancerosa o tumoral produïda, que presenta una morfologia alterada, es caracteritza per la seva gran capacitat de divisió i la incapacitat d'apoptosi (mort cel·lular programada). Són aquestes propietats les que fan que es reproduïxi en una taxa major a la de les cèl·lules normals de manera que es genera una descendència que conserva aquesta mutació inicial. El creixement anormal d'aquestes cèl·lules i la infiltració en teixits adjacents és el que es coneix com a tumor localitzat(4).

Finalment, apareixen altres mutacions que permeten a les cèl·lules tumorals desenganxar-se del tumor del qual procedeixen i traslladar-se i proliferar en altres parts de l'organisme (procés conegut com a metàstasi).

2.2.3. COM APAREIX? FACTORS DE RISC

Atès que el desenvolupament del càncer i la seva malignitat és un procés molt complex, hi ha un gran nombre de factors de risc involucrats en la seva aparició i seria massa simplista parlar d'una causa en concret.

Encara que del 5-10% de les esmentades mutacions que causen càncer poden ser heretades, la majoria d'elles són adquirides al llarg de la vida de l'individu a causa d'errors derivats de la multiplicació cel·lular o a causa d'exposicions ambientals, factors d'un estil de vida poc saludable o determinades condicions de salut.

Dit això, anomenem carcinògens a tots aquells agents físics, químics o biològics que fan malbé l'ADN de manera que poden produir una neoplàsia o càncer.

Segons indiquen les recents estadístiques, el 40% dels càncers són deguts a l'acció d'agents externs, que pel fet de ser externs, són modificables, ja que es troben fortament vinculats als hàbits i estils de vida. Aquests inclouen:

- Consum de tabac.
- Tabaquisme passiu.
- Altes dosis d'alcohol.
- Sobrepès, sedentarisme o una dieta baixa en nutrients.
- L'exposició perllongada a raig UV (llum solar).

No obstant això, el 60% de càncers restants no es troben directament vinculats a l'estil de vida. Encara que sigui possible evitar grans exposicions a carcinògens com el fum del tabac o els raigs UV, és pràcticament impossible evitar totes les altres exposicions ambientals que es troben tant en l'aire que respirem com en l'aigua que bevem o els aliments que ingerim(5).

Tanmateix, actualment, el risc no evitable més significatiu és l'edat; segons l'*American Cancer Society*, el 87% de càncers als Estats Units són diagnosticats a majors de cinquanta anys(6). Quan parlem de carcinògens químics (relacionats amb l'activitat industrial) i la radiació, ens referim a tots aquells que actuen danyant l'ADN de manera que indueixen mutacions. Aquestes coneixen també com a agents iniciadors. Dins d'aquests s'inclouen agents com el fum del tabac, l'arsènic de l'aigua potable, el benzè derivat de la fabricació de pintura, mobles o caçat, l'amiant, el cadmi, el mercuri, el plom, hidrocarburs clorats i la naftilamina.

Pel que fa a els agents físics, destaquen:

- Les radiacions ionitzants (raigs X, raigs gamma, partícules alfa, partícules beta i els neutrons).
- Les radiacions no ionitzants (raigs UV). S'estima que produeixen cada any uns 132.000 casos mundials de melanoma maligne (càncer de pell).
- Les radiacions emeses per l'escorça terrestre (radó).
- Qualsevol tipus d'accident nuclear.

Finalment també cal prestar atenció i destacar l'actuació dels **gèrmens infecciosos**, el 18% de càncers es troben vinculats a infeccions provocades per virus, bacteris o paràsits que interrompen els senyals que controlen el creixement normal i proliferació de les cèl·lules o que causen una inflamació crònica que pot acabar conduint a la formació d'un càncer. Hi destaquen:

- El virus del papil·loma humà (VPH).
- El virus de l'hepatitis B i C (VHB i VHC).

- El virus de la immunodeficiència humana (VIH)
- El virus de leucèmia/limfoma de cèl·lules T humanes tipus 1 (HTLV-1).

2.2.4. TIPUS DE CÀNCER SEGONS EL TIPUS DE TEIXIT

Atès la gran varietat de càncers que hi ha, aquests es poden classificar segons el seu diagnòstic (maligne o benigne), la seva localització o lloc d'origen (càncer de pulmó, càncer de pròstata, càncer oral...), el pendent⁹ del seu escenari o segons el seu tipus de teixit. La seva classificació i nomenclatura segons el tipus de teixit, es basa en l'ICD-O-3¹⁰. Aquests els podem trobar en sis categories principals(7):

- **Carcinoma:** Conegut com a malignitat del teixit epitelial i com el tipus de càncer més freqüent, és la denominació genèrica de tots aquells tumors originats en la pell o en les cèl·lules superficials d'òrgans interns com els pulmons o les mamelles.
- **Sarcoma:** Grup de càncers localitzats en les cèl·lules del teixit conjuntiu com les dels ossos (sarcoma d'esquelet) o les dels músculs, cartílag i greix (sarcoma tou). Encara que presentin una gran varietat de manifestacions (més de 150) només constitueixen un 1% del total de casos de càncer mundials.
- **Leucèmia:** Càncers que ataquen a la medul·la provocant una producció descontrolada de cèl·lules sanguínies immadures.
- **Mieloma:** o mieloma múltiple, és un tumor cancerós que origina de les cèl·lules plasmàtiques del llinatge mioide procedents de la medul·la òssia (limfòcits B), les quals s'encarreguen de la producció d'anticossos vers infeccions. La diferència entre la leucèmia i el mieloma és que la leucèmia es tracta d'un càncer de leucòcits (cèl·lules sanguínies) i el mieloma és un càncer d'un tipus concret de limfòcits (que alhora, són un tipus de leucòcit).
- **Limfoma:** Càncer del sistema immunitari que es manifesta quan els limfòcits malalts (procedents del llinatge limfoide) es presenten com a la cèl·lula cancerosa i s'acumulen exageradament tant als òrgans limfàtics¹¹ com qualsevol altre òrgan del cos. Es diferencia de la leucèmia pel fet que és un càncer sòlid.
- **Càncer de tipus barrejat:** Bàsicament són tumors cancerosos que presenten dos o més components cancerígens. Són poc comuns, un exemple d'ells seria el carcinosarcoma uterí; barreja de carcinoma i sarcoma originat en l'endometri.

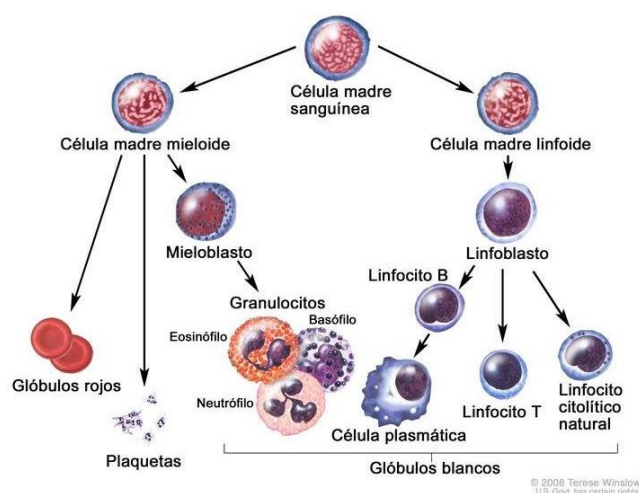
2.3. LEUCÈMIA

Tipus de càncer en el qual es produeixen una gran quantitat de cèl·lules sanguínies immadures de manera anormal. Generalment afecta els glòbuls blancs de la sang, o leucòcits, els quals serveixen normalment a l'organisme per a combatre les infeccions i altres malalties. (American Cancer Society, 2200 Century Pky., Ste 950, Atlanta, GA, 30345).

2.3.1. EN QUÈ CONSISTEIX LA LEUCÈMIA?

La leucèmia és un tipus de càncer que a diferència de la majoria de càncers, no acostuma a presentar tumors sòlids, sinó que en presenta de líquids, atorgant-li la característica d'alta propagació.

Afecta la medul·la òssia, aquella matèria esponjosa i tova situada a la part central dels ossos que s'encarrega de produir glòbuls sanguinis. Aquests són per una banda els glòbuls blancs, o leucòcits, que són els qui protegeixen el nostre organisme a combatre infeccions o altres malalties, i per l'altra banda, els glòbuls vermells, o eritròcits, que transporten l'oxigen provinent dels pulmons a tots els altres teixits del cos. Finalment, les plaquetes o trombòcits són les encarregades que no es produeixin hemorràgies, tot formant coàguls.



Il·lustració 4: Evolució d'una cèl·lula sanguínia (hematopoètica). Medul·la òssia produeix cèl·lules mare sanguínies (immadures) que després de passar per diverses etapes de creixement, acaben convertint-se en glòbuls vermells, glòbuls blancs o plaquetes, totalment funcionals. Autora: Terese Winslow U.S.Govt, 2007.

Pel que fa a un cos sa, aquestes cèl·lules es produeixen de manera controlada i ordenada atenent les necessitats de l'organisme, però quan ens trobem amb una leucèmia (i amb qualsevol altretipus de càncer), tot el procés es descontrola.

La gran majoria de casos presenten una medul·la òssia que produeix un nombre descontrolat de cèl·lules immadures (blasts) causades per alteracions en el seu creixement i diferenciació, que en presentar una morfologia anormal no poden dur a terme les seves funcions habituals. Aquestes cèl·lules immadures, a mesura que es multipliquen i s'acumulen a la medul·la òssia, interfereixen en la producció dels altres tipus de glòbuls sanguinis de manera que es descontrola el cicle cel·lular. Alhora, poden arribar a acumular-se a diferents llocs deslocalitzats tot produint-hi inflor i dolor.

La leucèmia es classifica, principalment, segons la **rapidesa de propagació** i el **tipus de cèl·lula afectada**.

Els principals tipus de leucèmia a saber, segons la rapidesa de propagació:

1. **Leucèmia aguda:** Aquella que, segons indica el seu nom, s'agreuja ràpidament i es

caracteritza tant per la seva ràpida instauració a l'organisme com per l'alt grau d'immaduresa que presenten les seves cèl·lules proliferants.

2. **Leucèmia crònica:** Presenta una evolució gradual. Els blasts anormals són més madurs que els de la leucèmia aguda i per tant, encara poden dur a terme alguna de les seves funcions.

Segons el tipus de cèl·lula:

1. **Leucèmia limfocítica:** Afecta un seguit de glòbuls blancs provinents d'una cèl·lula mare limfoide: els limfòcits, encarregats de controlar la resposta immunitària de l'organisme detectant i destruint qualsevol substància estranya o desconeguda per l'organisme.
2. **Leucèmia mieloide:** Afecta altres tipus de glòbuls blancs de la medul·la òssia que provenen d'una cèl·lula mare mieloide.(8).

ELS CINC TIPUS PRINCIPALS DE LEUCEMIA:

1. Leucèmia limfoblàstica aguda (ALL, acute lymphoblastic leukemia)
2. Leucèmia mieloide aguda (AML, acute myeloid leukemia)
3. Leucèmia limfoide crònica (CLL, chronic lymphocytic leukemia)
4. Leucèmia mieloide crònica (CML, chronic myeloid leukemia)
5. Tricoleucèmia o leucèmia de les cèl·lules piloses

2.3.2. L'ORIGEN DE LA LEUCÈMIA

Tot i els avenços que s'han fet els darrers últims anys, els metges encara no poden precisar quina és la causa (o causes) específica de la majoria de leucèmies. Malgrat això, tot i la incertesa que ens presenten les leucèmies avui dia, es preveu que en un futur la seva investigació es convertirà en una ciència lògica, on totes les complexitats presents a la malaltia arribaran a ser comprensibles. Dit això, en l'actualitat la investigació clínica ha pogut identificar un seguit de factors de risc. Com és d'esperar, diversos estudis determinen que una perllongada exposició a dosis elevades de radiació, tals com les que van experimentar els supervivents de l'accident nuclear a Txernòbil, i els afectats anteriorment per altres càncers que han estat tractats amb radioteràpia, són més propensos a desenvolupar i patir una leucèmia.

També els treballadors exposats a certs agents químics industrials, tals com el benzè, incrementen aquesta freqüència. A més a més, hi ha una forta determinació vers la possibilitat que certs virus també hi intervinguin d'alguna manera en la seva aparició.

Així mateix, diversos estudis sostenen que els gens de l'individu hi tenen bastant a veure; finsal moment ja s'ha demostrat que el 99,5% de pacients amb leucèmia mieloide aguda presenten mutacions almenys en una de cada nou categories de gens(9). En estudiar les cèl·lules dels leucèmics s'ha pogut descobrir que molts d'ells presenten certes anomalies genètiques que semblen seguir un mateix patró, donant lloc a un evident canvi genètic.

2.3.3. SÍMPTOMES

Encara que varien segons el tipus, com a regla general, els leucèmics acostumen a patir de (10):

- Infeccions freqüents i greus.
- Síntomes molt semblants als de la grip, tals com febre, calfreds, fatigues persistents i debilitat.

Aquests símptomes són deguts a l'elevat grau d'immaduresa dels glòbuls blancs produïts per la medul·la òssia, ja que aquests han perdut el seu habitual poder defensiu contra infeccions. A mesura que aquests glòbuls immadurs es multipliquen indefinidament i envaeixen altres regions del cos, tendeixen a acumular-se en els ganglis limfàtics¹² o a òrgans com el fetge i els braços on poden acabar provocant inflor i dolor. A més a més, si aquests glòbuls blancs immadurs arriben a acumular-se en el sistema nerviós central, poden provocar forts mals de cap, vòmits, confusió, pèrdues de control muscular o fins i tot convulsions. Conseqüentment a l'excessiva producció de glòbuls blancs immadurs, també s'altera la mateixa producció de glòbuls vermells i de plaquetes, fet que indueix a diverses hemorràgies i a la formació de blaus que alhora augmenten la probabilitat de patir anèmia. Els sagnats nasals i de genives són també bastant recurrents.

Altres possibles símptomes vinculats amb els anteriors poden ser:

- Pèrdua de pes.
- Inapetència.
- Tendència a presentar un rostre pàl·lid i cansat.
- Aparició de petites taques vermelles a la pell (petèquia).
- Sudoració excessiva (especialment a la nit).
- Forts dolors i sensibilitat d'ossos i articulacions.

2.3.4. DIAGNÒSTIC

Davant la presència dels anteriors símptomes, el metge ha de començar realitzant un historial clínic exhaustiu que ha d'incloure, entre d'altres, la durada dels símptomes, els antecedents mèdics del pacient (propis i familiars), l'exposició a qualsevol factor de risc o el seu estat de salut previ.

Després d'això, el metge procedeix a fer un examen físic complet, incloent-hi la palpitació del fetge, del braç i dels ganglis limfàtics de les aixelles, coll i engonals. Seguidament es realitza una anàlisi de sang al pacient que permetrà veure l'aspecte que tenen els seus glòbuls sanguinis i determinar la proporció de glòbuls madurs vers la d'immadurs.

Un cop les anàlisis determinen la presència de leucèmia, és molt probable que no indiquin de quin tipus es tracta. Llavors serà necessari fer una anàlisi d'aspiració de medul·la òssia, que es fonamenta en la recerca de glòbuls leucèmics i consisteix a introduir una agulla aspiradora dins un os preferiblement gran i extreure una petita mostra de medul·la òssia, que seguidament serà analitzada. Quan ja s'ha determinat el tipus de leucèmia, el metge és probable que també decideixi fer noves

proves a la recerca de glòbuls anormals en altres parts del cos. Així doncs, s'utilitza la punció lumbar on s'extreu el líquid cefalorraquidi dels voltants de la medul·la espinal per veure si també conté glòbuls leucèmics(11).

2.3.5. FACTORS DE RISC

Actualment es desconeixen quins són exactament els factors de risc i les possibles causes de la majoria de leucèmies, no obstant és sabut que hi ha diversos factors que poden afavorir la seva aparició.

Es creu que tot es basa en una indeterminada combinació de factors genètics, immunodeficients i ambientals que augmenten la probabilitat que cèl·lules que conformen la medul·la òssia mutin(10):

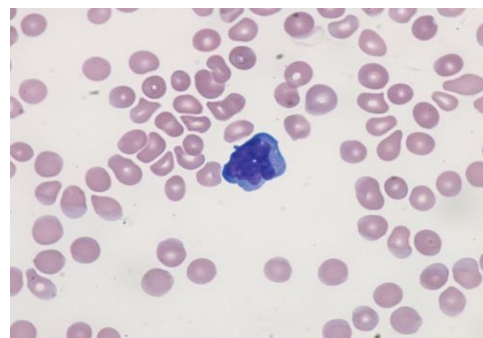
- Predisposició genètica.
- Síndromes congènits (Síndrome de Down, Anèmia de Fanconi, Disceratosis congènita, Síndrome de Shwachman-Diamond, Síndrome de Bloom, Anèmia Diamond-Blackfan, Síndrome de Li-Fraumeni, Síndrome de Kostmann, Atàxia-telangièctasi, Neurofibromatosis).
- Historial familiar.
- Un sistema immunitari debilitat que s'agreuja per l'administració de quimioteràpia i
- Fàrmacs immunosupressors.
- Altes exposicions a radiacions ionitzants.
- Virus limfotrópic de cèl·lules T Humanes (VLTH)
- Virus de la immunodeficiència humana (VIH).
- Exposicions a petroquímics (majoritàriament el benzè).
- Consum de tabac.

2.4. LEUCÈMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA (APL)

L'APL (abreviada segons la OMS com a t:15;17), correspon a un subtipus únic de la leucèmia mieloide aguda que es caracteritza per presentar una anomalia molt específica que provoca la translocació equilibrada dels cromosomes 15 i 17 induint a la formació de la proteïna PML/RAR α . Aquesta genera que la medul·la òssia produeixi un nombre excessiu de promielòcits¹³ que un cop s'acumulen a la medul·la òssia provoquen el desplaçament de les cèl·lules sanguínies sanes per falta d'espai.

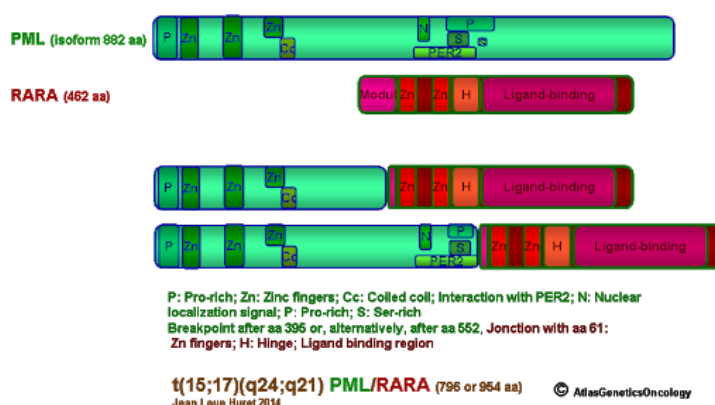
2.4.1. ORIGEN DE L'APL

Caracteritzada per la proliferació de promielòcits morfològicament anormals i una predisposició severa al sangnat, L'APL apareix quan la línia mieloide de glòbuls (glòbuls vermells, glòbuls blancs i plaquetes) presenten una escassetat de glòbuls blancs madurs funcionals i per tant, un excés de glòbuls blancs progenitors immadurs. Aquests glòbuls blancs immadurs corresponen als promielòcits, cèl·lules hematopoètiques pertanyents al llinatge mieloide.



Il·lustració 5: Imatge on es pot diferenciar el gran blast dels leucòcits de l'APL. Font: <https://www.corpath.net/blasts>.

L'APL s'origina a partir d'una mutació cromosòmica als promielòcits. Aquesta mutació es tracta d'una **translocació cromosòmica** que es dona quan un fragment d'un cromosoma es trenca i es fusiona amb un altre cromosoma no homòleg de manera que no es presenta cap pèrdua o guany de material genètic. Aquest procés de reordenació i intercanvi del material genètic implica la fusió del gen PML del cromosoma 15 amb el gen RAR α del cromosoma 17 tot originant una proteïna amb un funcionament anormal coneguda com a PML-RAR α .



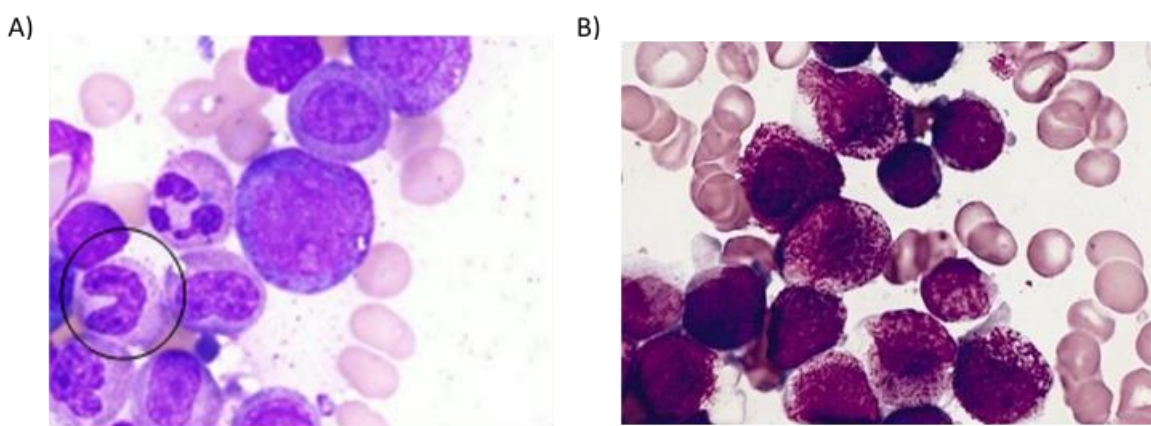
Il·lustració 6: Formació (simplificada) de la proteïna PML-RAR α a partir de la fusió dels gens PML i RAR α un cop trencats i recombinats entre si. Font: ©AtlasGeneticOncology.

Com a resultat del funcionament anormal d'aquest gen, les cèl·lules sanguínies romanen a l'etapa del promielòcit. És a dir, s'atura el seu procés de diferenciació i conseqüentment deixarà de funcionar

correctament(12).

Aquest promielòcit anormal que s'anirà dividint descontroladament i de forma abundant, morfològicament es troba caracteritzat per:

- Es troben de manera abundant i són de mida gran.
- Presenta un citoplasma extens i basòfil, amb grànuls grans i de color lilós o negre que són fàcilment identificables mitjançant la tinció de Giemsa.
- Cromatina¹⁴ immadura considerablement condensada però laxa.
- Nuclis excèntrics i extensos amb un contorn doblegat.
- Aparell de Golgi clarament visible a prop del nucli(13)(14).



Il·lustració 7: Imatge on es poden veure els nuclis excèntrics i doblegats del promielòcit. Autora: Teresa Scordino MD. Data de publicació: 02/07/2016. Il·lustració 8: Imatge on es pot veure l'alta concentració en la granulació primària emprant el tint Giemsa (color lilós que es presenta gairebé com a negre). Font: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiaAPL.html>.

L'excés de promielòcits fa que s'acumulin a la medul·la òssia i per la seva incapacitat de maduració, alteren el nombre normal de glòbuls blancs madurs i alhora de plaquetes i eritròcits. Aquest tipus de leucèmia no s'hereta, l'esmentada translocació es tracta d'una mutació somàtica (no es transmet a la descendència), ja que es produeix després de la concepció de manera que no pot afectar a les cèl·lules germinals, d'aquí que no existeixi cap classe de prova previsible viable.

2.4.2. SÍMPTOMES

Com a totes les leucèmies, la producció excessiva de glòbuls blancs genera una gran sensació de malestar a l'afectat que no pot remetre sense l'ajuda del tractament corresponent.

El símptoma més característic i comú en l'APL és el freqüent sagnat que deriva de la falta de plaquetes, i per tant, la incapacitat de coagulació. El pacient és propens a presentar un seguit de sagnats abundants i molt difícils d'aturar (fins i tot per petits talls) a llocs com les vies urinàries i les vies nasals. A més, també se'n poden produir al cervell o pulmons, que poden acabar sent mortals.

Els altres símptomes inclouen:

- Genives sensibles a blaus i sagnants.
- Pèrdua de gana i de pes.

- Pal·lidesa.
- Presència d'anèmia.
- Blaus i hematomes sense cap motiu aparent.
- Fatiga.
- Febre.
- Mal d'ossos i articulacions.
- Inflamació del fetge i la melsa.
- Mal de cap i confusió.
- Possibilitat de patir greus infeccions durant el diagnòstic i sobretot durant el tractament a causa de la inhibició de la medul·la òssia(15).

2.4.3. DIAGNÒSTIC

A l'hora de generar el diagnòstic d'aquesta malaltia, és fonamental que s'elabori amb molta precisió per tal de poder determinar sense cap equivocació el tractament que més s'adequa a les necessitats del pacient i començar-lo com més aviat millor.

Tanmateix, per tal de determinar la presència d'APL s'ha d'haver diagnosticat prèviament la leucèmia mieloide aguda, això és degut al fet que el diagnòstic definitiu d'aquesta malaltia es fa un cop s'ha identificat la seva anomalia, el gen PML/RAR α . A causa de la dificultat que implica la seva identificació, molts experts recomanen començar amb el tractament tan aviat com se sospiti la seva presència, abans de la confirmació del diagnòstic, per tal que no avanci i es presenti com a incurable. Entre les proves més recurrents s'hi troben:

- Proves de sang i medul·la òssia: La primera prova que el metge realitzarà és un recompte sanguini complet i diferencial, en el qual extraient la sang del braç del malalt i analitzant-la, es podrà obtenir un recompte total de les cèl·lules presents. Un cop s'ha finalitzat el recompte, es farà un examen microscòpic per trobar cèl·lules leucèmiques procedents de la medul·la òssia, mitjançant l'aspiració o la biòpsia de medul·la.
- Un seguit de proves que mostrin el temps que triga a coagular la sang del pacient per tal d'identificar qualsevol presència de coagulopatia i així evitar possibles embòlies pulmonars o vessaments cerebrals.

Un cop fetes les anteriors proves, és necessària la realització d'una anàlisi citogenètica¹⁵ o l'avaluació dels cromosomes¹⁶ per poder confirmar finalment el diagnòstic.

L'anàlisi citogenètica inclou proves com:

- Immunotinció: Mètode de laboratori pel qual mitjançant anticossos es determina la presència d'antígens¹⁷ a les cèl·lules(16).
- Cariotipatge: Prova que examina el nombre, la mida i la forma dels cromosomes per tal de

detectar qualsevol anomalia (els cromosomes humans segueixen un patró establert).

- "Reacció en cadena de la polimerasa"(PCR): Tècnica o prova molecular per la qual realitzant un gran nombre de còpies d'un fragment d'ADN s'aconsegueix trobar canvis en l'estructura i funcionament dels gens del pacient fins a mostrar (quan altres tècniques fallen) la característica distintiva del gen de l'APL.
- Hibridació fluorescent in situ: Prova que mitjançant fluorescència, permet visualitzar els gens continguts en el material genètic d'una seqüència específica d'ADN(17).

2.5. TRACTAMENT DE L'APL

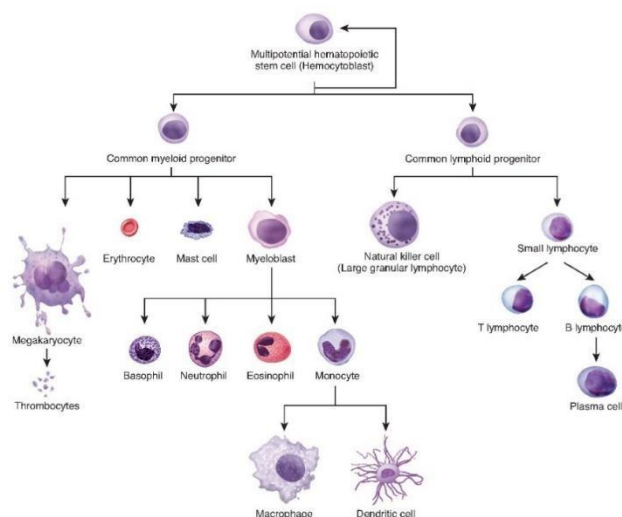
Donat als últims grans avenços en pronòstic i tractament de la leucèmia promielocítica aguda, avui dia és un dels tipus de leucèmia més curables tot i haver estat considerada anys enrere unade les més letals. Malgrat això, és de gran importància que el tractament es comenci a subministrar al pacient tan aviat com es pugui atès l'alta probabilitat que pateixi de problemes de coagulació que poden derivar a sagnats mortals.

Els tractaments de l'APL tenen com a objectius principals:

1. Tornar el recompte de cèl·lules sanguínies a nivells normals.
2. Durant la inducció (primera part del tractament) aconseguir que el nombre de cèl·lules leucèmiques arribi a nivells molt baixos per tal que aquesta entri en remissió i es puguin eliminar per complet.
3. Dirigir-se a la translocació (t15;17), causant de la característica proteïna de fusió PML/RAR α .

Com ja sabem, la leucèmia promielocítica aguda presenta una particularitat que cap de les altres leucèmies mieloides agudes presenten: la proteïna de fusió PML/RAR α . Aquesta genera en elles un canvi genètic específic que les fa sensibles a un seguit de medicaments anomenats agents de diferenciació. Aquests actuen ajudant els blasts a madurar fins a convertir-se en glòbuls blancs totalment funcionals a partir de diferenciació i així impedir la coagulació descontrolada provocada per l'alliberament d'aquesta proteïna procedent dels promielòcits (blasts).

El mètode de funcionament d'aquests medicaments és la diferenciació. La diferenciació cel·lular és el procés pel qual les cèl·lules canvien d'un tipus cel·lular a un altre (especialització) mitjançant un seguit de canvis morfològics i funcionals, sense presentar cap alteració en el material genètic, que forma part del seu procés de maduració i especialització.



Il·lustració 8: Hematopoesi, procés de diferenciació de les cèl·lules. Cèl·lules de l'APL deixen de madurar al promielòcit, subtipus específic del mieloblast. Font: ©RexxSAutors: Michael Häggström and birdy and Michael Häggström.

Dit això, la leucèmia promielocítica aguda, com ja hem esmentat, es caracteritza per un bloqueig de diferenciació que condueix a l'acumulació de cèl·lules immadures les quals presenten unes translocacions cromosòmiques (mutacions) que afecten la funcionalitat, i per tant repressió, dels factors de transcripció que participen en la regulació de l'esmentada diferenciació.

Per tant, l'objectiu de la teràpia de diferenciació és induir a les cèl·lules immadures assolir un fenotip¹⁸ madur mitjançant aquests compostos⁽¹⁸⁾.

L'agent de diferenciació més emprat com a tractament per a l'APL és:

- **L'àcid transretinoic (All-trans Retinoic Acid) o ATRA:** També conegut com a retinoïna (Vesanoid®), és un metabòlit actiu¹⁹ derivat de la vitamina A que presenta la capacitat d'eliminar l'anomalia del PML/RAR α induint així als promielòcits a desenvolupar-se en cèl·lules madures. A més de causar una notable disminució en la concentració de blasts leucèmics en la medul·la, també ajuda a minimitzar els efectes secundaris de la quimioteràpia abans de ser administrada.

Hi ha diverses formes de subministrar ATRA:

- Pacients acabats de diagnosticar o de primera recaiguda (WBCs²⁰<10,000/ μ L): El subministrament d'ATRA per solitari pot generar una remissió d'almenys el 90% dels pacients, però a curt termini. Molts d'ells experimenten la primera recaiguda al cap de pocs mesos.
- Pacients d'alt risc o amb diagnòstic final per determinar (WBCs \geq 10,000/ μ L): Se'ls hi afegeix quimioteràpia a la teràpia ATRA; un dels primers estudis que es van fer confirma que la combinació d'aquestes dues teràpies va curar a més del 70% de pacients. Tanmateix, alguns van seguir experimentant una recaiguda resistent.

- Pacients remitents: Aquests últims van respondre amb freqüència la combinació d'ATRA amb triòxid d'arsènic (As_2O_3) com a tractament quimioterapèutic posterior amb una cura completa.

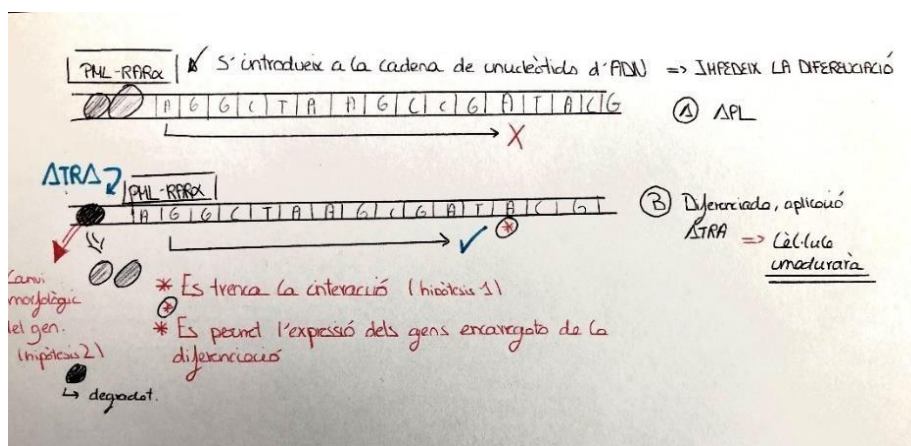
2.5.1. FUNCIÓ BIOLÒGICA D'ATRA

El tractament amb ATRA es caracteritza principalment per la seva capacitat de diferenciació cel·lular que no pas per citotoxicitat²¹ o mort cel·lular. Aquest reinverteix l'efecte inhibidor de PML-RAR α , de manera que indueix a una diferenciació completa dels promielòcits a granulòcits madurs.

La gran pregunta és, com ho fa? Tot i que el mecanisme que presenta l'ATRA per induir a la diferenciació dels promielòcits roman desconegut, actualment hi ha dues teories sobre el seu funcionament:

La primera sosté que l'ATRA evita la interacció de PML-RAR α amb altres proteïnes repressores de la transcripció de l'ADN implicades directament a la diferenciació. És a dir, un cop PML-RAR α interacciona amb les proteïnes repressores, aquestes eviten que la cèl·lula es pugui diferenciar. A l'afegir ATRA, aquesta interacció es trenca i es permet l'expressió dels gens de diferenciació i per tant, la cèl·lula podrà seguir madurant fins a adquirir la seva total funcionalitat.

Per l'altra banda, diversos estudis sostenen la possibilitat que el contacte del medicament amb la proteïna de fusió PML-RAR α genera un canvi morfològic en aquest que permet la seva degradació, i per tant, perd les seves propietats cancerígenes. Possiblement, la realitat del funcionament d'ATRA és la combinació d'ambdues teories.



Esquema 1: Mètode de funcionament d'ATRA. ATRA indueix la diferenciació de dues maneres possibles.

Paral·lelament a la seva capacitat curativa, atès que totes les cèl·lules canceroses presenten un abrutal variabilitat genètica (i això fa que sigui impossible establir un patró d'identificació cel·lular) és bastant comú la presència de cèl·lules resistents al medicament. Una vegada s'ha administrat el tractament, en tractar-se de cèl·lules que han resistit al tractament, tenen avantatge selectiu sobre les altres. Les que són sensibles al medicament es diferencien, però aquestes resistents segueixen proliferant.

(generant cèl·lules filles també resistents i cancerígenes) fins a un punt que l'ATRA ja no presenta cap capacitat curativa en aquest càncer. És per aquest motiu, que el seu subministrament s'ha de combinar amb agents quimioterapèutics; la combinació dels dos medicaments disminueix notablement la possibilitat de topiar-se amb cèl·lules resistents als dos tractaments. A més, diversos estudis sostenen que l'ATRA no aconsegueix erradicar el clon leucèmic, segon motiu pel qual s'opta per la combinació d'ambdós tipus de tractaments(19).

2.5.2. EFECTES SECUNDARIS D'ATRA

Encara que l'ATRA es presenti com a un medicament poc agressiu, aquest també presenta un seguit d'efectes secundaris predictibles en termes de la seva aparició i durada els quals acostumen a ser reversibles i desapareixen un cop finalitzat el tractament. Entre els més recurrents (incidència major del 30%) es troben(20):

- **Toxicitat retinoide**, símptomes derivats de l'administració de dosis elevades de vitamina A: mal de cap, febre, sequedat de la pell, sequedat de les membranes mucoses (boca i nas), dolor d'ossos, nàusees i vòmits, erupcions cutànies, sudoració i alteracions en el sentit de la vista.
- Insuficiència respiratòria (dispnea).
- Síntomes pseudogripals: malestar, esgarriances.
- Problemes d'hemorràgia.
- Infeccions.
- Inflamació als peus o turmells.
- Dolor muscular i articular.
- Molèstia en el pit.
- Augment de pes.

Tanmateix, l'efecte secundari més greu és l'anomenat Síndrome de Diferenciació en l'APL. Es presenta com a una complicació potencialment mortal que pot aparèixer en els pacients pocs dies després de l'inici del tractament. Aquest és degut a una reacció inflamatòria amb el medicament caracteritzada per:

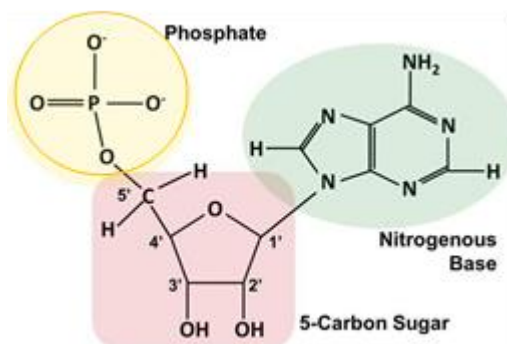
- Hipoxèmia (disminució anormal de la pressió de l'oxigen a la sang).
- Infiltracions pulmonars.
- Embassament pleural (acumulació de líquid addicional a l'espai entre els pulmons i la cavitat toràcica).
- Insuficiència renal.

Així doncs, per tal d'erradicar-lo s'ha d'establir tractament precoç amb esteroides en altes

dosis(9)(21).

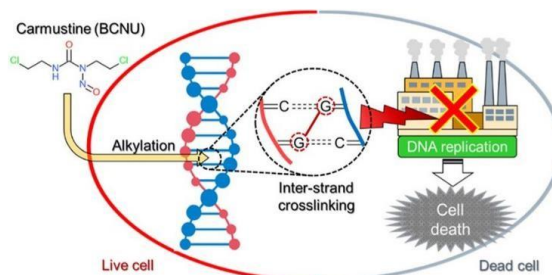
2.5.3. ALTRES TRACTAMENTS

Triòxid d'arsènic (As_2O_3) o ATO: També conegut com a Trisenox[®], és el principal medicament quimioterapèutic(antineoplàstic) que s'empra com a combinació amb ATRA. El seu mecanisme es caracteritza per la seva agressivitat perquè és un àtom tan semblant al fòsfor (present naturalment al nostre organisme, que exerceix un paper essencial en els processos de transferència d'energia, com el metabolisme o l'acció muscular) que un cop és introduït, s'incorpora en el lloc del fòsfor (grup fosfat de l'ADN) de manera que confon l'organisme. És així com altera estructures vitals per a la cèl·lula(ADN, proteïnes, glúcids, etc.) provocant la seva apoptosi.



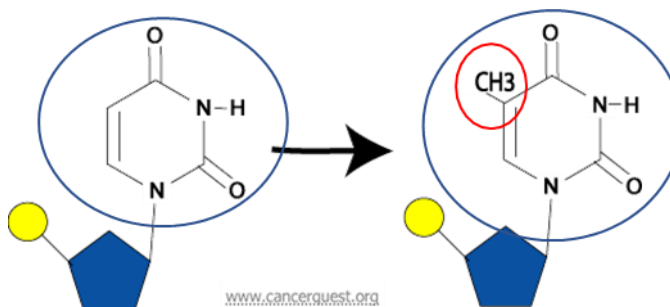
Il·lustració 9: Grup fosfat present a un nucleòtid d'ADN(unitat estructural bàsica dels àcids nucleics). Font: <https://rockedu.rockefeller.edu/wp-content/uploads/2018/07/DNA-monomer.png>.

Agents alquilants: Tipus d'agent quimioterapèutic que danyen l'ADN i provoquen la seva inactivitat de manera que s'indueix a la mort cel·lular. Això ho fan afegint un grup alquil a la guanina (base nitrogenada del nucleòtid d'ADN) de manera que impedeix que les cadenes de la doble hèlix de l'ADN s'uneixin correctament i es generi la seva ruptura(22). El cisplatí n'és un exemple.



Il·lustració 10: Mecanisme d'acció dels agents alquilants. Font: Eric Scholar, in xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, 2007

Antineoplàstics antimetabòlits: Es tracta d'un seguit d'agents quimioterapèutics molt semblants a les substàncies químiques naturals que fisiològicament participen en els processos cel·lulars essencials. Malgrat això, presenten unes propietats químiques suficientment diferents de manera que un cop són administrats amb l'objectiu de substituir dites substàncies naturals, poden ser detectats per l'organisme i es bloquegen els esmentats processos cel·lulars essencials (mitjançant configuracions errònies, desactivant enzims...). Així doncs, la cèl·lula perd la seva capacitat de divisió i s'acaba produint l'apoptosi(23). La citosina arabinosa n'és un exemple.



Il·lustració 11: Mecanisme d'actuació dels antimetabòlits. Substitució de la base nitrogenada del nucleòtid d'ADN. Adhesió del grup metil (CH3). Font: www.cancerquest.org.

3.PART PRÀCTICA

3.1. OBJECTIUS

L'objectiu principal de la meua recerca biomèdica és comprovar l'eficàcia terapèutica dels agents de diferenciació i quimioterapèutics envers la leucèmia promielocítica aguda. Per tal de verificar l'objectiu principal de l'estudi, es van plantejar un seguit d'objectius específics:

- Determinar la dosi efectiva de l'agent de diferenciació ATRA i del quimioterapèutic Cisplatí.
- Comprovar quin dels dos medicaments és més letal per les cèl·lules canceroses.
- Determinar la corba de creixement de les cèl·lules canceroses HL-60 en presència d'ATRA.
- Observar la morfologia cel·lular abans i després del tractament amb l'agent de diferenciació, per confirmar que l'èxit del medicament és degut a la diferenciació i no a la mort cel·lular.

3.2. MÈTODES GENERALS

3.2.1. LÍNEA CEL·LULAR DE TREBALL

En aquest projecte s'utilitzarà la línia cel·lular **HL-60** (ATCC® CCL-240™). Tota la informació que es presentarà a continuació prové de la següent web: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-240.aspx?geo_country=es

Descripció:

Aquesta línia cel·lular correspon a promielòcits extrets de la sang perifèrica d'una dona de 36 anys amb leucèmia promielocítica aguda.

Mètode i medi de cultiu:

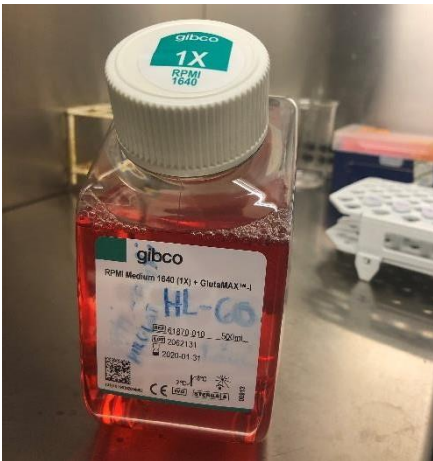
Aquesta línia cel·lular, al ser de cèl·lules sanguínies s'ha cultivat en suspensió. Aquestes cèl·lules han estat cultivades pel mètode de cultiu més comú i utilitzat actualment, el mètode de cultiu primari. Aquest bàsicament, depenent del tipus de cèl·lules, es divideix en dos subtipus: d'adherència o en suspensió. Les cèl·lules provinents de teixits es cultiven per adherència, en canvi les cèl·lules que provenen de fluids (com és el nostre cas) ho fan en suspensió. Aquest últim mètode es diferencia dels altres perquè conté cèl·lules lliures que es troben disperses en un medi de cultiu, i per tant no es troben adherides a cap superfície. El medi de cultiu: "Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640" suplementat amb un 20% (V/V) de sèrum fetal boví (FBS). El medi de cultiu és un líquid que conté totes les vitamines, aminoàcids i sucres necessaris per a la supervivència de les cèl·lules. És necessari afegir-hi sèrum fetal boví per tal que les cèl·lules esreproduïxin atès que aquest conté una gran quantitat de proteïnes, lípids i sucres hidrolitzats possibilitant que les cèl·lules s'alimentin.

Condicions de cultiu:

- Atmosfera: 95% aire + 5% d'hidròxid de carboni.
- Temperatura: 37°C.
- Subcultiu cada dos o tres dies (s'extreuen 5:6 parts del medi amb les cèl·lules contingudes i s'afegeixen aquestes 5:6 parts de medi de cultiu fresc).

Emmagatzematge:

Les cèl·lules han estat emmagatzemen en criovials estèrils mitjans de criopreservació (FBS + 5% Dimetilsulfòxid (DMSO)) a la fase gasosa del nitrogen líquid (Aprox. -200 °C).



Imatge 1: Medi de cultiu: "Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640" suplementat amb un 20% (V/V) de sèrum fetal bovi (FBS).

Comentaris:

-Aquesta línia cel·lular pot ser diferenciada espontàniament utilitzant ATRA entre altres compostos.

-La criopreservació és un procés pel qual cèl·lules o teixits són congelats a temperatures molt baixes per tal de disminuir les seves funcions vitals i que es mantinguin en un estat de vida suspesa durant molt de temps.

-La diferenciació d'aquesta línia cel·lular produeix cèl·lules mieloides madures (basòfils, neutròfils, eosinòfils i monòcits o macròfags (quan els monòcits s'infiltra en el teixit)).

-Jo no vaig poder participar en el procés d'extracció i refredament cel·lular. Aquestes cèl·lules es trobaven congelades des del 1979.

-Actualment, les tècniques de criopreservació s'estan perfeccionant per tal de millorar les taxes de supervivència i viabilitat cel·lular després de la descongelació i reanimació.

3.2.2. DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES EN SUSPENSIÓ

El protocol i passos a seguir són els següents:

1. Extreure el criovial del nitrogen líquid amb molta precaució i seguretat i transportar-lo a la sala de cultius en gel sec (-80 °C).



Imatge 2: Criovial extret del nitrogen líquid.



Imatge 3: Ultracongelador.

2. A una cabina de seguretat biològica, rentar la superfície amb etanol al 70% (pera desinfectar), descarregar el criovial per tal que surtin les restes de nitrogen i tornar a tancar-lo.



Imatge 4: Cabina de seguretat biològica. Produeix un flux d'aire cap a l'exterior que fa que les partícules en suspensió de l'aire caiguin al terra de la cabina, tot així evitant contaminacions causades per bacteris o espores en l'aire.

3. Submergir parcialment el criovial en un bany d'aigua a 37 °C durant un o dos minuts fins que quedi un fil central congelat. És molt important que la descongelació sigui la més ràpida possible ja que el criopreservant DMSO és tòxic per a les cèl·lules en percentatges superiors a l'1% a temperatura ambient. NOTA: Un criopreservant (DMSO) és un compost hidrosoluble que preserva la viabilitat de les cèl·lules o teixits congelats per criopreservació.
4. Tornar a desinfectar amb etanol al 70% la cabina.
5. A cabina, transferir el contingut del criovial a un tub Falcon® de 15 mL i afegir 10 mL de medi de cultiu RPMI. Aquest últim pas redueix el percentatge de DMSO a un nivell tolerable per les cèl·lules.
6. Centrifugar 5 minuts a 1500x g (fent que les cèl·lules caiguin fins al fons del tub), aspirar el medi i re-suspendre en 12 mL de medi de cultiu.
7. Transferir el contingut a un matràs de cultiu cel·lular T75 (Flascó T75) i incubar durant 24 hores en les condicions de cultiu normals.



Imatge 5: Tub Falcon® de 15mL

8. Examinar la viabilitat cel·lular passades les primeres 24 hores (annex 1)



Imatge 6: Centrifugadora amb les mostres de l'experiment 3.



Imatge 7: Incubador. Es troba dins la sala de cultius del laboratori.

3.2.3. RECOMPTE CEL·LULAR I EXÀMEN DE VIABILITAT

En aquest treball, es donaran a terme diversos recomptes cel·lulars.

Per tal de determinar la concentració de cèl·lules vives en suspensió s'ha de seguir el següent protocol.

1. Extraure 10 μ L de cultiu cel·lular i afegir-ho a un tub Eppendorf® de 1.5 mL.
2. Afegir 10 μ L de reactiu Trypan Blue (o blau tripà). Aquest reactiu és un colorant que s'utilitza per tenyir selectivament les cèl·lules mortes. Això és degut pel fet que les cèl·lules vives consten d'una membrana lipídica (membrana plasmàtica) que impedeix l'entrada d'aquest reactiu al seu interior. En canvi, les cèl·lules mortes, al presentar danys en la membrana, si que permeten la seva entrada.
3. Carregar 10 μ L de cultiu a cada un dels dos costats de la càmera de Neubauer. La càmerade Neubauer és un instrument que ens permet realitzar un recompte totalment efectiu de cèl·lules en un microscopi.
4. Finalment, realitzar un recompte exhaustiu del nombre de cèl·lules vives de cada sector de la càmera de Neubauer vistes des del microscopi. Les cèl·lules vives es diferencien de les mortes perquè aquestes últimes, al permetre l'entrada del Trypan Blue dins la seva membrana, presenten un color blavós més aviat negre.
5. Multiplicar el nombre obtingut x20000, per tal d'obtenir el nombre de cèl·lules vives per cada 1mL de cultiu.



Imatge 8: Tub Eppendorf amb el reactiu de viabilitat Trypan Blue. Consisteix en un tub de microcentrifuga.



Imatge 9: Càmera de Neubauer



Imatge 10: Càmera de Neubauer carregada amb el reactiu de viabilitat

També es pot calcular el percentatge de viabilitat amb la següent fórmula:

$$\text{Percentatge de viabilitat} = (\text{cèl·lules viables o vives} / \text{n}^\circ \text{cèl·lules totals}) \times 100$$

3.3. DISENY EXPERIMENTAL

EXPERIMENT I: ANÀLISI DE VIABILITAT CEL·LULAR I RECOMPE CEL·LULAR ENTRACTAMENT ESTÀNDARD AMB ATRA A DIFERENTS TEMPS

Descripció general i objectius:

En aquest primer experiment, a partir d'un recompte cel·lular exhaustiu durant set dies, s'analitzarà la corba de creixement cel·lular juntament amb el percentatge de viabilitat cel·lular de les cèl·lules HL-60 cultivades en presència i absència del tractament estàndard amb ATRA.

El comportament normal de les cèl·lules en cultiu presenta 3 etapes:

- Fase de latència: Correspon a la fase en la qual les cèl·lules no es reproduïxen, un cop acaben de ser adherides al medi de cultiu.
- Fase exponencial: Cèl·lules que es divideïxen, proliferen i s'expandeïxen.
- Fase estacionària: Les cèl·lules deixen de reproduir-se per falta d'aliment o inhibició de contacte.

Aquest experiment es troba dissenyat per tal d'evitar les fases de latència i estacionària. Per aconseguir-ho, es parteix d'unes cèl·lules que ja estaven en creixement exponencial (evitant fase de latència) i es va anar augmentant periòdicament el volum de medi de cultiu en el qual es trobaven inicialment i així evitar que les cèl·lules es topessin amb la mencionada falta d'aliment (evitant la fase estacionària).

Materials:

- Pipetes serològiques.
- Tubs Eppendorf (tub de microcentrifuga).
- Tubs Falcon.

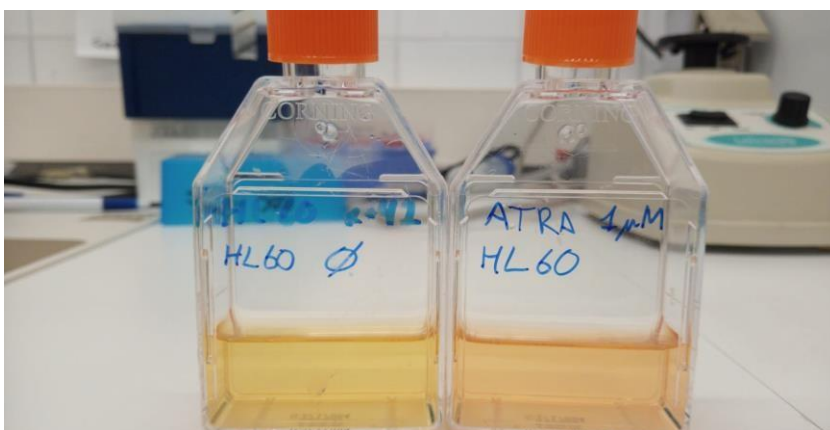
- Matràs de cultiu T25 (un per a cada medi de cultiu).
- Càmera de Neubauer.
- Microscopi electrònic.

Compostos:

- All trans retinoic acid (ATRA).
- Cisplatí (substitució del triòxid d'arsènic o ATO) ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$).
- Medi de cultiu RPMI.
- Trypan Blue.

Concentracions:

- All trans retinoic acid (ATRA) a $1\mu\text{M}$.



Imatge 11: Mostres amb presència i absència d'ATRA passades les primeres 24h. L'acidificació del medi és un determinant del creixement cel·lular. El color groguenc del cultiu sense ATRA indica un pH més àcid, i per tant, un creixement cel·lular major.

Protocol:

1. Per tal d'igualar les condicions d'ambdós tractaments, es preparen dos matrassos de cultiu T25 amb la mateixa concentració de cèl·lules inicials: 500000 cèl·lules/mL.

*La placa de cultiu en presència de tractament es basa en una solució de medi de cultiu (RPMI) + ATRA, mentre que la placa amb absència de tractament només presenta medi de cultiu(RPMI).

2. S'extrau una mostra de $10\ \mu\text{L}$ del cultiu a les 24, 48, 120 i 168 primeres hores i es fa un recompte de cèl·lules vives i mortes mitjançant la Càmera de Neubauer vista a través del microscopi per tal de poder veure com progressa el percentatge de viabilitat cel·lulara mesura que passen les hores.
3. Seguidament de la realització del recompte cel·lular i l'anàlisi de dades obtingudes, es fa un gràfic per comprovar la velocitat de creixement cel·lular d'HL-60 tractades amb ATRA i sense ATRA. S'extreu el temps de duplicació mitjançant càlculs matemàtics.

Equacions emprades per la determinació del temps de duplicació:

A la fase de creixement exponencial, les cèl·lules segueixen una equació concreta:

$$N^{\circ} \text{cèl} \cdot \text{lules} = N^{\circ} \text{cèl} \cdot \text{lules inicial} \times e^{\mu * \text{temps}}$$

*On μ : Constant de la qual es pot extreure el temps de duplicació.

La velocitat de reproducció es determina amb el càlcul de la taxa de duplicació (mitjana de temps que triga una cèl·lula a dividir-se). Es té:

$$x(t) = x_0 * e^{\mu * t}$$

On: x_0 = Número de cèl·lules inicials.

Si avaluem la següent condició (duplicació):

$$x(t) = 2 * x_0$$

$$2 * x_0 = x_0 * e^{\mu * t}$$

$$\ln 2 = \ln(e^{\mu * t})$$

$$\ln 2 = \mu * t * \ln e$$

Obtenim la taxa de duplicació:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\mu}$$

EXPERIMENT II: ASSAIG DE DOSI-RESPOSTA EN PRESENCIA DELS TRACTAMENTS COMUNS PER A L'APL: ATRA I Cis-Pt

Descripció general i objectius:

En aquest segon experiment es farà una corba de dosi-resposta amb els diferents compostos per tal de veure i comparar l'efectivitat de cadascun d'ells i a quines concentracions són més efectius.

Materials:

- Placa de 96 pouets.
- Càmera de Neubauer.
- Micropipetes.
- Pipetes serològiques.
- Tubs Eppendorf.
- Tubs Falcon.
- Reactiu de viabilitat Trypan Blue.
- Lector espectrofotòmetre multiplaca Victor3.

Compostos:

- All trans retinoic acid (ATRA).
- Cisplatí (Cis-Pt) ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$).
- PrestoBlue, indicador de creixement cel·lular.

- Medi de cultiu RPMI.
- Trypan Blue.

Concentracions de tractament (consultar ANNEX 1 per càlculs):

- ATRA: De 0.01 μ M fins a 100 μ M.

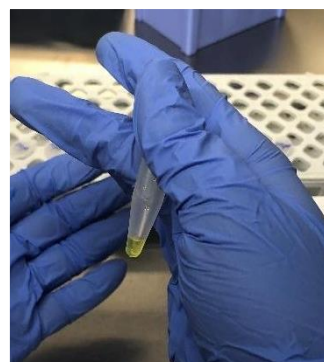
(0.01 μ M-0.05 μ M-0.1 μ M-0.5 μ M-1 μ M-5 μ M-10 μ M-50 μ M-100 μ M)

*Pel que hem vist a diversos articles, la quantitat estàndard emprada és d'1 μ M.

- Cisplatí: 0.1 μ M fins a 1000 μ M

(0.1 μ M-0.5 μ M-1 μ M-5 μ M-10 μ M-0.05mM-0.1mM-0.5mM-1mM)

*Segons antics resultats, la concentració efectiva està al voltant de 50 μ M.



Imatge 12: ATRA

Protocol:

1. Subcultivar²⁴HL-60 i recollir les cèl·lules sobrants (les 5:6 parts que tirem a cada subcultiu).
2. Realitzar el recompte cel·lular i ajustar la concentració cel·lular a 100 000cèl·lules/mL amb el medi de creixement RPMI.
3. Sembrar 10 000 cèl·lules (100 μ L) en els 60 pouets interiors de la placa.
4. Afegir 200 μ L de RPMI als 36 pouets exteriors (en els pouets exteriors, el líquid té tendència a evaporar-se (canviant les concentracions i alterant els resultats), per això els utilitzarem a l'hora d'abocar el medi).
5. Preparar banc de dilucions²⁵ d'ATRA a una concentració 2X (per exemple, el que ha d'estar a 1 μ M es prepara a 2 μ M). Seguidament, preparar banc de dilucions de Cisplatí.
6. Afegir 100 μ L de cada compost per triplicat en pouets consecutius.
7. Incubar a 37°C durant 48h.
8. Afegir 10 μ L del reactiu de viabilitat cel·lular PrestoBlue (reactiu que conté un agent que canvia de color únicament quan una cèl·lula viva el metabolitza). El manifest de més producte d'aquest reactiu es sinònim de major nombre de cèl·lules vives.
9. Esperar fins que es produeixi un canvi de color visible a rosaci.
10. Analitzar la mostra amb un espectrofotòmetre.
11. Finalment, elaborar l'anàlisi de dades per determinar la dosi letal 50 (LD50), que correspon a la dosi que el creixement cel·lular disminueix en un 50%.

Esquema de la placa de 96 pouets (2 plaques, 1 per a 24h i 1 per a 72h):

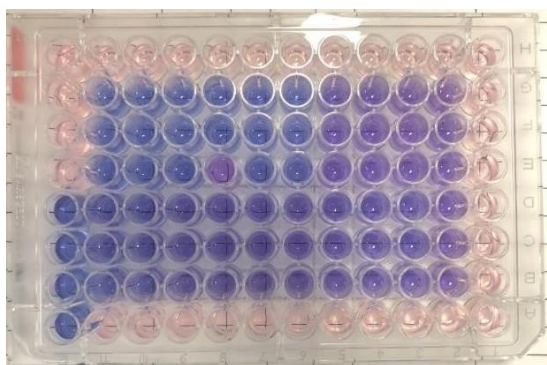
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
M	0	0.01 A	0.05 A	0.1 A	0.5 A	1 A	5 A	10 A	50 A	100 A	M
M	0	0.01 A	0.05 A	0.1 A	0.5 A	1 A	5 A	10 A	50 A	100 A	M
M	0	0.01 A	0.05 A	0.1 A	0.5 A	1 A	5 A	10 A	50 A	100 A	M
M	0	0.01 Q	0.05 Q	0.1 Q	0.5 Q	1 Q	5 Q	10 Q	50 Q	100 Q	M
M	0	0.01 Q	0.05 Q	0.1 Q	0.5 Q	1 Q	5 Q	10 Q	50 Q	100 Q	M
M	0	0.01 Q	0.05 Q	0.1 Q	0.5 Q	1 Q	5 Q	10 Q	50 Q	100 Q	M
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

M: Medi de cultiu.

0: Cèl·lules sense compost afegit (control de 100% de viabilitat). X número: Concentració del compost en μM .

A: ATRA.

Q: Cisplatí.



Imatge 13: Placa de 96 pouets on es poden visualitzar els canvis de color passades les primeres 24h. Els colors més rosacs simbolitzen major degradació del compost Presto Blue i per tant, major viabilitat (o creixement cel·lular).

EXPERIMENT III: ANÀLISI MORFOLÒGICA NUCLEAR DE LA DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR DESPRÉS DE TRACTAMENT AMB ATRA $1\mu\text{M}$ DURANT 5 DIES

Descripció general i objectius:

En aquest tercer experiment, es realitzarà una anàlisi morfològica nuclear i citosòlic mitjançant el mètode de tinció de cèl·lules per Hematoxilina-Eosina per tal de:

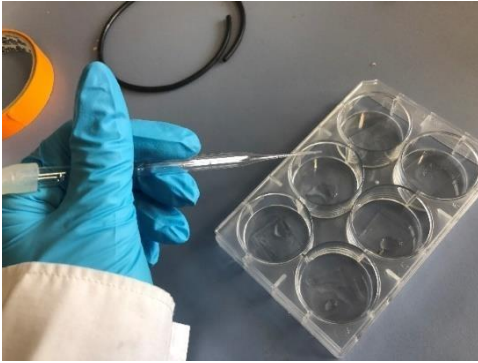
1. Determinar si ATRA indueix la diferenciació cel·lular.
2. Si és així, realitzar una observació minuciosa de les cèl·lules al microscopi i determinaren quin estadi o grau de maduració es troben.

Materials:

- Pipetes serològiques.
- Matràs Erlenmeyer.
- Agitador orbital automàtic.

L'eficàcia dels agents de diferenciació en la cura de l'APL

- Succionadora automàtica.
- Portaobjectes.
- Cobreobjectes.
- Ampolles de rentatge.
- Ampolles amb comptagotes per afegir el Vectashield.

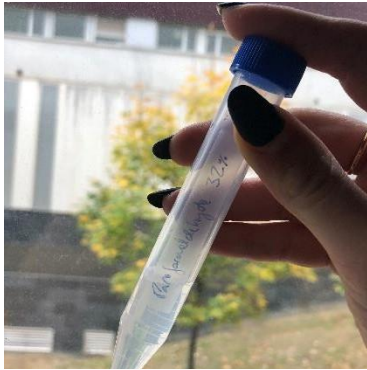


Imatge 14: Succionadora automàtica

Compostos:

Compostos per a la fixació de cèl·lules:

- Paraformaldehid
- Poly-L-Lisina (aminoàcid sintètic de càrrega positiva derivat de la lisina que permet unamillor adhesió cel·lular).



Imatge 15: Paraformaldehid 32%



Imatge 16: Poly-L-Lisina

Compostos per a la tinció:

- Hematoxilina.
- Eosina.
- Àcid etanol.
- Aigua destil·lada.

- Aigua de l'aixeta.
- Etanol (alcohol) al 95% i 100%.



Imatge 17: Compostos emprats per la tinció.

Compostos per al muntatge del cobreobjectes:

- Vectashield (oli de muntatge).
- Esmalt d'ungles.

Concentracions i quantitats (consultar ANNEX1 pels càlculs de volum):

Concentracions i quantitats per a la fixació de cèl·lules:

- Paraformaldehid al 4%: 1.5mL.
- Poly-L-Lisina: Quantitat necessària fins que el cobreobjectes quedi totalment recobert.

Concentracions i quantitats per a la tinció de cèl·lules:

- Hematoxilina: 3mL.
- Eosina: 3mL.
- Àcid etanol: 1.25uL concentrat d'HCl + 50mL d'etanol al 70%.
- Aigua destil·lada: 2 rentats de 3mL.
- Aigua d'aixeta: 3 rentats de 3mL.
- Etanol al 95%: 3 rentats de 3mL
- Etanol al 100%: 3 rentats de 3mL

Quantitats pel muntatge del cobreobjectes:

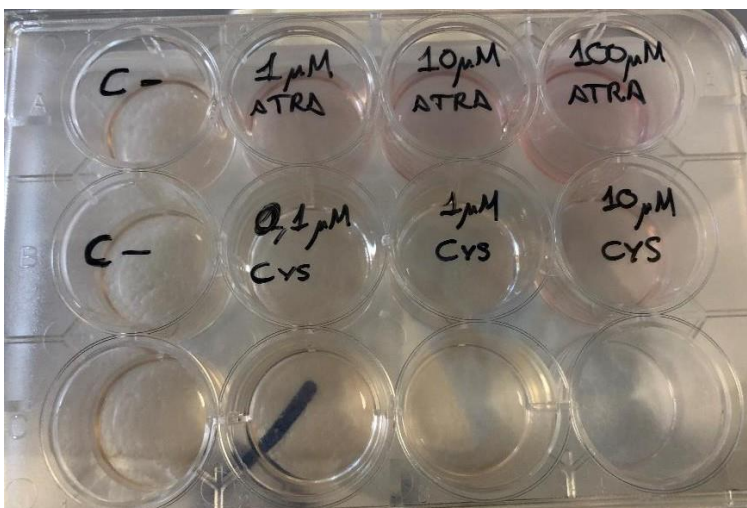
- Vectashield: 6 gotes (1 gota per cada mostra)

Protocol:

Preparació placa de 12 pouets. Tractament de les cèl·lules.

Taula 1: Preparació placa 12 pouets per a la tinció de les cèl·lules HL60.

Control -	1uM ATRA	10uM ATRA	100uM ATRA
Control -	0.1uM Cis-Pt	1uM Cis-Pt	10uM Cis-Pt
RPMI	RPMI	RPMI	



Imatge 18: Placa de 12 pouets amb els compostos afegits. Es pot veure com els pouets amb ATRA presenten un color més rosaci. Això és degut a un menor nombre cel·lular origen de la diferenciació cel·lular, ATRA sembla funcionar a 1uM. En canvi, el cisplatí sembla funcionar a partir de concentracions que ronden els 10uM.

Protocol de fixació de cèl·lules en suspensió: "ICC Cell Smear Protocol for Suspension Cells"

És important que les cèl·lules quedin fixades per tal que s'adhereixin bé a la superfície del cobreobjectes i puguin ser fàcilment visualitzades a través del microscopi.

1. Per tal d'optimitzar el funcionament del paraformaldehid (polímer de formaldehid, aldehid derivat del metà), ajustar les cèl·lules a una densitat d' 1×10^6 cèl·lules/mL i fixar-les afegint un 4% del polímer directament sobre el medi de cultiu (cèl·lules prèviament adherides) durant 20 minuts a temperatura ambient. No afegir al grup control.
2. Pipetejar 1mL de la suspensió de cèl·lules fixes en un tub Eppendorf i centrifugar durant 30s a màxima velocitat.
3. Treure el sobrenadant (medi, aigua, compostos...) del tub Eppendorf amb l'ajuda de la pipeta i tornar a suspendre el sediment cel·lular obtingut en 1mL d'aigua pura. Centrifugar de nou durant 30s a les mateixes condicions de velocitat.
4. Treure el sobrenadant i tornar a suspendre el sediment cel·lular en 200 uL d'aigua pura.
5. Afegir 5uL de la suspensió de la cèl·lula a un cobreobjectes prèviament recobert amb Poly-L-Lisina.

6. Untar la suspensió sobre la superfície del cobreobjectes amb la punta d'una pipeta.
7. Deixar que s'evapori tot el líquid. Col·locar sobre una planxa calenta a baixa temperatura.
8. Passades unes dues hores, comprovar la presència de cristalls de sal amb el microscopi. Si és el cas, rentar lleugerament el cobreobjectes amb aigua.

*Observacions: Veurem com a mesura que les concentracions de tractament augmenten, el cultiu cel·lular es torna d'un color més rosaci i deixa de ser tan groc (més àcid, major presència de cèl·lules). També veiem que el sediment cel·lular es torna més petit. Això és degut al fet que mesura que les concentracions augmenten el nombre cel·lular disminueix. Suposadament és degut a mort cel·lular per part de Cis-Pt i per diferenciació per part d'ATRA.

Protocol de tinció per Hematoxilina i Eosina (de *Baylor College of Medicine*)

Hidratació de cèl·lules:

1. Afegir 3mL d'aigua desionitzada (destil·lada) a les cèl·lules HL-60 fixades i seques. Agitar en l'agitador a velocitat mitjana durant 5 minuts.
2. Treure l'excés d'aigua dels voltants amb la succionadora.

Tinció per Hematoxilina

1. Afegir 3mL Hematoxilina a la placa i agitar a l'agitador durant 3 minuts. Succionar l'excés.
2. Esbandir l'aigua desionitzada.
3. Afegir 3mL d'aigua de l'aixeta per tal de permetre el desenvolupament de plaques. Agitar durant 5 minuts. Passats els 5 minuts, succionar l'excés.
4. Immergir ràpidament la mostra cel·lular en etanol àcid 10 cops (per destenyir).
5. Tornar a afegir 3mL d'aigua de l'aixeta (esbandir) i agitar durant 1 minut. Succionar l'excés.
6. Esbandir 3mL d'aigua destil·lada i agitar durant 2 minuts. Important succionar completament l'excés d'aigua del portaobjectes abans de procedir amb l'eosina.

Tinció per Eosina

1. Submergir el portaobjectes en eosina durant 30 segons (45 segons per a un lot més antic
2. d'eosina).
3. Afegir 3mL d'etanol al 95% a la mostra, agitar per 5 minuts i succionar l'excés. X3
4. Afegir 3mL d'etanol al 100% a la mostra, agitar per 5 minuts i succionar l'excés. X3
5. Treure a la perfecció tot l'excés d'alcohol.

Muntatge del cobreobjectes

1. Sobre un portaobjectes, dipositar dues gotes (1 per cada mostra de la mateixa

concentració d'ATRA) de Vectashield amb molta cura de no formar bombolles.

2. Deixar caure suaument (amb molta cura de dipositar les cèl·lules cap per avall en contacte amb l'oli) el cobreobjectes sobre la gota que servirà de barrera entre ell i el portaobjectes.
3. Deixar que la gota cobreixi tot el llisall de coberta, cobrint així tot el teixit.
4. Envernissar les voreres del portaobjectes amb esmalt d'ungles de manera que aquest no llisqui amb el Vectashield.
5. Deixar assecar a una superfície seca i fosca, preferiblement a temperatura ambient- freda.



Imatge 19: Cobreobjectes amb les diferents concentracions d'ATRA llestos per a ser analitzats al microscopi.

3.4. RESULTATS EXPERIMENTALS I DISCUSSIÓ

3.4.1. REDUCCIÓ INSUFICIENT DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR DESCONTROLADA EN TRACTAMENT ESTÀNDARD AMB ATRA

L'ATRA es presenta com al principal medicament alternatiu als medicaments quimioterapèutics per a la leucèmia promielocítica aguda. Segons estudis previs, aquest medicament sembla exercir una eficàcia terapèutica rellevant a dosis relativament baixes, on els efectes secundaris del compost no suposarien un problema. Aquesta dosi s'estima que ronda la concentració d'1µM.

A fi de determinar si el tractament amb ATRA, efectivament redueix el temps de duplicació cel·lular de les cèl·lules canceroses, es va realitzar una corba de creixement durant un període de 7 dies. En aquesta corba, s'esperava veure una reducció considerable de la proliferació cel·lular, no obstant els resultats que es van obtenir difereixen de l'esperat.

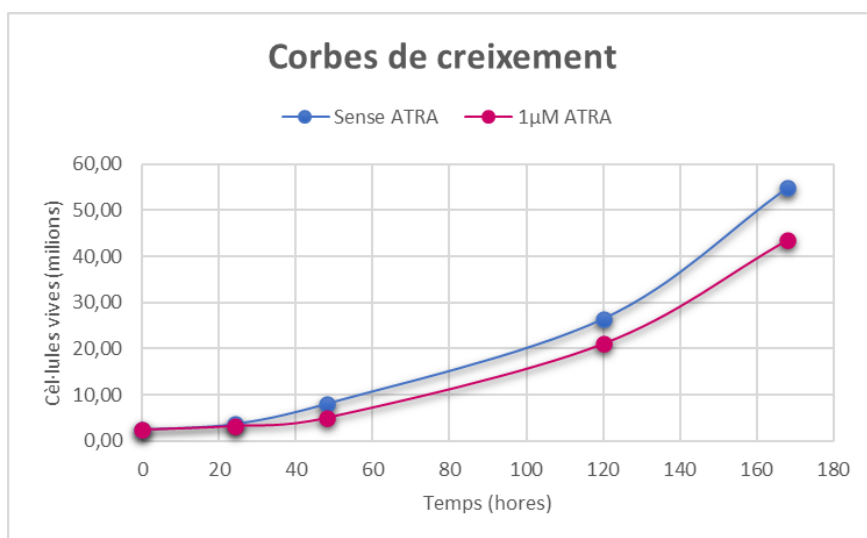
Durant diversos dies es va recollir una mostra del cultiu cel·lular i es va analitzar en termes de número total de cèl·lules vives i percentatge de viabilitat. Les dades obtingudes es mostren a la taula 1.

Taula 2: Número de cèl·lules vives i mortes amb ATRA i sense ATRA en els diferents temps, percentatge de viabilitat i quantitat (mL) de cèl·lules totals. El percentatge de viabilitat va lligat al nombre de cèl·lules en proporció de cèl·lules totals.

nº cèl.lules vives (milions)		nº cèl.lules mortes		% de viabilitat		mL de cèl.lules
Sense ATRA	1µM ATRA	Sense ATRA	1µM ATRA	Sense ATRA	1µM ATRA	
2,43	2,43	0,31	0,31	88,75%	88,75%	1.25mL en 5mL totals
3,65	3,25	0,55	0,60	86,90%	84,42%	5mL
8,05	5,00	1,65	0,83	82,99%	85,84%	5mL
26,50	21,00	2,40	2,00	91,70%	91,30%	5mL en 20mL totals
55	43,5	3,50	6,00	92,55%	90,16%	20 mL en 100 mL totals

Per tal d'analitzar les dades obtingudes a la realització de l'assaig i començar a extreure conclusions, es va realitzar una dispersió (corba de creixement) de les cèl·lules tractades amb ATRA i de les cèl·lules control (gràfica 1).

Gràfica 1: Corba de creixement 0h-168h de cèl·lules tractades amb ATRA (lila). Com a control es van fer servir cèl·lules sense tractar (blau).



Tal com es pot observar a la gràfica 1, ambdós cultius presenten una forma de corba exponencial quant el nombre de cèl·lules vives, de manera que s'ha aconseguit evitar les fases de latència i estacionaria. A escala macroscòpica, es pot observar una lleugera disminució de la velocitat de creixement de les cèl·lules en presència d'ATRA. No obstant, aquesta davallada no suposaria un efecte significatiu a nivell terapèutic.

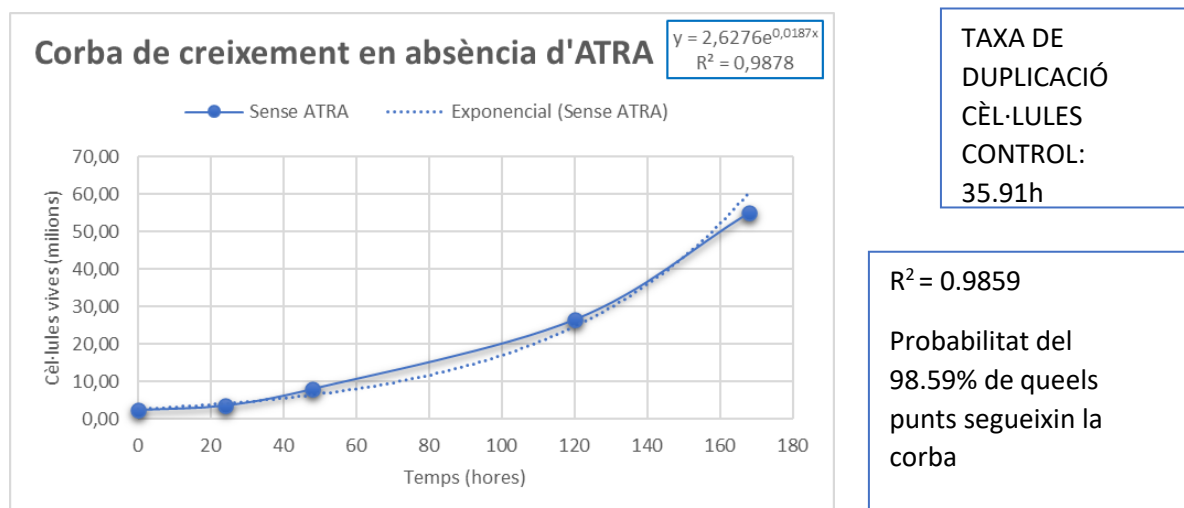
Així doncs, es va calcular la taxa de duplicació de les cèl·lules control (gràfica 2) i de les cèl·lules tractades amb ATRA (gràfica 3) ajustant les dades obtingudes a una corba de creixement exponencial, tot obtenint la constant de creixement " μ ". Ambdós cultius s'ajusten a una corba exponencial amb alta precisió (coeficient de regressió 0.9878 i 0.9963).

La μ obtinguda per les cèl·lules control va ser de 0.0187 h^{-1} , mentre que les cèl·lules tractades amb ATRA tenen una μ de 0.0173 h^{-1} . A partir d'aquests valors s'obté la taxa de duplicació. La taxa de duplicació obtinguda per les cèl·lules control va ser de 36 hores mentre que la de les cèl·lules tractades amb ATRA va ser de 40 hores.

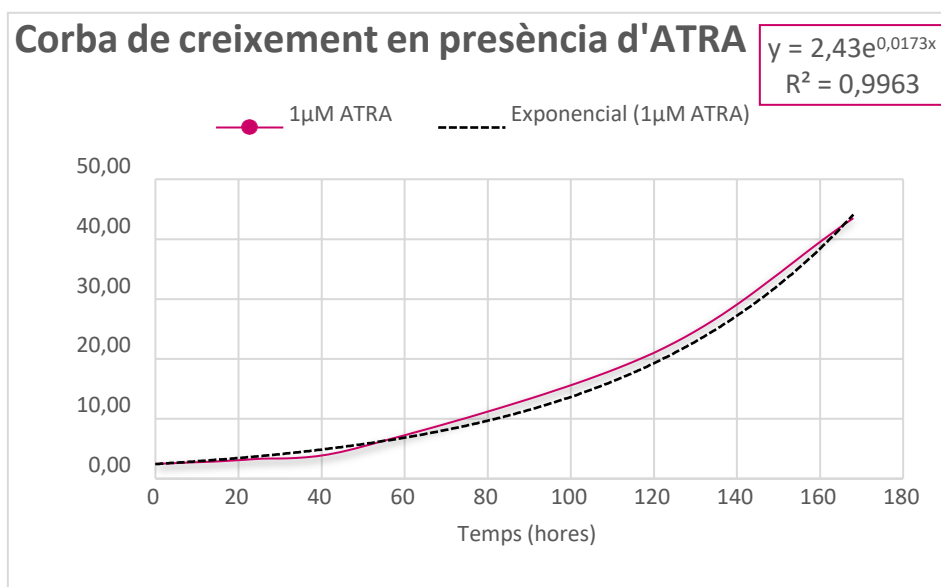
Aquesta diferència de 4 hores de les taxes de duplicació suposa un valor insuficient per explicar l'efectivitat que promet el medicament en qüestió. Aquest efecte pot ser degut al fet que la complexitat de les interaccions en un cos humà no sempre es poden replicar *in vitro*, de manera que no estem accedint al sistema complet. És a dir, és possible que aquesta reducció de 4 hores en el temps de duplicació (11% de reducció) sigui suficient per desplaçar l'equilibri entre la proliferació i la mort cel·lular, gràcies al fet que el cos, en el seu estat natural, disposa de mecanismes per combatre la proliferació tumoral.

Aquesta possibilitat es veu recolzada pel fet que el temps en que es pot observar una duplicació en el nombre de cèl·lules *in vivo* és de 6 mesos; en canvi, en cèl·lules *in vitro* és de 48 hores.

Gràfica 2: Determinació de la taxa de duplicació de les cèl·lules control a partir de l'anàlisi de la corba de creixement.



Gràfica 3: Determinació de la taxa de duplicació de les cèl·lules amb ATRA a partir de l'anàlisi de la corba decreixement.



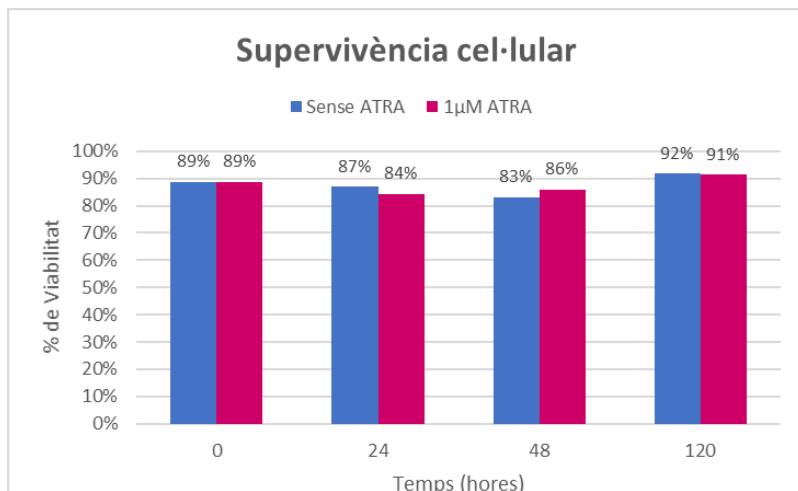
TAXA DE DUPLICACIÓ DE CÈL·LULES AMB ATRA: 40.07h

$R^2 = 0.9945$
 Probabilitat del 99.45% de que els punts segueixin la corba

Pel que fa al percentatge de viabilitat cel·lular, aquest no sembla estar afectat per la presència del tractament (gràfica 4). La proporció entre cèl·lules vives i mortes de les dues mostres, tot i créixer a diferents velocitats (gràfica 3), es manté constant.

El fet que gairebé no hi hagi variacions en la supervivència cel·lular és degut a la particularitat d'ATRA. Redueix la velocitat de creixement de les cèl·lules canceroses per mitjà de diferenciació en comptes d'induir la mort cel·lular, com faria un tractament quimioterapèutic. Això fa, a més, que el nombre de cèl·lules mieloides madures es regularitzi en comptes de disminuir.

Gràfica 4: Supervivència cel·lular (% viabilitat) gairebé no varia en presència o absència d'ATRA



3.4.2. DETERMINACIÓ DE LA CORBA DE DOSI-RESPOSTA EN PRESENCIA D'ATRA

Els resultats obtinguts de l'experiment 1 mostren una reducció del creixement cel·lular que aparentment sembla ser insuficient com per explicar l'eficàcia terapèutica que presenta el fàrmac. Es va plantejar la possibilitat que la dosi estàndard no sigui l'òptima a l'hora de garantir la màxima reducció del creixement cel·lular.

Per comprovar la hipòtesi i determinar la dosi més rendible, es va procedir a realitzar una corba dosi-resposta a diferents concentracions del fàrmac.

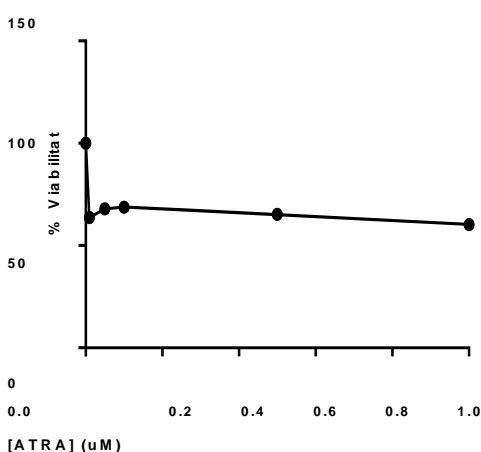
3.4.2.1. SENSIBILITAT A NIVELLS FISIOLÒGICS D'ATRA

A l'hora de realitzar la corba dosi-resposta, es va veure que en presència d'entre 0.01-1 μ M d'ATRA, es produeix una reducció de la viabilitat cel·lular d'un 40% que es manté constant, independentment d'un augment de la dosi administrada dins d'aquest rang.

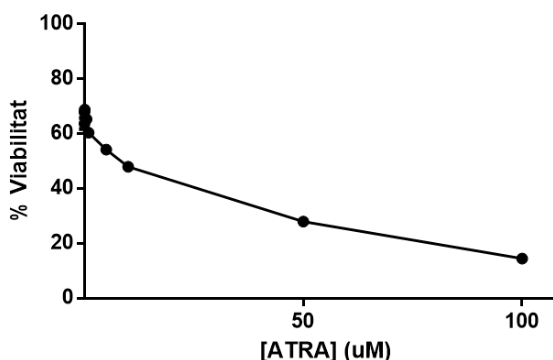
Revisant la bibliografia, es va veure que l'ATRA es troba present de manera natural a concentracions d'1nM en sang. Aquest fet, sumat al fet que l'ATRA té la capacitat de diferenciar cèl·lules, ens fa pensar que aquesta disminució inicial de la viabilitat cel·lular no és deguda a mort cel·lular, sinó a diferenciació i per tant, una disminució de la velocitat en la proliferació cel·lular de les cèl·lules canceroses. A més a més, aquest raonament està recolzat pels percentatges de supervivència cel·lular obtinguts a l'experiment anterior, els quals ens indiquen que no hi ha variacions en la supervivència cel·lular davant l'administració amb ATRA.

Gràfica 5: Percentatge de viabilitat ATRA(μ M) a nivells fisiològics. Gràfica 6: Corba de disminució viabilitat per ATRA a totes les concentracions a estudiar.

Sensibilitat a nivells fisiològics d'ATRA



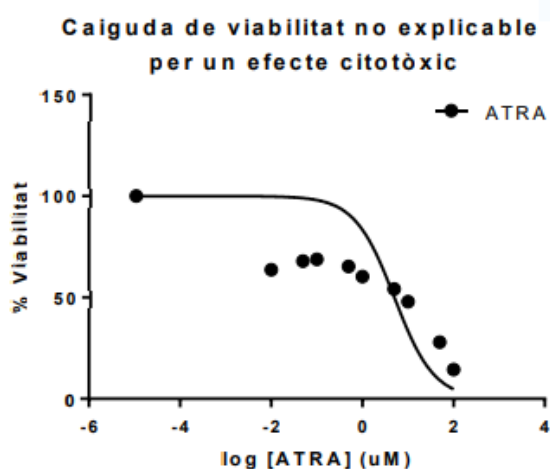
Corba disminució viabilitat per ATRA



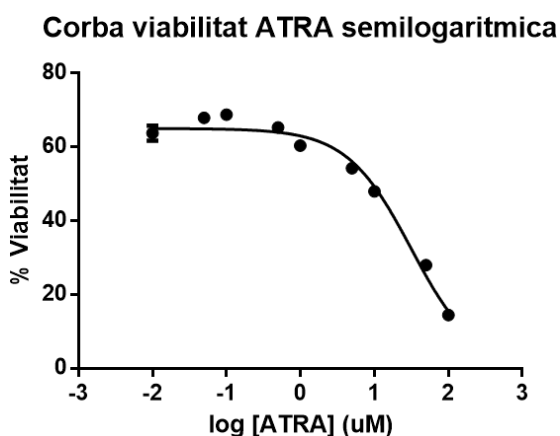
Ara bé, si ens allunyem d'aquest primer rang i augmentem considerablement la dosi, podem comprovar com després d'aquesta primera estabilització, on ATRA està diferenciant sense induir la disminució de la viabilitat cel·lular, es produeix un canvi de tendència on el percentatge de viabilitat disminueix progressivament a mesura que s'augmenten les concentracions (gràfica 6).

Per veure si aquesta disminució és deguda a un efecte dosi-resposta de mort cel·lular, les dades s'haurien d'ajustar a una corba sigmoide quan són presentades de forma corba semi- logarítmica. Això és degut a que la viabilitat cel·lular decreix de manera exponencial amb la concentració d'un compost citotòxic. A partir d'aquesta corba, es pot extreure la dosi letal 50 (LD50), que correspondria a la quantitat de compost necessari per reduir a un 50% la viabilitat cel·lular (punt d'inflexió de la corba sigmoide).

Gràfica 7: Dades de viabilitat cel·lular semi- logarítmica ajustada incloent el control sense tractar. Control ajustat a 0.00001 ja que $\log 0$ no existeix.



Gràfica 8: Dades de viabilitat cel·lular semilogarítmica ajustades sense incloure el control sense tractar.



Com es va veure a la gràfica 5, es va produir una disminució inicial del percentatge de viabilitat cel·lular d'un 40% deguda a efectes de diferenciació cel·lular. Per aquest motiu, si a la corba de viabilitat semilogarítmica hi tenim en compte el grup control, la interpretació semilogarítmica no s'ajusta (gràfica 7). En canvi, si no es tenen en compte els valors del control, les dades s'ajusten quasi a la perfecció, obtenint un valor de fiabilitat del 0.9830 a la R^2 , el que suposa que en un 98.3% de probabilitat, la corba s'ajusta a les dades (gràfica 8).

Així doncs, tal com mostra la gràfica 8, a concentracions d'1uM i inferiors, el tractament no és citotòxic perquè la viabilitat es manté constant. No obstant, a partir d'aquesta concentració, comença a produir-se un canvi de tendència significatiu en el qual la viabilitat descendeix, mostrant una DL50 de 31.36uM. Això ens fa pensar que el tractament deixa de complir la seva funció diferenciadora i comença a ser citotòxic, induint a mort cel·lular. Aquest fet és degut a una sobredosi del medicament. Aquesta sobredosi podria aparèixer de forma natural a l'organisme per acumulació del compost a zones específiques o per falta de degradació que podria explicar molts dels efectes secundaris del tractament.

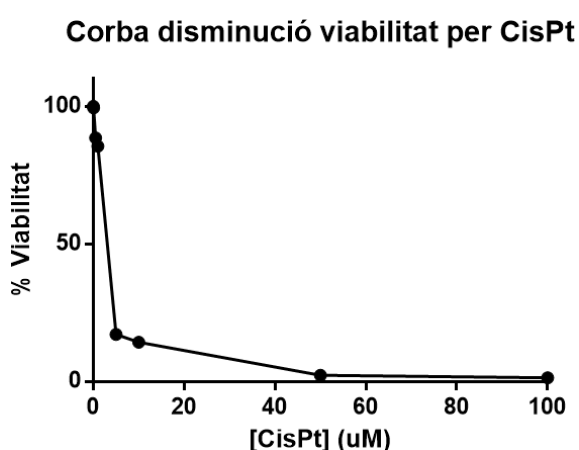
3.4.3. DETERMINACIÓ DE LA CORBA DE DOSI-RESPOSTA EN PRESENCIA DE CISPLATÍ

El cisplatí és un agent alquilant. Aquest actua detenint o reduint la velocitat de proliferació de les cèl·lules canceroses mitjançant la mort cel·lular.

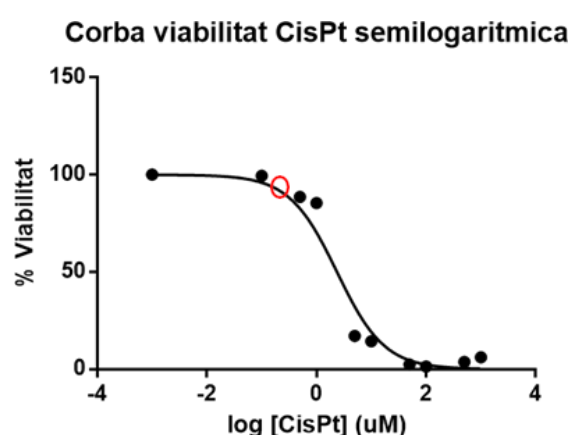
Com es pot veure a la gràfica 9. El percentatge de viabilitat disminueix notablement a concentracions considerablement baixes. Això, sumat al fet que el pendent del gràfic és molt alt, ens fa pensar que el tractament amb cisplatí és molt letal, d'aquí la seva efectivitat com a agent quimioterapèutic.

Com es pot observar a la gràfica 10, en aquest cas el control sense tractar dona el mateix percentatge de viabilitat que els primers punts, sense caiguda inicial. Això és degut al fet que encap moment es produeix diferenciació, aquesta gràfica és una representació de la disminució del percentatge de viabilitat cel·lular únicament induïda per citotoxicitat. Aquesta corba s'ajusta al 96% a les dades i presenta una DL50 de 2.4uM (altament citotòxic).

Gràfica 9: Corba disminució de viabilitat per Cis-Pt.



Gràfica 10: Corba de viabilitat de Cis-Pt semilogarítmica.



Observant la corba de viabilitat del cisplatí semilogarítmica, és quan es pot determinar a quina concentració el tractament amb cisplatí comença a produir el seu efecte citotòxic. Aquest valor correspon a concentracions lleugerament inferiors a 1 μ M (comença a produir-se la disminució del percentatge de viabilitat).

A mesura que s'augmenten les concentracions, el tractament actua amb més efectivitat en termes de viabilitat, sense oblidar que també suposaria un augment no desitjat dels nombrosos efectes secundaris de la quimioteràpia. És finalment a la concentració de 50 μ M quan el tractament ha matat totes les cèl·lules canceroses (pendent nul). Tanmateix, encara que sembli que aquestes altes concentracions siguin les més eficaces per a la cura de la leucèmia, no són òptimes perquè són intolerables per a l'organisme.

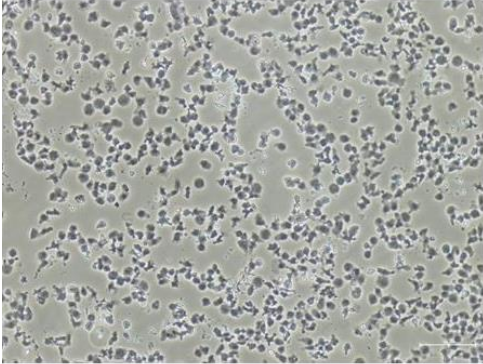
3.4.4. EL TRACTAMENT AMB ATRA INDUEIX LA DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR

Un cop realitzats els dos experiments anteriors, per tal d'acabar de determinar si la diferenciació produïda per ATRA suposa una especialització completa (i per tant una total remissió de la malaltia) del promielòcit, es va intentar realitzar una anàlisi morfològica nuclear i citosòlica de la progressió dels promielòcits a diferents concentracions d'ATRA i cisplatí. Alhora, també es va realitzar l'anàlisi de les cèl·lules control, per comprovar de forma més clara els canvis morfològics produïts arran de les cèl·lules en el seu estat inicial.

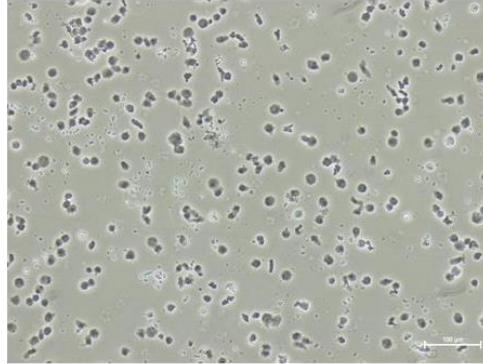
Per fer aquesta anàlisi es va intentar fer una tinció per Hematoxilina-Eosina que hauria d'haver permès la identificació de l'estat de maduresa de les cèl·lules. No obstant, després de dos intents no es va poder obtenir una tinció nítida. No es va poder determinar la font de l'error i les imatges obtingudes es presenten en blanc i negre de manera que és molt difícil de determinar les diferències morfològiques suposadament produïdes. Tanmateix, és molt probable que l'error hagi estat l'Eosina emprada, ja que la tinció per Hematoxilina ha d'haver funcionat correctament atès que els nuclis de les cèl·lules són fàcilment observables.

De totes maneres, mitjançant una avaluació de les imatges obtingudes, es van intuir certes diferències

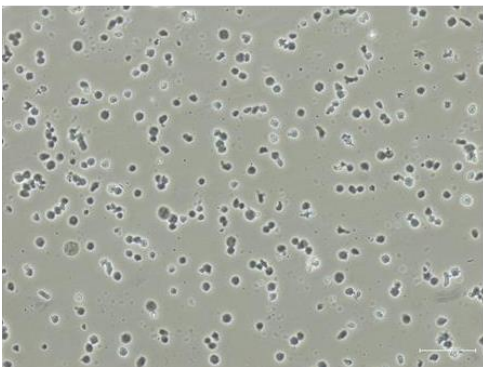
C-



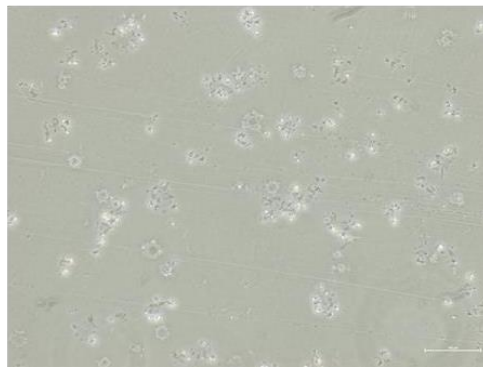
ATRA 1 μ M



ATRA 10 μ M

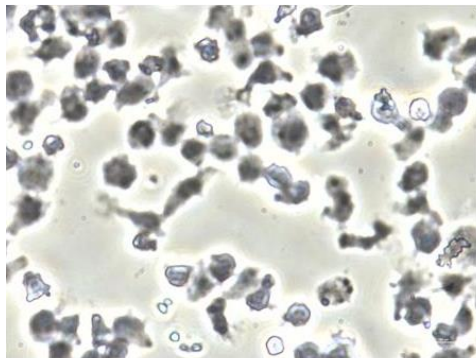


ATRA 100 μ M

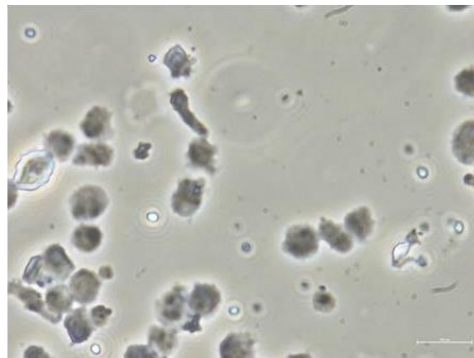


Imatge 1: Cèl·lules tractades amb diferents concentracions d'ATRA durant 72h visualitzades a 60X.

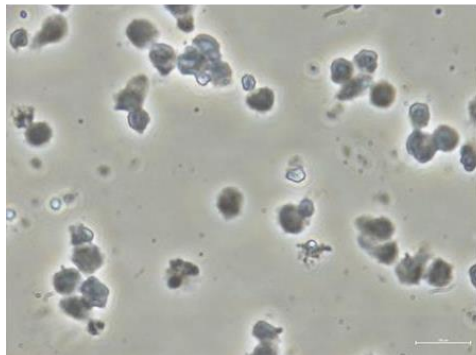
C-



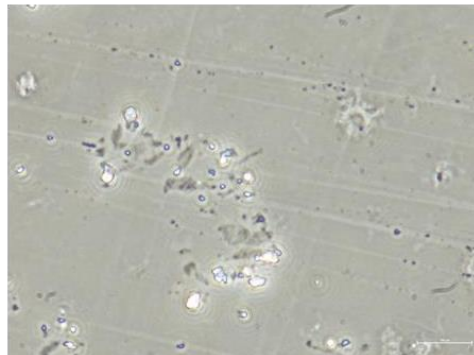
ATRA 1 μ M



ATRA 10 μ M



ATRA 100 μ M



Imatge 2: Cèl·lules tractades amb diferents concentracions d'ATRA durant 72h visualitzades a 600X.

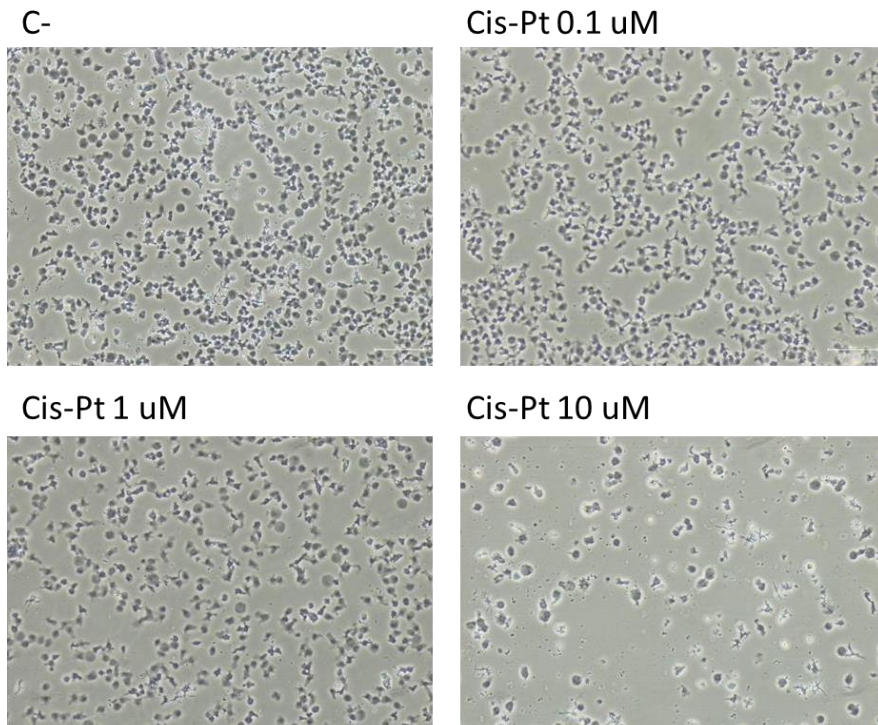
La imatge 1 mostra, tal com es va determinar a la corba de viabilitat de l'experiment 2, com el tractament ATRA a 1uM genera una disminució notable del nombre de cèl·lules sense deixar rastre de residus cel·lulars provocats per efectes citotòxics. Tot i que a 10uM el tractament comença a adquirir citotoxicitat, ho fa en una proporció tan baixa, que a nivells microscòpics no és apreciable. Per l'altra banda a 100uM no es poden observar cèl·lules vives, tot i que sí que es poden observar residus cel·lulars derivats de la mort d'aquestes per sobredosi.

Per tal d'analitzar la seva morfologia, es van ampliar les fotografies de la imatge 1 a 600X. Es pot observar (imatge 2) com evidentment, les cèl·lules control presenten una morfologia amorfa, amb nuclis aberrants. Tanmateix, un cop les cèl·lules han estat tractades amb ATRA a 1uM i a 10uM, adquireixen formes més esfèriques amb nuclis més definits, demostrant que han adquirit un major grau de maduresa. Tot i això, a causa de dèficits a la tinció, és impossible determinar amb total precisió la fase de desenvolupament del promielòcit.

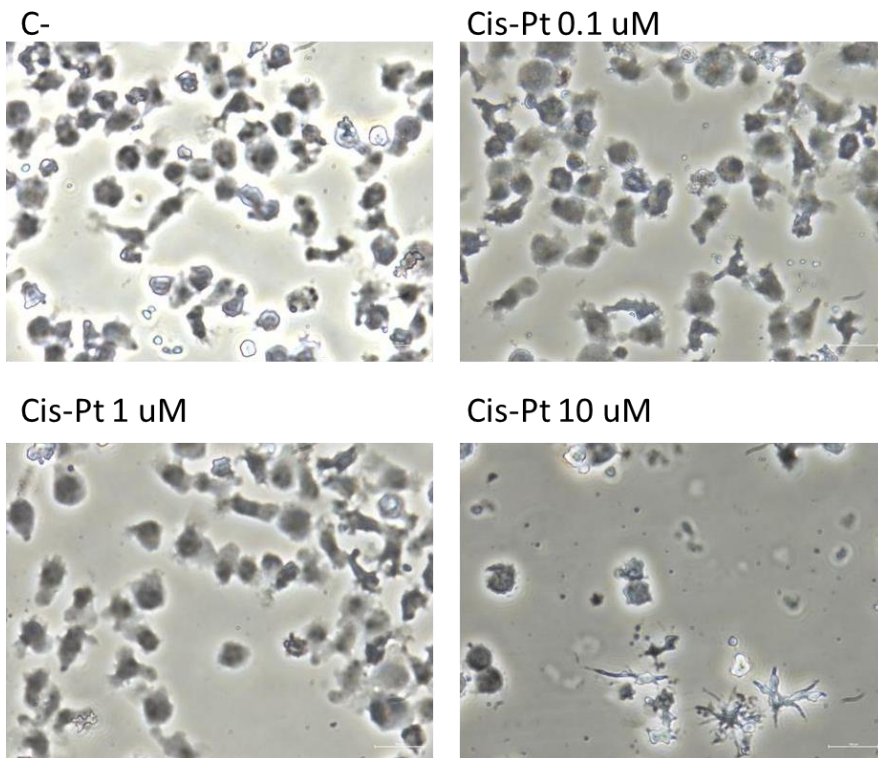
Finalment, a la concentració altament citotòxica de 100uM, només s'hi poden observar els residus cel·lulars.

Per l'altra banda, pel que fa a el tractament amb cisplatí, només s'hi produeix una reducció del nombre de cèl·lules a 10uM, concentració en la qual el medicament compleix les seves expectatives quimioterapèutiques (imatge 3).

La diferència més significativa en comparació a l'agent de diferenciació es veu en l'anàlisi morfològica d'ambdós tractaments. La imatge 4 mostra que en cap moment s'hi produeix cap canvi morfològic de les cèl·lules tractades. Aquestes es mostren sempre amorfes. L'únic canvi observable de l'estudi amb cisplatí a diferents concentracions es dona a la concentració citotòxica, on aquesta morfologia deriva en estructures encara més amorfes. Alhora, també s'hi pot observar un gran nombre de cèl·lules amb formes estrellades i sense nucli aparent, que correspondrien a cèl·lules mortes o en procés de mort.



Imatge 3: Cèl·lules tractades amb diferents concentracions de cisplatí durant 72h visualitzades a 60X.



Imatge 4: Cèl·lules tractades amb diferents concentracions de cisplatí durant 72h visualitzades a 600X.

4. CONCLUSIONS

Com s'ha vist al llarg del projecte, el càncer és el terme general que dona nom a un gran nombre de malalties les quals varien segons un sense fi de factors. És aquesta característica variabilitat la que permet el desenvolupament i creació de noves teràpies alternatives, que de manera més específica, prometen resultar ser més eficaces i menys agressives. En concret, la recerca es va focalitzar en la cura d'un subtipus específic de leucèmia, la leucèmia promielocítica aguda, la qual presentava una mutació concreta que la feia sensible a un seguit de medicaments alternatius que asseguraven no tenir propietats citotòxiques sinó diferenciadores.

Així doncs, l'objectiu principal d'aquesta recerca era estudiar si els medicaments alternatius a la quimioteràpia en la leucèmia promielocítica aguda són realment efectius i poden remetre la progressió d'aquest tipus de càncer. A la vista dels resultats obtinguts de la realització dels experiments, podem extreure les següents conclusions:

1. A concentració terapèutica, l'agent de diferenciació ATRA interfereix en la velocitat de proliferació cel·lular provocant una reducció en la velocitat de reproducció de les cèl·lules.
2. La disminució de la velocitat de reproducció no és causada per un canvi en el percentatge de viabilitat cel·lular, ja que la proporció entre cèl·lules vives i mortes es manté constant. ATRA és capaç de regular la progressió del cycle cel·lular. Això incita a pensar que s'està produint l'efecte de diferenciador cel·lular esperat.
3. Dins el rang de dosi de 10nM a 1uM, es produeix una reducció de la quantitat de cèl·lules que pot ser explicada per un efecte diferenciador. Si superem aquesta dosi, l'agent de diferenciació adquireix un caràcter citotòxic.
4. La hipòtesi que l'ATRA és capaç de diferenciar les cèl·lules es troba sostinguda pels canvis morfològics observats sota microscòpia, on es pot observar un arrodoniment dels promielòcits amorfs, suggerint la seva maduració a neutròfils (o com a mínim, amielòcits).

Per tant, tot i que els experiments es van realitzar en cèl·lules *in vitro* la qual cosa suposaria que en organismes vius hi ha un major nombre de variables que podrien interferir en l'efectivitat del medicament, com a conclusió general podem afirmar que l'ATRA es presenta com a una alternativa potencialment eficaç per a la cura de l'APL.

La teràpia de diferenciació que empren els retinoides sembla tenir un futur prometedor. Tanmateix, el procés de desenvolupament d'un fàrmac efectiu que alhora no presenti efectes secundaris altament adversos o letals és molt complex, essent necessaris anys i anys d'estudi i dedicació.

Finalitzo aquest treball amb una realització completa de tots els objectius inicialment plantejats, gaudint d'haver-me endinsat en aquesta branca de la ciència tan sorprenent, motivadora i dinàmica com és la investigació biomèdica.

5.WEBGRAFIA I REFERÈNCIES

- Cooper GM. The Development and Causes of Cancer. 2000 [cited 2020 Jul 23]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- ¿Qué es el Cáncer? ¿Cómo se Desarrolla? | AECC [Internet]. [cited 2020 Jul 23]. Available from: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer>
- Tumor maligno y benigno, ¿cuáles son las diferencias? — Mejor con Salud [Internet]. [cited 2020 Jul 24]. Available from: <https://mejorconsalud.as.com/tumor-maligno-y-benigno-cuales-son-las-diferencias/>
- AACR Cancer Progress Report - Cancer Progress Report [Internet]. [cited 2020 Jul 25]. Available from: <https://cancerprogressreport.aacr.org/progress/>
- The Development and Causes of Cancer - The Cell - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2020 Jul 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- Sustancias en el ambiente que causan cáncer - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [cited 2020 Jul 28]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/sustancias>
- Clasificación del cáncer [Internet]. [cited 2020 Jul 29]. Available from: [https://www.news-medical.net/health/Cancer-Classification-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Cancer-Classification-(Spanish).aspx)
- Los 7 tipos de leucemia (y diferencias entre ellas) [Internet]. [cited 2020 Jul 29]. Available from: <https://azsalud.com/enfermedades/tipos-de-leucemia>
- De Medicina A, Muñoz D, Prada-Arismendy J, Castillo E. El Papel de FLT3 como Biomarcador en Leucemia. Arch Med [Internet]. 2018 Apr 12 [cited 2020 Aug 3];14(1):5. Available from: <https://www.ncbi>
- Leukemia Risk Factors: ALL, AML, CLL and CML | Leukemia Diagnosis and Treatment | University of Michigan Rogel Cancer Center [Internet]. [cited 2020 Jul 29]. Available from: <https://www.rogelcancercenter.org/leukemia/risk-factors>
- Leukemia Diagnosis and Tests | Cleveland Clinic [Internet]. [cited 2020 Aug 5]. Available from: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/4365-leukemia/diagnosis-and-tests>
- Jing Y. The PML-RAR α fusion protein and targeted therapy for acute promyelocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2004;45(4):639–48 [cited 2020 Sep 2].
- Naeim F, Nagesh Rao P, Song SX, Grody WW. Acute Myeloid Leukemias with Recurrent Genetic Abnormalities. In: Atlas of Hematopathology. Elsevier; 2013. p. 227–44 [cited Sep 2].
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [Internet]. Vol. 100, Cell. Elsevier; 2000 [cited 2020 Nov 6]. p. 57–70. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867400816839/fulltext>
- (No Title) [Internet]. [cited 2020 Sept 7]. Available from: https://www.ils.org/sites/default/files/National/USA/Pdf/Publications/Spanish_APL_Fact_Sheet_____12_15.pdf
- Munshi NC, Jagannath S. Plasma Cell Neoplasms. In: Hematology: Basic Principles and Practice. Elsevier Inc.; 2018. p. 1381-1418.e1 [cited 2020 Sept 24].
- Hibridación fluorescente in situ (FISH) | NHGRI [Internet]. [cited 2020 Dec 12]. Available from:

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Hibridacion-fluorescente-in-situ>
Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace VM. All trans retinoic acid and cancer [Internet]. Vol. 33, Immunopharmacology and Immunotoxicology. Immunopharmacol Immunotoxicol; 2011 [cited 2020 Dec 12]. p. 241–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20929432/>
Berbis P. Rétinoïdes: Mécanismes d'action. Ann Dermatol Venereol. 2010 Nov 1;137(SUPPL. 3):S97–103 [cited 2020 Dec 23].
ATRA - Chemocare [Internet]. [cited 2020 Oct 17]. Available from: <http://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/ATRA.aspx>
(No Title) [Internet]. [cited 2020 Oct 22 7]. Available from: <http://scielo.isciii.es/pdf/ami/v18n4/notacli1.pdf>
List of Alkylating agents - Drugs.com [Internet]. [cited 2021 Jan 4]. Available from: <https://www.drugs.com/drug-class/alkylating-agents.html>
Antineoplásicos antimetabolitos. [cited 2021 Jan 6]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-farmacos-antineoplasicos-i--13084621>.

6.ANEX 1: DIARI DE LABORATORI I BIBLIOTECA DE FOTOS

El propòsit d'aquest annex és fer una descripció específica de tots els passos a seguir efectuats en els tres experiments, juntament amb la voluntat de deixar constància de les tècniques de laboratori emprades que he après durant la realització del meu treball.

Tot això ho he volgut documentar en forma de diari, per així poder dividir totes aquestes tècniques i passos de forma senzilla i bastant clara; explicant-les segons el seu dia de realització.

23/09/2020: Primer dia de laboratori

EXPERIMENT 2:

Després d'haver-hi subcultivat les cèl·lules HL-60 en el medi de cultiu amb l'allargament de la seva vida com a objectiu principal, vaig realitzar el meu primer recompte cel·lular amb una càmera de recompte Neubauer.

Primer de tot, vam dipositar 10 µL de cèl·lules procedents del subcultiu juntament amb 10 µL més de tint (aquest tint, Trypan Blue) ens permet diferenciar les nostres cèl·lules de manera que les cèl·lules mortes adquireixen una tonalitat clarament més fosca que les vives atès que el tint s'introdueix dins d'elles al presentar danys en la seva membrana plasmàtica) dins la càmera de recompte Neubauer. Un cop dins la càmera, vam observar les cèl·lules a través del microscopi, i vam prosseguir a realitzar un recompte manual exhaustiu de les tres cel·les que componen la càmera.

Per realitzar el recompte cel·lular s'utilitza la següent fórmula:

$$n^{\circ} \text{ cèl. lules} \times 20000$$

(Nº de cèl·lules*2 ja que la dilució amb el tint és 1:2, 10 µL de tint i 10 µL de cèl·lules) (Nº de cèl·lules*10000 de la càmera de recompte Neubauer)

I per realitzar el percentatge de viabilitat:

$$n^{\circ} \text{ cèl. lules} \times 20000$$

(Nº de cèl·lules*2 ja que la dilució amb el tint és 1:2, 10 µL de tint i 10 µL de cèl·lules) (Nº de cèl·lules*10000 de la càmera de recompte Neubauer)

I per realitzar el percentatge de viabilitat:

$$\% \text{ cèl. lules vives: } \frac{\text{cèl. lules vives}}{\text{cèl. lules vives} + \text{cèl. lules mortes}} \times 100$$

- Cèl·lules vives $\rightarrow \frac{101+85+106}{3} = 97.33 \times 20000 = 1\,946\,666.67 \text{ cèl. lules}$
- Cèl·lules mortes $\rightarrow \frac{15+12+10}{3} = 12.33 \times 20000 = 246\,666.667 \text{ cèl. lules}$
- % de viabilitat $\rightarrow \frac{1946666.97}{1946666.97+246666.667} \times 100 = 88.75\%$

Com podem observar en els resultats del recompte, el percentatge de viabilitat cel·lular és molt alt,

donat que les cèl·lules leucèmiques HL-60 encara no han estat sotmeses a cap mena de tractament, i atès que són cèl·lules canceroses, presenten una capacitat de proliferació enorme i haver estat congelades durant més de 20 anys.

Seguidament de realitzar el recompte cel·lular, vam procedir a sembrar les cèl·lules una placa de 96 pouets.

L'objectiu és sembrar 10000 cèl·lules (100 µL) en els 60 pouets interiors de la placa i seguidament Afegir 200 µL de RPMI només als 36 pouets exteriors atès que en els pouets exteriors, el líquid té tendència a evaporar-se (canviant les concentracions i alterant els resultats), per això els utilitzarem a l'hora d'abocar el medi.

A la primera columna (6 pouets) hi abocarem únicament cèl·lules sense compost afegit i així aconseguirem un control del 100% de viabilitat. Als pouets restants afegirem 100µL dels dos medicaments per triplicat a les diferents concentracions que volem estudiar.

CÀLCULS PER SEMBRAR LES CÈL·LULES ALS 60 POUETS INTERIORS

- Número de cèl·lules necessàries → $10\ 000\ \text{cèl. lules} \times 60\ \text{pouets} = 600\ 000\ \text{cèl. lules}$

Es troben a 10 000 cèl·lules per cada 0.1mL, que és el mateix que dir 100 000 cèl·lules per ml. Així doncs, preparem un volum de 6mL en aquesta concentració.

Inicialment teníem 2 000 000 celules/mL → En volem 600 000 en total en 6 mL. D'aquesta manera, els càlculs queden:

- Volum d'HL-60 → $600\ 000\ \text{cèl. lules} \times \frac{1\text{mL}}{2\ 000\ 000} = \frac{6}{20} = 0.3\text{mL}$
- Volum RPMI → $6\text{mL} - 0.3\text{mL} = 5.7\ \text{mL}$

Tant el volum d'HL-60 com el de medi de cultiu RPMI els multiplicarem per 1.1 per tal de tenir un marge d'error si no es presentés cap problema de pèrdua dels compostos.

Tot després d'haver sembrat les cèl·lules als 60 pouets i d'haver afegit el medi de cultiu als pouets restants, vam prosseguir a preparar el banc de dilucions amb les diferents concentracions dels tots dos compostos.

PREPARACIÓ DEL BANC DE DILUCIONS AMB ATRA

Ens trobem amb una solució STOCK ATRA a 0.1M (100 000µM).

Per tal de preparar els pouets, hem de saber que la concentració inicial dels compostos ha d'estar dues vegades més concentrada a la concentració de treball (Exemple compost a 1 µM de concentració final):

$$C(\text{inicial}) \times V(\text{inicial}) = C(\text{final}) \times V(\text{final})$$
$$C(\text{inicial}) \times 100\ \mu\text{L} = 1\ \mu\text{M} \times 200\ \mu\text{L}$$

$$C(\text{inicial}) = 2\mu\text{M}$$

Es diu que la concentració estàndard d'aquest tractament és de $1\mu\text{M}$, així que vaig decidir analitzar aquest tractament a 8 concentracions diferents (a part de l'estàndard); 4 concentracions inferiors i 4 superiors. Les concentracions escollides a analitzar van estar les següents:

- ($0.01\mu\text{M}$ - $0.05\mu\text{M}$ - $0.1\mu\text{M}$ - $0.5\mu\text{M}$ - $1\mu\text{M}$ - $5\mu\text{M}$ - $10\mu\text{M}$ - $50\mu\text{M}$ - $100\mu\text{M}$)

Però per fer l'experiment vam duplicar la concentració de treball, ja que es posen $100\mu\text{L}$ de tractament + $100\mu\text{L}$ de cèl·lules, extraient les següents concentracions:

- ($0.02\mu\text{M}$ - $0.1\mu\text{M}$ - $0.2\mu\text{M}$ - $1\mu\text{M}$ - $2\mu\text{M}$ - $10\mu\text{M}$ - $20\mu\text{M}$ - $100\mu\text{M}$ - $200\mu\text{M}$)

CÀLCUL DE LA QUANTITAT D'ATRA I RPMI A DIFERENTS CONCENTRACIONS

- a) ATRA $200\mu\text{M}$ (1:500 STOCK) → $1\mu\text{L}$ STOCK en $499\mu\text{L}$ RPMI
- b) ATRA $100\mu\text{M}$ (1:1000 STOCK) → $0.5\mu\text{L}$ STOCK en $499.5\mu\text{L}$ RPMI
- c) ATRA $20\mu\text{M}$ (1:10 **a**) → $50\mu\text{L}$ **a** en $450\mu\text{L}$ RPMI
- d) ATRA $10\mu\text{M}$ (1:10 **b**) → $50\mu\text{L}$ **b** en $450\mu\text{L}$ RPMI
- e) ATRA $2\mu\text{M}$ (1:10 **c**) → $50\mu\text{L}$ **c** en $450\mu\text{L}$ RPMI
- f) ATRA $1\mu\text{M}$ (1:10 **d**) → $50\mu\text{L}$ **d** en $450\mu\text{L}$ RPMI
- g) ATRA $0.2\mu\text{M}$ (1:10 **e**) → $50\mu\text{L}$ **e** en $450\mu\text{L}$ RPMI
- h) ATRA $0.1\mu\text{M}$ (1:10 **f**) → $50\mu\text{L}$ **f** en $450\mu\text{L}$ RPMI
- i) ATRA $0.02\mu\text{M}$ (1:10 **g**) → $50\mu\text{L}$ **g** en $450\mu\text{L}$ RPMI

*Les lletres fan referència a l'extracció de la solució més concentrada per tal de fer la més diluïda, igual que hem fet al principi amb la a) i la b), que han estat directament extretes de la solució d'ATRA en STOCK.

PREPARACIÓ DEL BANC DE DILUCIONS AMB CISPLATÍ

Ens trobem amb una solució STOCK Cis-Pt a 3.33mM ($3330\mu\text{M}$)

Per tal de preparar els pouets, hem de saber el volum inicial necessari (tenint en compte que volem un volum final de $500\mu\text{L}$ en cada concentració):

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_o \times C_o \\ 500\mu\text{L} \times 2\text{mM} &= V_o \times 3.33\text{mM} \\ V_o &= \frac{500 \times 2}{3.33} = 300\mu\text{L} \end{aligned}$$

Igual que amb l'ATRA, vam seleccionar 9 concentracions per fer l'experiment:

- (2mM-1mM-0.2mM-0.1mM-20µM-10µM-2µM-1µM-0.2µM)

CÀLCUL DE LA QUANTITAT DE Cis-Pt I RPMI A DIFERENTS CONCENTRACIONS

- a) Cis-Pt a 2mM → 300µL STOCK en 200µL RPMI
- b) Cis-Pt a 1mM → 150µL STOCK en 350µL RPMI
- c) Cis-Pt a 0.2mM → 50µL **a)** en 450µL RPMI
- d) Cis-Pt a 0.1mM → 50µL **b)** en 450µL RPMI
- e) Cis-Pt a 20µM → 50µL **c)** en 450µL RPMI
- f) Cis-Pt a 10µM → 50µL **d)** en 450µL RPMI
- g) Cis-Pt a 2µM → 50µL **e)** en 450µL RPMI
- h) Cis-Pt a 1µM → 50µL **f)** en 450µL RPMI
- i) Cis-Pt a 0.2µM → 50µL **g)** en 450µL RPMI

*Com a condicions inicials, igual que amb els pouets amb ATRA, volem una dilució de 500µL en total (també hem anat jugant amb les quantitats de solut i dissolvent (RPMI) per tal de completar aquests 500µL).

EXPERIMENT 1:

PREPARACIÓ DE CÈL·LULES

Partim del recompte cel·lular de l'experiment 2, amb els següents resultats:

- Cèl·lules vives → $\frac{101+85+106}{3} = 97.33 \times 20000 = 1\,946\,666.67 \text{ cèl. lules/mL}$
- Cèl·lules mortes → $\frac{15+12+10}{3} = 12.33 \times 20000 = 246\,666.667 \text{ cèl. lules/mL}$
- % de viabilitat → $\frac{1946666.97}{1946666.97+246666.667} \times 100 = 88.75\%$

Per tal de comparar l'efecte que produeix l'ATRA a les cèl·lules leucèmiques, es prepararan dos flascons de mida petita en els quals hi haurà el mateix nombre de cèl·lules inicials (igualació de condicions).

Es van diluir 1.25mL de les cèl·lules del primer recompte (succionades amb la pipeta) en 5mL totals de medi de cultiu RPMI. Fent aquesta dilució, ens trobem amb unes cèl·lules quatre vegades menys concentrades que anteriorment (condicions inicials).

CONDICIONS INICIALS:

$$486\,666.67 \frac{\text{cèl} \cdot \text{lules vives}}{\text{mL}} \times 5\text{mL de cultiu} = 2\,433\,333.35 \text{ cèl. lules vives totals}$$

$$61\,666.67 \frac{\text{cèl} \cdot \text{lules mortes}}{\text{mL}} \times 5\text{mL de cultiu} = 308\,333.35 \text{ cèl. lules mortes totals}$$

Al flascó control "HL-60 Ø" no es va posar res més que les cèl·lules. En canvi, al flascó del tractament "ATRA 1µM" es va afegir el tractament en el moment inicial.

CÀLCULS ADICIÓ ATRA

ATRA STOCK 100µM → Concentració de treball d'1µM

$$1\mu\text{M} \times 5\text{mL} = 100\mu\text{M} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{5\text{mL}}{100} = 0.05\text{mL} = 50\mu\text{L}$$

Per tant, vam haver d'afegir 50µL de ATRA en els 5mL de cultiu.

Tot seguit de la preparació dels flascons, vam procedir a incubar les cèl·lules a unes condicions de 37° i 5% de CO2 durant un total de 7 dies.

Durant els següents 7 dies, es recollirà una mostra d'ambdós cultius i es realitzaran els corresponents recomptes cel·lulars.

24/09/2020 Segon dia de laboratori

EXPERIMENT 1:

Vam realitzar el segon recompte cel·lular (24h). Vam extreure una petita mostra de cada flascó, per així veure com havia proliferat cada cultiu. Multipliquem el nombre de cèl·lules per 5 perquè en aquest cas, en diluïm 5mL.

∅ ATRA 24h

$$\text{Cèl. lules vives} \rightarrow \frac{146}{4} = 36.5 \times 20\,000 = 730\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 5\text{mL} = 3\,650\,000 \text{ cèl. lules}$$

$$\text{Cèl. lules mortes} \rightarrow \frac{22}{4} = 5.5 \times 20\,000 = 110\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 5\text{mL} = 550\,000 \text{ cèl. lules}$$

ATRA 24h

$$\text{Cèl. lules vives} \rightarrow \frac{130}{4} = 32.5 \times 20\,000 = 650\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 5\text{mL} = 3\,250\,000 \text{ cèl. lules}$$

$$\text{Cèl. lules mortes} \rightarrow \frac{24}{4} = 6 \times 20\,000 = 120\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 5\text{mL} = 600\,000 \text{ cèl. lules}$$

25/09/2020: Tercer dia de laboratori - 48 h d'inici dels experiments

EXPERIMENT 2:

Vam deixar a les cèl·lules un marge de 48 hores de creixement. Tot just van passar les 48 hores, vam prosseguir a afegir-hi el reactiu de viabilitat Presto-Blue.

Passades unes tres hores vam anar a comprovar la degradació de color que presentaven els pouets i vam considerar que ja era més que suficient per a extreure'n les nostres conclusions (quan apareixen mostres rosades, vol dir que el reactiu s'ha degradat més i per tant el nombre cel·lular és major).

Seguidament, per extreure dades quantificables vam mesurar l'absorbència (absorció de llum en una longitud d'ona concreta a través d'una mostra) amb un espectrofotòmetre. Vam processar les dades amb el programa GraphPad Prism 6.0.

FUNCIONAMENT ESPECTOFOTÒMETRE

L'espectrofotòmetre és un instrument que funciona per espectrofotometria UV-Visible que ens permet determinar la concentració d'un compost en una solució.

Amb l'espectrofotòmetre es pot seleccionar la longitud d'ona de la llum que passa per la solució i mesurar així la quantitat de llum que absorbeix, atès la capacitat de les seves molècules per absorbir radiacions. Aquesta absorció de radiació (espectroscòpia d'absorció) es mesurarà en funció de la freqüència o longitud d'ona que presenti la mostra amb el reactiu.

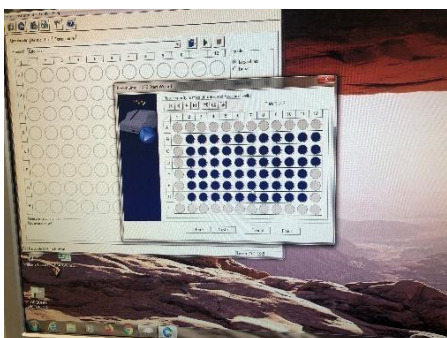


Figura 3: Funcionament de l'espectrofotòmetre

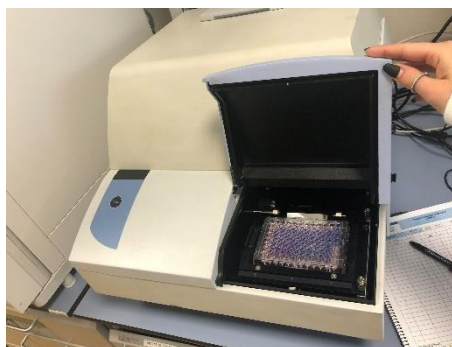
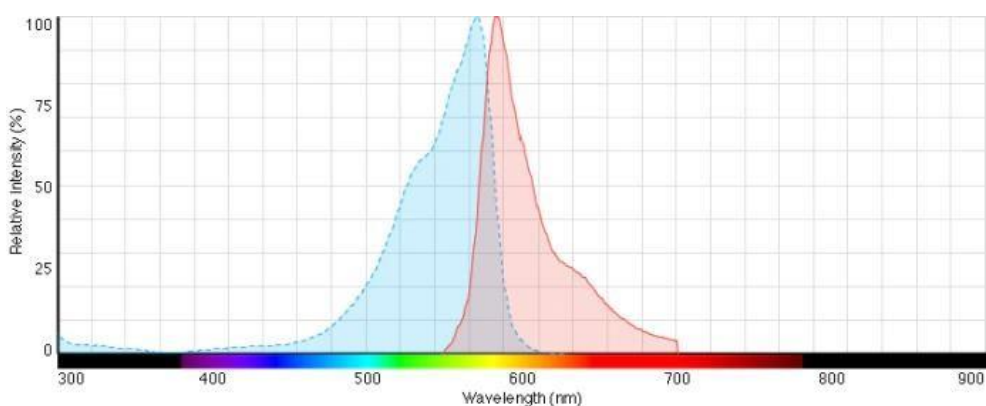


Figura 2: Espectrofotòmetre

MÈTODE DE FUNCIONAMENT DE PRESTO-BLUE

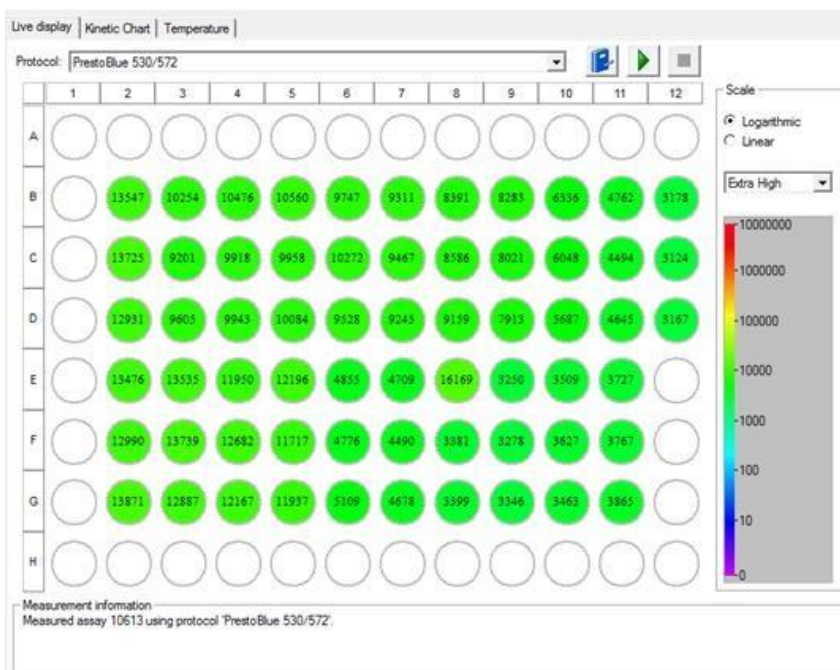
És una solució que actua com a un reactiu iniciador de variabilitat cel·lular que mesura el metabolisme cel·lular gràcies al seu poder de reducció de les cèl·lules vives i així mesurar quantitativament la proliferació cel·lular. Aquest actua reduint l'ambient de la cèl·lula viable (guany d'electrons) tot expressant un canvi cromàtic gradual de blau a rosa amb alta fluorescència que es produeix quan la cèl·lula degrada el reactiu. És a dir, les mostres que presentin un color més rosaci voldrà dir que contenen un major nombre de cèl·lules vives; per l'altra banda, les mostres amb major nombre de cèl·lules mortes (mostra medi de cultiu la més notable) presentaran colors molt més blavosos.



Il·lustració 2: Absorbència Presto-blue (segons la longitud d'ona en nm)

ANÀLISI D'ABSORÈNCIA

Dades obtingudes de l'espectrofotòmetre:



Il·lustració 3: Absorbència Presto-blue de les diferents mostres. Measurement information.

L'eficàcia dels agents de diferenciació en la cura de l'APL

[Compost] en uM	0	0,01	0,05	0,1	0,5	1	5	10	50	100	MEDI CULTIU
	13547	10254	10476	10560	9747	9311	8391	8283	6336	4762	3178
	13725	9201	9918	9958	10272	9467	8586	8021	6048	4494	3124
	12931	9605	9943	10084	9528	9245	9159	7913	5687	4645	3167
	13476	13535	11950	12196	4855	4709	16169	3250	3509	3727	
	12990	13739	12682	11717	4776	4490	3381	3278	3627	3767	
	13871	12887	12167	11937	5109	4678	3399	3346	3463	3865	
[Compost] en uM	0	0,1	0,5	1	5	10	50	100	500	1000	

Taula 1: Absorbància de les cèl·lules en presència d'ATRA (rosa) i Cis-Pt (blau) a diferents concentracions. Representació exacta de la placa de 96 pouets. Dades obtingudes de l'espectrofotòmetre.

Abans de processar les dades obtingudes de l'espectrofotòmetre amb el programa GraphPad

Prism 6.0 es van haver de realitzar els següents càlculs previs:

$$\text{Mitjana} = \frac{\sum \text{dades espectrofotòmetre}}{n^{\circ} \text{ dades}}$$

$$\% \text{ no tractat} = \frac{x_{\text{mostra}} - \text{mostra medi de cultiu}}{\text{mostra } 0\mu\text{M} - \text{mostra medi de cultiu}} * 100$$

$$\text{Error estàndard} = \frac{\text{desviació estàndard (de dades)}}{\text{arrel } (n^{\circ} \text{ dades})}$$

$$\% \text{ error} = \frac{\text{error estàndard} \times \% \text{ no tractat}}{\text{mitjana}}$$

$$\text{Mitjana} = \frac{10254 + 9201 + 9605}{3} = 9687$$

$$\% \text{ no tractat} = \frac{9687 - 3156}{13401 - 3156} * 100 = 63.74\%$$

$$\text{Error estàndard} = \frac{531.23 \text{ (calculat amb excel)}}{\sqrt{3}} = 306.71$$

$$\% \text{ error} = \frac{306.71 * 63.74}{9687} = 2.02\%$$

13401		9687	10112	10201	9849	9341	8712	8072	6024	4634	3156					
100,00		63,74	67,90	68,76	65,33	60,37	54,23	47,99	27,99	14,42						
240,55	✔	✔	306,71	181,98	183,31	220,75	65,82	230,48	109,85	187,74	77,57					
1,80			2,02	1,22	1,24	1,46	0,43	1,43	0,65	0,87	0,24					
13 Mitjana	12266	✔	11950	✔	4913	✔	4626	✔	3390	✔	3291	✔	3533	✔	3786	✔
10 % no tractat	88,54		85,46		17,08		14,28		2,27		1,31		3,66		6,12	
25 Error estàndard	217,07	✔	138,43	✔	100,46	✔	68,42	✔	9,00	✔	28,50	✔	48,84	✔	40,99	✔
1,89	1,91	1,57	0,99	0,35	0,21	0,01	0,01	0,05	0,07							

Taula 2: Càlculs previs al programa GraphPad Prism 6.0 (mitjana, % no tractat, error estàndard, % error) de les dades obtingudes amb l'espectrofotòmetre.

EXPERIMENT 1:

Vam realitzar el nostre tercer recompte cel·lular, amb les mateixes condicions que a les de l'anàlisi de les primeres 24h:

Ø ATRA 48h

$$\text{Cèl. lules vives} \rightarrow \frac{322}{4} = 80.5 \times 20\,000 = 1\,610\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 5\text{mL} = 8\,050\,000 \text{cèl. lules}$$

$$\text{Cèl. lules mortes} \rightarrow \frac{66}{4} = 16.5 \times 20\,000 = 330\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 5\text{mL} = 1\,650\,000 \text{cèl. lules}$$

ATRA 48h

$$\text{Cèl. lules vives} \rightarrow \frac{200}{4} = 50 \times 20\,000 = 1\,000\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 5\text{mL} = 5\,000\,000 \text{cèl. lules}$$

$$\text{Cèl. lules mortes} \rightarrow \frac{33}{4} = 8.25 \times 20\,000 = 165\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 5\text{mL} = 825\,000 \text{cèl. lules}$$

EXPERIMENT 3:

Primer de tot, per a la realització del tercer experiment, es van sembrar les cèl·lules HL-60 en el medi de cultiu corresponent (mateix procediment que a l'inici dels experiments).

Breument, es van sembrar 100,000 cèl·lules/mL a una placa de 6 pouets. Es van testar a tres concentracions diferents d'ATRA: 1µM per simular l'efecte del medicament i 100µM per veure diferències significatives a la seva morfologia i 10µM com a valor de transició.

NOTA: També es realitzarà l'anàlisi morfològic de les cèl·lules amb presència de cisplatí a concentracions de 0.1µM, 1µM i 10µM que servirà com a grup control.

28/09/2020: Quart dia de laboratori - 120 h d'inici dels experiments

EXPERIMENT 1:

Passades les 120h del primer recompte (condicions inicials) de les cèl·lules, vam realitzar el quart recompte cel·lular. En aquest cas, canvien les condicions, diluïm 20mL (5mL en 15mL, total de 20mL), per tant vam multiplicar el nombre de cèl·lules/mL per 20.

30/09/2020: Cinquè dia de laboratori - 168 h d'inici dels experiments

$$\text{Cèl. lules vives} \rightarrow \frac{265}{4} = 66.25 \times 20\,000 = 1\,325\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 20\text{mL} = 26\,500\,000 \text{ cèl. lules}$$

$$\text{Cèl. lules mortes} \rightarrow \frac{24}{4} = 6 \times 20\,000 = 120\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 20\text{mL} = 2\,400\,000 \text{ cèl. lules}$$

ATRA 120h

$$\text{Cèl. lules vives} \rightarrow \frac{210}{4} = 52.5 \times 20\,000 = 1\,050\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 20\text{mL} = 21\,000\,000 \text{ cèl. lules}$$

$$\text{Cèl. lules mortes} \rightarrow \frac{20}{4} = 5 \times 20\,000 = 100\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 20\text{mL} = 2\,000\,000 \text{ cèl. lules}$$

EXPERIMENT 1:

Finalment, vam realitzar l'últim recompte cel·lular al setè dia des de l'inici de l'experiment. En aquest cas, també varien les condicions atès que treballarem amb una dilució de 100mL totals, per tant vam multiplicar el nombre de cèl·lules/mL x100.

∅ ATRA 168h

$$\text{Cèl. lules vives} \rightarrow \frac{110}{4} = 27.5 \times 20\,000 = 550\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 100\text{mL} = 55\,000\,000 \text{ cèl. lules}$$

$$\text{Cèl. lules mortes} \rightarrow \frac{12}{4} = 3 \times 20\,000 = 60\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 100\text{mL} = 6\,000\,000 \text{ cèl. lules}$$

ATRA 168h

$$\text{Cèl. lules vives} \rightarrow \frac{87}{4} = 21.75 \times 20\,000 = 435\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 100\text{mL} = 43\,500\,000 \text{ cèl. lules}$$

$$\text{Cèl. lules mortes} \rightarrow \frac{7}{4} = 1.75 \times 20\,000 = 35\,000 \frac{\text{cel. lules}}{\text{mL}} \times 100\text{mL} = 3\,500\,000 \text{ cèl. lules}$$

19/10/2020: Cinquè dia de laboratori - 480h d'inici dels experiments

EXPERIMENT 3:

Després d'haver sembrat les cèl·lules HL-60 el tercer dia de laboratori, vam començar amb la realització de la tinció per hematoxilina-eosina.

Prèviament a la tinció, es va haver de fer un recompte cel·lular de les cèl·lules HL-60 (farem un recompte per duplicat per tal d'assegurar resultats més fiables i seguidament es realitzarà la corresponent mitjana). El recompte cel·lular es procedirà exactament igual que tots els altres, afegint 10 µL de reactiu Trypan Blue a les cèl·lules per tal que es puguin veure a la càmera de Neubauer.

Aquestes cèl·lules van romandre congelades durant 20 dies atès que es van cultivar el quart dia de laboratori i sense congelació, no s'haguessin mantingut amb vida fins al cinquè.

RECOMPTE CEL·LULAR

$$\text{Cèl·lules control} \rightarrow \frac{214+293}{2} \cong 254 \text{ cèl. lules}$$

$$\text{Cèl·lules 1uM ATRA} \rightarrow \frac{249+239}{2} \cong 244 \text{ cèl. lules}$$

$$\text{Cèl·lules 10uM ATRA} \rightarrow \frac{202+206}{2} \cong 204 \text{ cèl. lules}$$

FIXACIÓ DE LES CEL·LULEES EN SUSPENSÍO

Per tal de realitzar l'estudi morfològic de les cèl·lules amb presència d'ATRA (també amb cisplatí de les cèl·lules control) i determinar la seva diferenciació cel·lular, aquestes no poden trobar-se en suspensió, s'han de fixar.

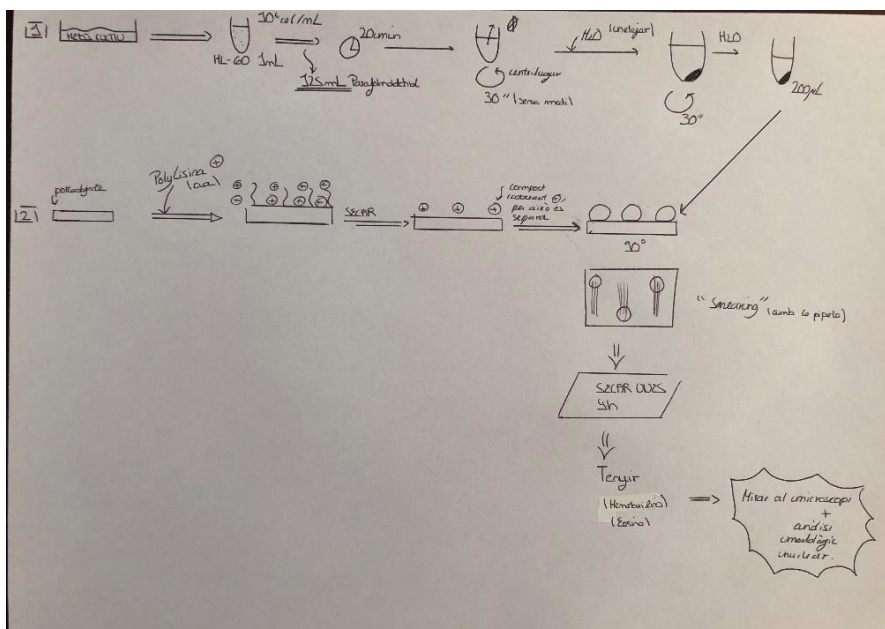
Segons s'indica a l'*ICC Cell Smear Protocol for Suspension Cells*, s'han d'ajustar les cèl·lules obtingudes del recompte cel·lular a una densitat d' 1×10^6 cèl·lules/mL i fixar-les afegint paraformaldehid al 4% (1.5uL en 1uL) directament al cultiu cel·lular.

Seguidament vam deixar les cèl·lules en repòs durant 20 minuts a temperatura ambient per tal que el paraformaldehid s'adhereixi bé al substrat.

Passats aquests 20 minuts, vam pipetejar tot l'excés i es va filtrar amb aigua pura. Vam centrifugar la solució a màxima velocitat per tal de separar les cèl·lules totalment del medi aquós (alcohol) i que aquestes es trobin ja llestes per a afegir-hi la Poly-Lisina, que gràcies a la seva càrrega positiva permetrà una total separació i aïllament de les cèl·lules (tot això al cobreobjectes).

Així doncs, vam untar la suspensió sobre la superfície del cobreobjectes amb molt de compte, mirant de no trencar-la, amb la punta d'una pipeta. Per tal que s'acabés d'evaporar totalment el líquid, vam col·locar el cobreobjectes amb la suspensió a una planxa calenta a baixa temperatura (mirar que el cobreobjectes no presenti cap fragmentació ni ruptura). Deixar que s'eixugui durant unes 2-4 hores i ja es podrà procedir al tintatge.

És de suma importància comprovar que no hi hagi cap cristall de sal dipositat al cobreobjectes, ja que això podrà afectar a l'observació de les cèl·lules al microscopi, atès que el cristall es presentaria com a un tipus de "taca".



Il·lustració 4: Esquema previ a la tinció

TINCIÓ DE CÈL·LULES PER HEMATOAXINA I EOSINA

Un cop les cèl·lules ja es trobaven en suspensió, es va realitzar el procés essencial per a poder fer una anàlisi morfològica, la tinció de cèl·lules.

Els tints emprats són l'hematoxilina i l'eosina, que ens permetran poder visualitzar tant el nucli com el citosol de les cèl·lules.

TINCIÓ PER HEMATOXILINA

1. Vam submergir les cèl·lules dins el cobreobjectes amb aigua destil·lada. Amb 3mL d'aigua ja és més que suficient. Agitar a l'agitador a velocitat mitja durant 5 minuts. Això ho fem per tal d'hidratar les cèl·lules i que aquestes acceptin perfectament els dos tints, ja que aquests s'hi adhireixen millor si les cèl·lules es troben hidratades.
2. Un cop les cèl·lules ja s'han hidratat, treure l'excés d'aigua (aigua que fa que el cobreobjectes estigui enfonsat). Podrem observar que només hi queda aigua a la zona on es troben les cèl·lules.
3. Afegir el 3mL (fins a submergir) d'hematoxilina. Agitar a l'agitador durant 2 minuts a la mateixa velocitat.
4. Tornar a succionar el tint amb la succionadora.

5. Per tal d'acabar de netejar l'excés de tint de l'entorn de les cèl·lules, vam tornar a afegir 3mL d'aigua destil·lada, però aquest cop la vam succionar ràpidament, sense capmena d'agitació.
6. Seguidament, vam afegir 3mL d'aigua d'aixeta i la vam deixar agitar a l'agitador durant 5 minuts. L'aigua d'aixeta té unes propietats que fan que l'hematoxilina s'adhereixi bé a les cèl·lules i es pugui visualitzar perfectament el nucli d'aquestes al microscopi.
7. Sucar 10 cops la mostra en àcid etanoic.
8. Tornar a succionar la mostra.
9. Afegir 3mL d'aigua d'aixeta, deixar agitar durant 1 minut. Repetir el procés dos cops per tal de treure'n el màxim rendiment del tint,
10. Finalment, afegir de nou 3mL d'aigua destil·lada. Agitar durant 2 minuts i succionar totalment l'aigua restant.

TINCIÓ PER EOSINA

Un cop ja teníem l'hematoxilina ben adherida a les cèl·lules, vam prosseguir a afegir l'eosina, que ens permetrà finalment poder visualitzar el citosol de les cèl·lules.

1. Afegir 3mL d'etanol al 95% dins el pouet.
2. Submergir el cobreobjectes dins l'eosina durant 30 segons. Seguidament, agitar a l'agitador durant 5 minuts i extreure'n l'excés. Repetir el procés 3 cops, degut a la dificultat que presenta l'eosina a l'hora de netejar-se.

Com podem observar, a la tinció per eosina no s'utilitza aigua per extreure'n l'excés com es fa en la tinció per hematoxilina; utilitzem alcohol (etanol). Com que aquest tint té caràcter hidròfob, no accepta l'aigua i aquesta no és apta per a la seva neteja.

3. Repetir exactament el procés anterior (quantitats de dissolvent, temps i repeticions) però aquest cop amb etanol al 100% per tal de poder acabar d'extreure el poc tint que encara es resisteix.

MUNTATGE DEL COBREOBJECTES

1. Agafar tres portaobjectes, un per cada una de les dues mostres de les diferents concentracions. Afegir 6 gotes de Vectashield (és un oli amb índex de refracció 1, de manera que no hi haurà cap desviació de la llum procedent del microscopi) per tal que hi hagi una capa líquida entre el cobreobjectes i el portaobjectes.
2. Muntar a sobre els 6 cobreobjectes amb les seves cèl·lules seques ja tintades pels dos tints.
3. Afegir esmalt d'ungles a les vores del cobreobjectes de manera que aquest s'hi

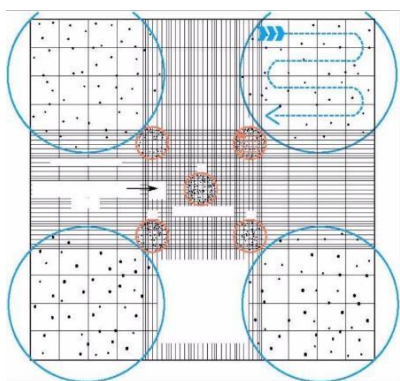
adhereixi perfectament i no sigui mogut per l'oli.

28/12/2020: Sisè dia de laboratori

L'anàlisi morfològica del tercer experiment no es va poder realitzar el cinquè dia de laboratori perquè es va fer servir una hematoxilina que no estava en bones condicions. Així doncs, es va tornar a repetir tot l'experiment.

RECOMPTE CEL·LULAR (breu explicació de com es realitza el recompte cel·lular, tècnica emprada en tots els tres experiments).

Es va agafar una mostra de cultiu de les cèl·lules en suspensió, que es trobaven a l'incubador a 37°C. Es va fer una dilució 1:2 amb el reactiu de viabilitat Trypan Blue (es va pipetejar 1mL d'ambdós compostos que van ser afegits al tub Eppendorf corresponen per tal de poder generar la mescla). Seguidament, es va procedir a afegir la 10µL de la mescla a la càmera de Neubauer. Finalment, mitjançant un microscopi invertit el qual ens permet visualitzar cèl·lules, es va realitzar el recompte cel·lular. La càmera de Neubauer, que ens permet comptar cèl·lules en suspensió (medi líquid), consta de 4 cel·les diferenciades cadascuna dividida en 16 quadrants els quals s'han de comptabilitzar independentment seguint un ordre, i així evitar errors.



Esquema del funcionament de la càmera de Neubauer Font: <https://youtu.be/oiEulNul3oU>

RESULTATS DEL RECOMPTE CEL·LULAR

Mitjana de 75 cèl·lules per cel·la:

$$\text{Cèl. lules vives} \rightarrow \frac{300}{4} = 75 \times 20\,000 = 1\,500\,000 \frac{\text{cèl.lules}}{\text{mL}}$$

Seguidament, es va procedir a sembrar les cèl·lules a la placa de 12 pouets (consultar imatge* a la galeria d'imatges al laboratori).

Concentració cèl·lules HL-60:

150 000 cèl·lules/mL d'RPMI

Concentració ATRA:

- ATRA a 1 μ M
- ATRA a 10 μ M
- ATRA a 100 μ M

Concentració Cis-Pt:

Es va decidir realitzar també una anàlisi morfològica de les cèl·lules en presència de cisplatí, i així visualitzar també l'alta mort cel·lular que genera un medicament quimioterapèutic. Com que a l'experiment 1 es va comprovar que el cisplatí començava a ser altament letal per a les cèl·lules a 1 μ M, les concentracions escollides són les següents:

- Cis-Pt a 0.1 μ M
- Cis-Pt a 1 μ M
- Cis-Pt a 10 μ M

Vam sembrar 125 000 cèl·lules en 1mL d'RPMI per pouet (per tal que en tres dies hi hagi un milió de cèl·lules/mL, ja que les cèl·lules proliferen molt ràpidament). Seguidament, es van pipetejar els compostos en les seves corresponents concentracions i es van afegir als pouets. Vam deixar la placa incubant a 37°C durant 3 dies.

31/12/2020: Setè dia de laboratori

Es va procedir a realitzar la fixació de les cèl·lules i la tinció per Hematoxilina-Eosina en les mateixes condicions que el cinquè dia de laboratori. Procediment exactament igual però amb el tint en bones condicions.

També es va realitzar el muntatge del cobreobjectes amb el mateix mètode.

2/01/2020: Vuitè dia de laboratori

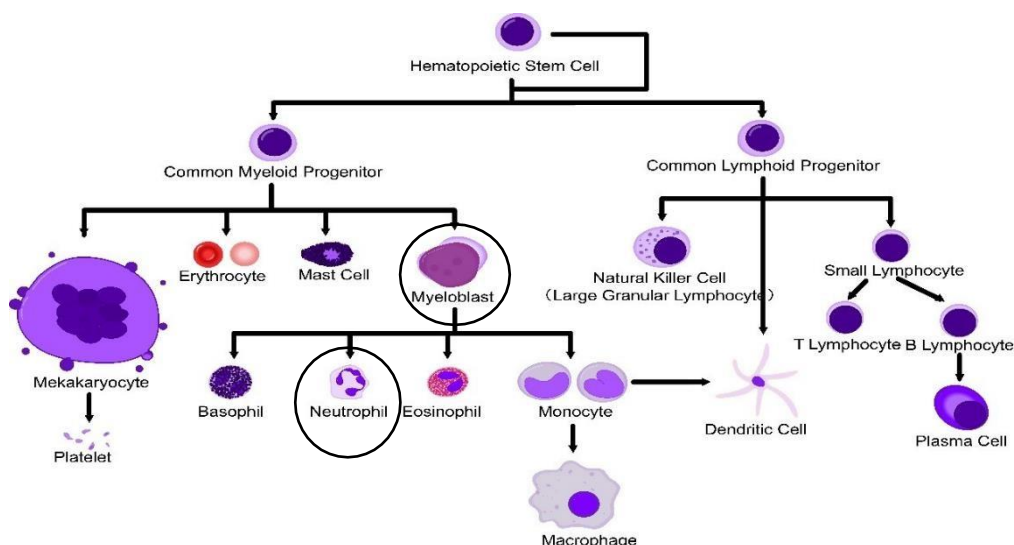
EL vuitè, i últim dia de laboratori, es va realitzar l'anàlisi morfològic definitiu i l'entrevista al'equip d'investigació.

ANÀLISI MORFOLÒGICA

Finalment, un cop les cèl·lules tintades ja estaven totalment seques i adherides perfectament al cobreobjectes, es va procedir a la realització de l'anàlisi morfològic cel·lular que ens determinarà si ATRA ha induït a la diferenciació cel·lular.

Si ATRA realment ha induït a la diferenciació cel·lular dels promielòcits de la línia cel·lular HL-60 , hauria de predominar el nombre de cèl·lules mieloides madures.

Per tal d'identificar l'estadi d'evolució (i tipus cel·lular) , s'ha de tenir en compte:



Il·lustració 4: Sistema hematopoètic cel·lular. Llinatge cel·lular.

GLÒBULS VERMELLS	MONÒCITS
Citoplasma: Rosa ataronjat a rosa	Citoplasma: Gris-blau pàl·lid Nucli: Blau-lila profund
Limfòcits	NEUTRÒFILS
Citoplasma: Blau cel Nucli: Blau-violeta profund	Citoplasma: Rosa pàl·lid Nucli: Blau-violeta profund Grànuls: Violeta a lila
EOSINÒFILS	BASÒFILS
Grànuls: Taronja a rosa	Grànuls: Blau profund a violeta

A causa de diversos problemes produïts durant la tinció per Hematoxilina-Eosina, que tot i romandre desconeguts, poden haver estat deguts a una mala condició dels tints (ja que es vaseguir el protocol a la perfecció), no es va poder realitzar l'anàlisi morfològica tan específica desitjada. Les tincions no es van produir correctament, i això va impossibilitar identificar amb total seguretat l'etapa de maduresa que havien adquirit els promielòcits.

Això no obstant, si que es van apreciar canvis morfològics significatius en les cèl·lules tractades amb ATRA, que en canvi, no van presentar les cèl·lules tractades amb cisplatí. A més, també es va poder observar una disminució del nombre de cèl·lules vives a mesura que s'augmentaven les

concentracions, i possibles morts cel·lulars.

Així doncs, finalitzo la meva estada al laboratori amb molt bones sensacions. Aprenent un munt de tècniques, processos, protocols i mètodes de funcionament de molts processos cel·lulars.

GALERIA D'IMATGES AL LABORATORI



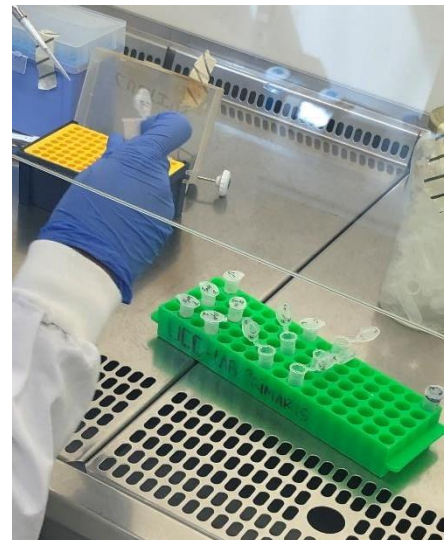
Medi de cultiu a temperatura òptima



Medi de cultiu emprat en tots el experiments



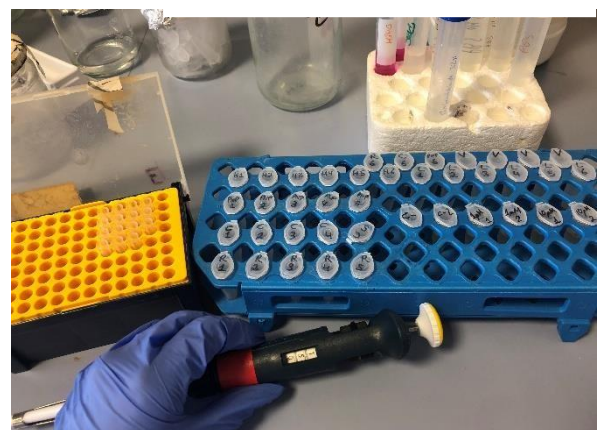
Preparació del banc de dilucions de l'experiment 2 a la cabina de seguretat.



Preparació del banc de dilucions de l'experiment 2. Agregació d'ATRA dins els tubs de microcentrífuga a diferents concentracions.



Compost ATRA dins el tub de microcentrífuga.

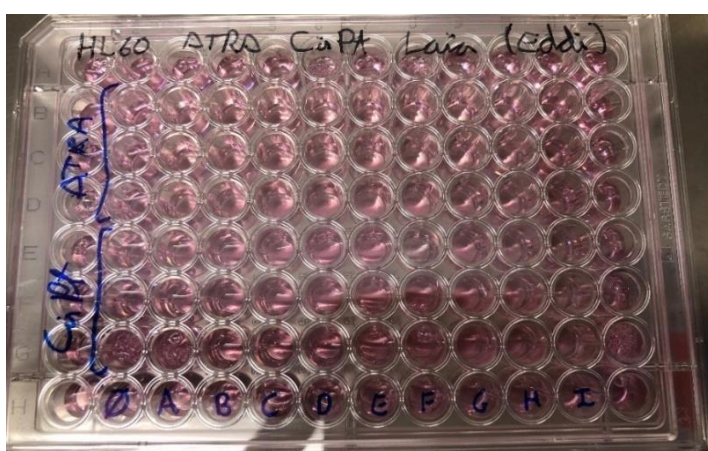


Tubs de microcentrífuga amb els diferents compostos de l'experiment 2 afegits.

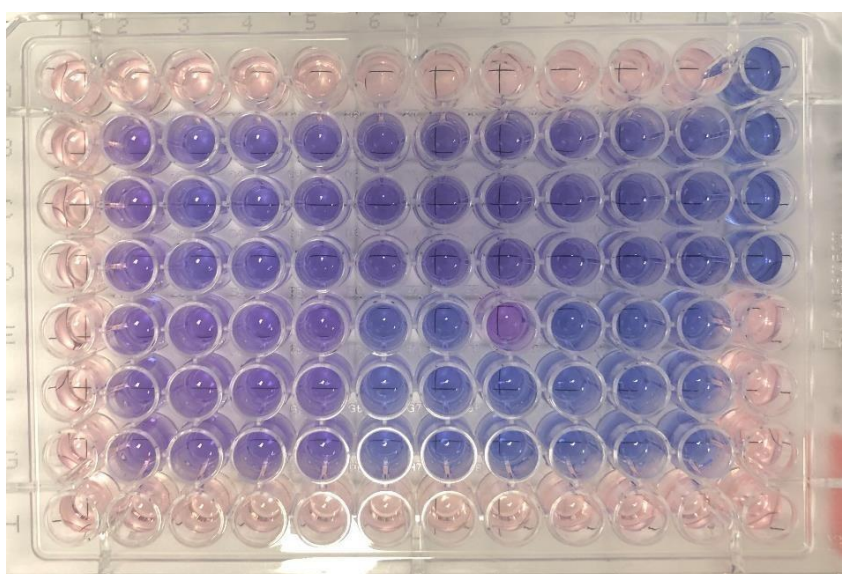
L'eficàcia dels agents de diferenciació en la cura de l'APL



Banc de dilucions de l'experiment 2 amb el medi de cultiu RPMI afegit.

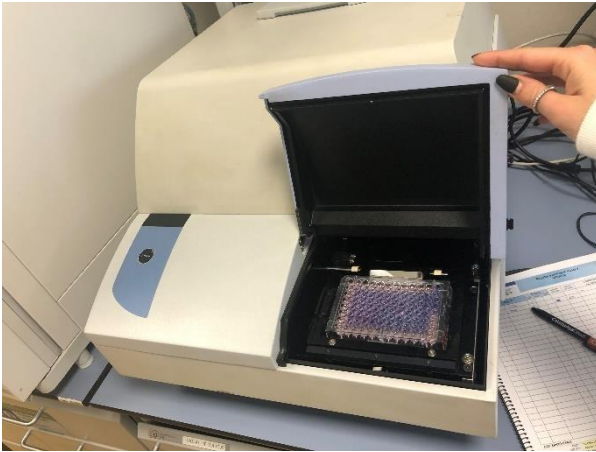


Banc de dilucions de l'experiment 2 amb el medi de cultiu RPMI i els dos tractaments(ATRA i Cis-Pt) afegits. Adhesió del reactiu de viabilitat PrestoBlue.

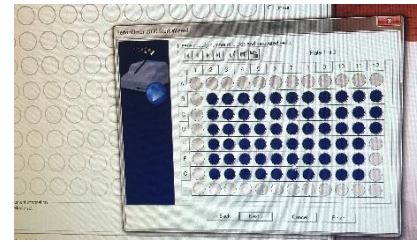


Banc de dilucions de l'experiment 1 un cop ha reaccionat amb PrestoBlue. Canvi de color blavós. A mesura que la concentració de medicament augmenta, també ho fa l'intensitat del color blavós. Això és degut a que hi ha un nombre de cèl·lules vives inferior, per tant hi ha una major expressió del tint. Color més lilós, més cèl·lules vives, per tant major reacció tint-cèl·lula.

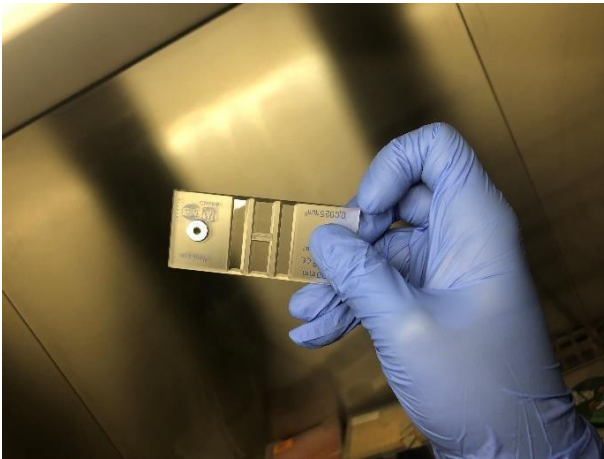
L'eficàcia dels agents de diferenciació en la cura de l'APL



Espectofotòmetre.



*Funcionament informàtic
espectrofotòmetre.*



Càmera de Neubauer.



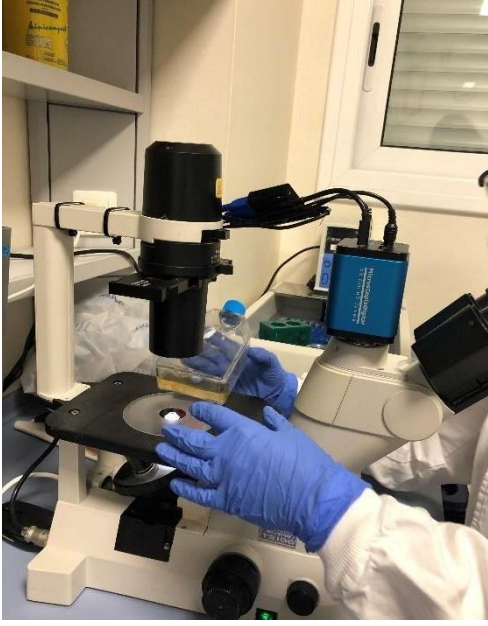
Pipetes serològiques.



Micropipetes.



Mostra adherida a la càmera de Neubauer.



Microscopi electrònic. Observació de les cèl·lules en suspensió de l'experiment 1.



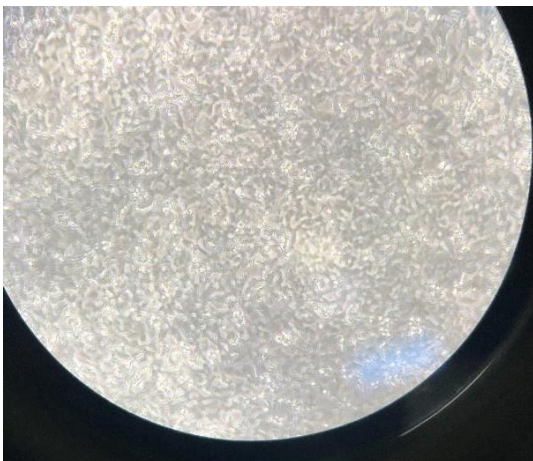
Microscopi electrònic.



Comptador manual de cèl·lules.



Flasc amb cèl·lules en suspensió.

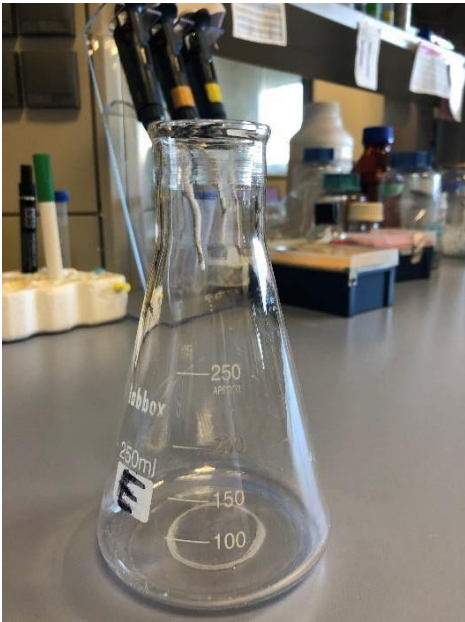


Visió microscòpica de les cèl·lules en suspensió sense cap compost afegit



Incubador.

L'eficàcia dels agents de diferenciació en la cura de l'APL



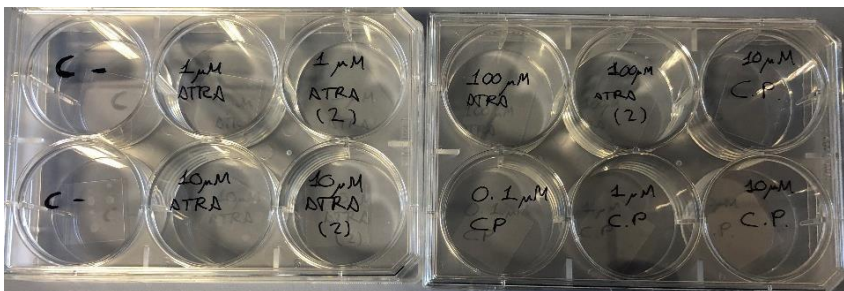
Matràs Erlenmeyer.



Tubs Falcon.



Congelador.



Plaques de 6 pouets (12 en total) de l'experiment 3.

L'eficàcia dels agents de diferenciació en la cura de l'APL



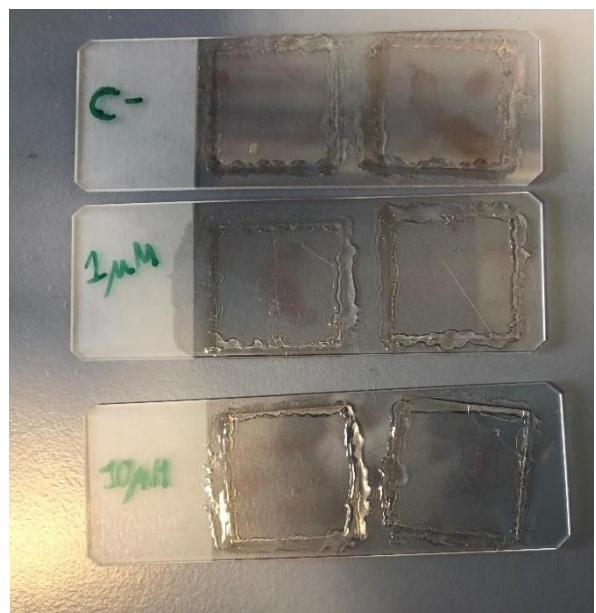
Microcentrifuga de sobretaula.



Tubs de microcentrifuga.



Compostos tinció per Hematoxilina-Eosina.



Mostres del primer intent de l'anàlisi morfològica.

L'eficàcia dels agents de diferenciació en la cura de l'APL



Mostres del segon intent de l'anàlisi morfològica.

7.ANEX 2: GLOSSARI

CONCEPTES

Definicions extretes de l'enciclopèdia.cat <https://www.enciclopedia.cat/> i de [American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin](#)

- [1] Fisiopatològic: Relatiu o pertanyent a la fisiopatologia, que estudia les funcions alterades d'un organisme emmalaltit.
- [2] Epidemiològic: L'epidemiologia, utilitza els estudis epidemiològics per trobar les causes que determinen la malaltia, o els factors de risc que fan més probable que una persona sigui malalta, i també usa aquests estudis per determinar els factors protectors o terapèutics (com els fàrmacs) que permeten curar la persona o prevenir la malaltia.
- [3] Etiopatogènica: Branca de la medicina que estudia les causes de les malalties i els seus
- [4] mecanismes d'actuació.
- [5] Epigenètica: Part de la biologia que estudia els canvis hereditaris d'expressió genètica que no comporten una modificació de la seqüència d'ADN. Estudia com la història i l'ambient de l'individu influeixen sobre l'expressió dels gens.
- [6] Farmacocinètica: Branca de la farmacologia que estudia les vies d'introducció del fàrmac dins l'organisme, el seu repartiment en el medi interior i la seva distribució en els òrgans, com també l'acció de certs processos vitals sobre la molècula del fàrmac i sobre els metabòlits resultants i llurs vies d'excreció.
- [7] Neoplàsia: Massa anormal de teixit de caràcter tumoral, benigne o maligne.
- [8] Teratoma: Neoplàsia de caràcter benigne o maligne formada per diferents tipus de teixits (cabells, músculs, ossos...).
- [9] Apoptosi: També anomenada mort cel·lular programada, és un mecanisme emprat en organismes pluricel·lulars per eliminar cèl·lules que han estat danyades irreversiblement a l'haver patit d'una mutació o cèl·lules innecessàries durant les primeres etapes de desenvolupament. El procés es dona a terme de forma perfectament controlada per tal de minimitzar el dany de les cèl·lules veïnes. Les cèl·lules que moren per apoptosi s'exposen a un seguit de canvis morfològics que redueixen el seu volum. Per consegüent, la membrana cel·lular s'altera i hi apareixen protuberàncies, que donen lloc a la condensació dels orgànuls cel·lulars. [9] Pendent: En un càncer, el pendent és un tipus de classificació que valora el grau d'anormalitat de les cèl·lules canceroses.

- [10] ICD-O-3: Des de la seva primera publicació el 1976, la Classificació Internacional de Malalties per a Oncologia (ICD-*O) ha estat internacionalment homologada com la classificació definitiva de neoplasmes. Correspon a la tercera edició Editada per Un. Fritz, C. Percy, Un. Jack, K. Shanmugaratnam, L. Sobin, D.m. Parkin i S. Whelan.
- [11] Òrgans limfàtics: Òrgans pertanyents al sistema limfàtic; la melsa, el tim i l'apèndix. El sistema limfàtic és l'encarregat de produir i transportar la limfa. El sistema limfàtic retorna a la sang gran part del plasma sanguini que ha sortit dels capil·lars, transporta i dilueix els greixos absorbits a l'intestí i produeix anticossos.
- [12] Ganglis limfàtics: També coneguts com a nòduls limfàtics, són unes estructures ovalades components del sistema limfàtic que filtren les substàncies que transporta el líquid limfàtic i alhora contenen limfòcits que ajuden a combatre infeccions.
- [13] Promielòcit: Cèl·lula hematopoètica progenitora dels granulòcits (leucòcits especialitzats a combatre infeccions bacterianes) pertanyent al llinatge mioeloid de les cèl·lules sanguínies. Entremig del mieloblast i el mielòcit, es presenta com a un glòbul blanc immadur mancat de funcionalitat.
- [14] Cromatina: Estructura o forma que adopta l'ADN dins el nucli abans de formar-se el cromosoma.
- [15] Anàlisi de citogenètica: Mètode de diagnòstic pel qual s'analitzen les cèl·lules d'una mostra de teixit, sang, medul·la òssia o líquid amniòtic per tal d'identificar qualsevol anomalia estructural o numèrica dels cromosomes.
- [16] Avaluació dels cromosomes: Prova de diagnòstic basada en el cariotipatge, examina (i avalua) la mida, forma i el número dels cromosomes.
- [17] Antigen: Molècula reconeguda com a estranya per l'organisme que es capaç d'induir en
- [18] aquest una resposta immunitària formant anticossos.
- [19] Fenotip: Aparença externa d'un caràcter genètic. En el cas dels agents de diferenciació, aquests permeten a la cèl·lula adquirir un fenotip de caràcter morfològic.
- [20] Metabòlit actiu: Substància que es produeix quan el cos metabolitza un medicament de manera que adquireix propietats farmacològiques.
- [21] : WBCs: White blood cells, leucòcits presents a la sang.
- [22] Citotoxicitat: Qualitat de ser tòxic a cèl·lules. Les cèl·lules del sistema immunitari (limfòcits) presenten aquesta qualitat per a defensar-se contra els agents infecciosos.
- [23] Quimioteràpia citoreductora: Extracció quirúrgica de la major quantitat possible de tumor de manera que s'augmenta la possibilitat que la quimioteràpia i la radioteràpia destrueixin les cèl·lules tumorals.

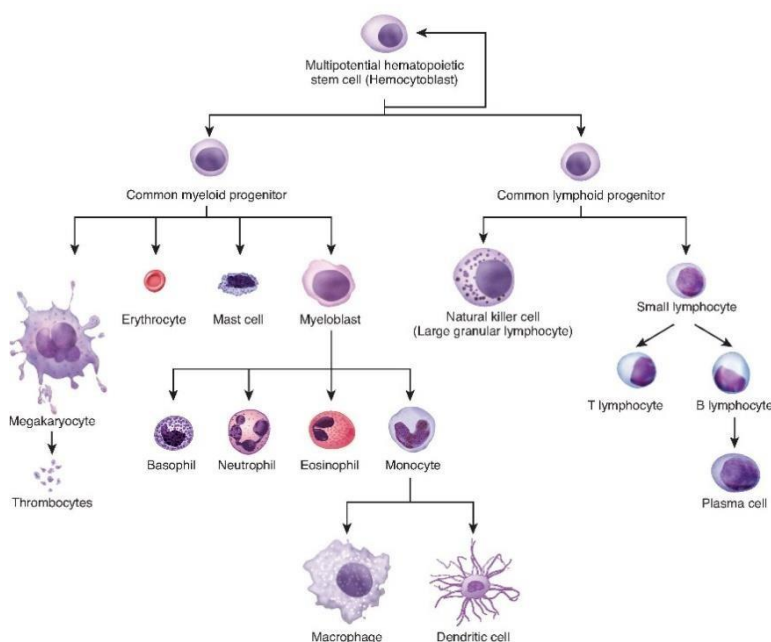
[24] Subcultivar: Consisteix a sembrar cèl·lules d'un cultiu primari i obtenir cultius secundaris que permetran originar línies cel·lulars.

[25] Banc de dilucions: Tècnica d'aïllament i recompte cel·lular. Consisteix en una dilució en sèrie

[26] que consisteix en la reducció progressiva de la concentració d'una substància en dilució.

CLASSIFICACIÓ CEL·LULAR

Il·lustració 5: Hematopoesis, procés de diferenciació de cèl·lules. Cèl·lules de l'APL deixen de madurar al promielòcit, subtipus específic del mieloblast. Font: ©RexxS, Michael Häggström and birdyand Michael Häggström.



Els **hemocitoblasts** són les cèl·lules precursors dels glòbuls sanguinis. És a dir, són les cèl·lules mare dels glòbuls vermells i dels glòbuls blancs en el procés d'hematopoesis. Es troben a la medul·la òssia.

Aquests es divideixen en dos grans tipus, els progenitors mieloides i els progenitors limfoides:

1. **PROGENITORS MIELOIDES** (productors de glòbuls vermells, granulòcits, monòcits i plaquetes).

Els progenitors mieloides es divideixen en 4 subtipus:

- **Megacariòcits:** Cèl·lules de grans dimensions que presenten nombroses ramificacions i més d'un nucli. Aquestes se subdivideixen en:
 - **Trombòcits:** O plaquetes, són petits fragments citoplasmàtics els quals no presenten nucli. Representen una font natural dels factors de creixement i són les encarregades de la formació de coàguls.

- **Eritròcits:** També anomenats glòbuls vermells, són el tipus cel·lular més abundant al cos humà. Són els principals transportadors d'oxigen cap als teixits cel·lulars.
 - **Mastòcits:** Són els encarregats d'interactuar amb bacteris o paràsits enviant senyals al sistema immunitari i constituir així un mecanisme de defensa vers les infeccions.
 - **Mieloblasts:** Cèl·lula immadura pertanyent a la medul·la òssia amb un citoplasma mínim i un gran nucli que es troba en un estat de desenvolupament primari.
 - **Basòfils:** Tipus de leucòcit menys abundant a la sang. Presenta un nucli cel·lular irregular i una mida semblant a la de les cèl·lules segmentades. Com a particularitat presenta una gran capacitat de coloració en contacte amb tints bàsics.
 - **Neutròfils:** Tipus de leucòcit més abundant a la sang. Presenta un període de vida molt curt, des d'hores fins a uns pocs dies. Ajuden el sistema immunitari a combatre infeccions procedents de bacteris i fongs.
 - **Eosinòfils:** Petit leucòcit que defensa l'organisme contra la invasió de microorganismes estranys. Així doncs, es presenten a la sang en altes concentracions durant reaccions al·lèrgiques o en casos d'infeccions derivades de paràsits o bacteris.
 - **Monòcits:** Tipus de leucòcit que s'encarrega de destruir virus, bacteris o fins i tot cèl·lules tumorals. Presenten, per fagocitosis, la capacitat de capturar i digerir partícules que són perilloses per a l'organisme.
 - **Macròfags:** Igual que els monòcits, presenten la capacitat de digerir i destruir substàncies estranyes, restes cel·lulars, microbis o cèl·lules canceroses. Tanmateix, són més especialitzats que els monòcits.
 - **Cèl·lules detrítiques:** Cèl·lules especialitzades característiques del sistema immunitari dels mamífers. La seva funció principal és processar el material genètic procedent de qualsevol antígen (substància desconeguda pel cos que desencadena la formació d'anticossos), tornar-lo cap a la superfície i enviar-lo cap a les altres cèl·lules especialitzades (subtipus vistos anteriorment). Podríem dir que són cèl·lules presentadores de l'antigen, no combaten amb ell directament.
2. **PROGENITORS LIMFOIDES** (procedents del sistema immunitari, però relacionats amb el sistema limfàtic (es troben a la limfa), donen lloc als limfòcits, els quals són els encarregats de crear respostes immunitàries davant de qualsevol microorganisme invasor i així protegir el nostre organisme).
- *No entrarem en detalls atès que l'APL és un tipus de leucèmia que només engloba el llinatge mieloide.

8.ANEX 3: ENTREVISTA AL GRUP D'INVESTIGACIÓ D'ENGINYERIA DE PROTEÏNES I ENZIMOLOGIA

Per finalitzar el treball, després de la realització dels experiments i del cos del treball, vaig decidir realitzar una entrevista al grup d'investigació [REDACTED]

[REDACTED]. L'objectiu de l'entrevista era conèixer una mica més sobre el seu ofici i el seu camp d'estudi i la importància d'aquests en el desenvolupament de nous projectes.

L'entrevistat és [REDACTED], biotecnòleg i mentor de la meua estada al laboratori. Quin és el camp de treball del vostre laboratori?

[REDACTED]: Actualment el laboratori en el qual treballem es troba en una etapa de transició. Fa uns anys el laboratori s'especialitzava en tècniques de proteòmica, que és l'anàlisi massiva de proteïnes en un sistema determinat.

En aquest moment estem impulsant un canvi cap al camp de la nanotecnologia aplicada a la biomedicina. Tenim diverses línies d'investigació enfocades a crear noves teràpies basades en sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs. Alguns exemples són l'encapsulació de fàrmacs quimioterapèutics per tractar el càncer o la encapsulació de proteïnes com a tractament pel Parkinson.

Sou tots llicenciats en els mateixos graus? Si no és així, quina és la importància de que cadascú estigui especialitzat en un camp diferent?

[REDACTED]: La veritat és que pel que fa el camp de les biociències, la majoria dels graus es troben fortament vinculats i relacionats entre si. En l'àmbit pràctic, les diferències que poden haver-hi entre un bioquímic, un biotecnòleg o un biòleg queden totalment diluïdes quan entrem en un laboratori. Un clar exemple el trobem al laboratori, on tenim tres bioquímics, dos biòlegs i dos biotecnòlegs i tots estem treballant en el mateix projecte.

Què va ser el que us va interessar i us va fer especialitzar-vos en aquest camp de treball?

[REDACTED]: Personalment, el camp de la nanotecnologia m'ha cridat l'atenció d'ençà que vaig entrar a la carrera. Gairebé en quasi cada treball en què ens feien idear quelcom, jo li posava la cullerada de nanotecnologia. Es tracta d'un camp relativament nou, en el que prima la creativitat per poder avançar i que té una capacitat enorme per quasi totes les branques de la ciència i tecnologia.

Es pot saber en que esteu treballant o quin és el vostre projecte actual?

[REDACTED]: De totes les línies d'investigació en què estem treballant, jo m'encarrego juntament amb 2 companys de desenvolupar una possible teràpia pel tractament del Parkinson. Per fer-te una mica a

la idea, el que pretenem en aquest projecte és: a partir d'un enzim que sembla modular la malaltia, produir aquesta proteïna en cèl·lules, purificar-la i encapsular-la de tal manera que pugui arribar de forma activa al cervell, on ha de fer la seva acció contra la progressió del Parkinson.

Com va arribar a la vostra hipòtesi?

■: Aquest projecte ja fa un any i es troba en marxa i parteix d'un seguit d'articles que suggereixen que un seguit de deficiències en aquest enzim es troben fortament vinculades a l'aparició i progressió de la malaltia de Parkinson. El que nosaltres intentem és generar una estratègia terapèutica que pugui atacar aquesta relació, revertint l'efecte.

Subvenciona l'estat el vostre projecte?

■: El projecte està subvencionat per unes beques de projecte atorgades pel BBVA fins el 2023. No obstant això, t'he de dir que jo com a estudiant de doctorat no soc qui demana aquestes subvencions i potser tampoc soc el que més entén del tema. Els projectes, i les seves corresponents subvencions, els demana l'investigador principal del grup. Tanmateix, el món de les subvencions és molt competitiu i pràcticament cada any es demanen 3-4 subvencions diferents les quals, amb molta sort, podem arribar a tenir-ne una.

Quina creieu que és la importància de la vostra recerca? Quines són les seves possibles aplicacions?

■: És cert que moltes vegades a la investigació biològica bàsica li costa trobar un sentit comercial, però he de dir que aquesta és tan necessària o més que la investigació enfocada directament a crear teràpies o eines diagnòstiques.

En el nostre cas, l'aplicació és evident perquè el projecte tracta de generar directament una teràpia per a la malaltia de Parkinson, una malaltia que afecta milions de persones i que cada any, per un seguit de factors els quals no cal entrar gaire en detall, afecta a més gent. Però el fet és que nosaltres no podríem desenvolupar aquesta teràpia sense els treballs més bàsics com el que explorava la relació entre el nostre enzim i la malaltia.

Hi ha controvèrsia en aquesta àrea? Altres escoles de pensament?

■: No ho definiria tant com controvèrsia. El fet és que desconeixem profundament el mecanisme de desenvolupament de la malaltia. És com si la realitat estigués davant teu, però tu només poguessis mirar a través d'una escletxa i intuir el que està passant íntegrament. Hi ha gent mirant cap a totes direccions a través de l'escletxa i tothom creu que veu la imatge general. D'aquesta manera tothom creu que té la solució, però normalment el problema és més complex.

És per aquest motiu que apareixen propostes totalment divergents que pretenen el mateix objectiu. De fet i sent realistes, el més probable és que el nostre projecte també estigui simplificant el problema, però no se sap fins que no s'intenta, i en efecte, fins que un s'equivoca es dona compte de

que la seva hipòtesi no era del tot encertada.

Quin ha estat el descobriment més emocionant fins ara en la vostra trajectòria?

██████: El descobriment més interessant potser va ser veure que la nostra proposta de tractament tenia un efecte real sobre la malaltia en assajos cel·lulars. Ara faltaria que ens funcionés també en models animals, que sempre és un pas molt més complex.

Quin o quins han estat els majors reptes que hau hagut de fer front en la vostra recerca?

██████: La veritat és que aquesta pregunta resulta difícil de contestar, ja que com a científics estem molt acostumats als reptes. En el treball de laboratori, el 99% de les vegades les coses nosurten bé a la primera i moltes vegades s'ha de tornar a repetir tot l'experiment fent petits canvis fins trobar la manera correcta. Això a cada petit pas que s'intenta donar. Bé ho has pogut veure a la realització de l'anàlisi morfològic dels promielòcits (riures).

Crec que el veritable repte per a un bon científic és tenir la paciència i dedicació suficient com per resoldre cada un dels petits problemes que et trobes dia rere dia.

Quina és la vostra avaluació en el món de la investigació? Creieu que se us atorguen les suficients facilitats per desenvolupar els vostres projectes?

██████: Aquí a Espanya? El tema està molt fotut. Durant molts anys s'ha estat desincentivant tant el món de la investigació com el món de la docència, que van estretament lligats. El motiu pel qual s'ha fet això jo el desconec, però conec les conseqüències. Les conseqüències han estat que la ciència com a idea pura s'ha vist totalment corrompuda pel capitalisme. El nivell d'exigència que es demana per tenir una plaça d'investigador és tal que o marxes i no tornes o passes 12 hores diàries treballant per poder arribar als estàndards que es demanen.

El problema es troba tan arrelat que el vivim des de petits. Tu ara mateix estàs a la primera etapa, el batxillerat i la selectivitat. Després hauràs de tenir bona nota per poder entrar en un grup d'investigació com a becari, després publicacions a mansalva per poder optar a una posició postdoctoral, després unes quantes tesis doctorals dirigides per poder accedir a una plaça pública i així durant tota la vida.

La conseqüència més catastròfica d'això és tenir a grans científics que podrien estar gaudint de la seva feina i aportant moltíssim al món en un estat d'estrès permanent, immersos en una competició per sobreviure. Això els impedeix completament pensar i crear nova ciència. Així quedeu facilitats... cap.

Quantes hores de treball per setmana s'estimen en aquesta àrea de treball (la investigació)?

██████: Tal com he dit, si la teva intenció és sobreviure en aquest món, el nombre d'hores que s'han d'invertir es altíssim i a mesura que vas escalant en el sistema, la cosa no millora, sinó que passes

encara més hores per poder saltar al següent esgraó i no caure.

Què passa després del procés de descobriment? Considereu que se us reconeix?

■■■■: A qui de veritat li agrada la ciència, realment no busca el reconeixement sinó la satisfacció personal. Igualment, després d'un descobriment que normalment es fa amb diners públics, arriba una gran empresa i et compra la idea. És una realitat una mica trista; les piranyes empresarials estan esperant que es facin descobriments públics per comprar-los i privatitzar-los, guanyant milions per idees que no son seves.

L'alternativa és enfrontar-te amb uns medis molt limitats a una empresa amb 1000 fàrmacs al mercat i 1000 milions a la butxaca. Es pot fer, però és un treball que tu faries en 10 anys i ells ho poden comercialitzar en un any. Al final el que nosaltres busquem és que les nostres idees surtina la llum. Si algú s'aprofita econòmicament d'això és un tema que ja escapa al nostre control.

Quina legislació canviariéu per millorar la manera com es fa la ciència en el vostre camp?

■■■■: El que et deia fa una estona, el problema és que la ciència s'ha convertit en una carrera de fons, en una competició despietada, almenys al nostre país. Crec que tornant a incentivar la ciència amb un volum econòmic una mica superior a l'actual, el problema que s'ha arrelat es podria relaxar i podríem treballar en bones condicions.

Considereu que Espanya és un país que vetlla per la investigació? Si no és així, quines creieu que són les majors potències en investigació?

■■■■: Crec que no fa falta que torni als problemes d'Espanya. Hi ha grans potències en la investigació i són tan evidents com engegar la tele i veure d'on provenen les vacunes contra el coronavirus. Els Estats Units és sens dubte el paradís de la investigació, però Alemanya i Gran Bretanya no es queden enrere.

Un altre que també puja amb molta força és la Xina. No obstant la ciència de la Xina té el problema d'Espanya multiplicat, ja que el nivell d'exigència és tal que l'única opció que tenen per sobreviure és crear publicacions fraudulentament i citar-se entre ells. No tothom ho fa, com he dit, la ciència de la Xina és comparable a la dels Estats Units, però és veritat que moltes vegades les publicacions xineses manquen de rigorositat i reproductibilitat.

Així doncs, per finalitzar l'entrevista, què creieu que és el pròxim que vindrà? Quines esperances de futur teniu?

■■■■: Vista la situació actual de pandèmia i la futura caiguda de l'economia global, l'únic que puc desitjar-li al futur és que la situació de la investigació no empitjori, que almenys es quedi com està. Que la situació millorés a curt termini és una utopia.

