



LMC,

UN CÀNCER SOTA CONTROL

ÍNDEX

0. INTRODUCCIÓ.....	4
OBJECTIUS	6
HIPÒTESIS.....	6
METODOLOGIA.....	7
1. LA SANG.....	10
1.1. QUÈ ÉS LA SANG?	10
1.2. COMPOSICIÓ DE LA SANG	11
1.2.1. ERITRÒCITS	12
1.2.1. ERITRÒCITS.....	12
1.2.2. HEMOGLOBINA	13
1.2.3. LEUCÒCITS.....	14
1.2.4. PLAQUETES.....	20
1.2.5. HEMATOPOESI.....	20
1.2.6. PLASMA SANGUINI.....	23
1.3. TIPUS DE SANG.....	24
1.4. FISIOLOGIA DE LA SANG	26
2. EL SISTEMA IMMUNITARI.....	26
2.1. ÒRGANS DEL SISTEMA IMMUNE.....	27
2.1.1. ÒRGANS PRIMARIS.....	27
2.1.2. ÒRGANS SECUNDARIS	28
2.2. CÈL·LULES DEL SISTEMA IMMUNE	29
2.3. MOLÈCULES DEL SISTEMA IMMUNE	29
3. LEUCÈMIA.....	31
3.1. DEFINICIÓ GENERAL	31
3.2. TIPUS DE LEUCÈMIA	32
4. LEUCÈMIA MIELOIDE CRÒNICA (LMC)	34
4.1. DEFINICIÓ	34
4.2. EL CROMOSOMA FILADÈLFIA O PH	37
4.3. CAUSES DE L'APARICIÓ DEL CROMOSOMA FILADÈLFIA.....	43
4.4. INCIDÈNCIA.....	43

4.5. SÍMPTOMES.....	44
4.6. FASES DE LA LMC.....	45
4.6.1. FASE CRÒNICA.....	45
4.6.2. FASE D'ACCELERACIÓ.....	46
4.6.3. CRISI BLÀSTICA.....	47
4.7. DIAGNÒSI.....	48
4.7.1. ANÀLISI SANGUÍNIA.....	48
4.7.2. ASPIRACIÓ MEDUL·LAR I BIÒPSIA DE LA MEDUL·LA ÒSSIA.....	50
4.7.3. DIAGNOSI AMB TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	52
4.7.4. ESTUDI CITOGÈNIC.....	63
4.8. TRACTAMENT.....	69
4.8.1. CRITERIS DE RESPOSTA AL TRACTAMENT.....	69
4.8.2. EL FÀRMAC IMATINIB.....	72
ACTUACIÓ DE L'IMATINIB.....	73
4.8.2. TIPUS DE RESPOSTA A L'IMATINIB.....	76
4.8.3. TOXICITAT DEL FÀRMAC IMATINIB.....	78
4.8.4. FERTILITAT I GESTACIÓ EN RELACIÓ AMB EL TRACTAMENT AMB IMATINIB.....	78
4.8.5. INHIBIDORS DE SEGONA GENERACIÓ.....	80
4.8.6. TRASPLANTAMENT AL·LOGÈNIC DE MEDUL·LA ÒSSIA.....	82
5. TREBALL PRÀCTIC.....	87
5.1. INTRODUCCIÓ.....	87
5.2. INTERPRETACIÓ I OBSERVACIÓ DE LA SANG.....	90
5.3. PROVES DIAGNÒSTIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	92
5.3.1. FRACCIONAMENT DE LEUCÒCITS.....	92
5.3.2. EXTRACCIÓ D'ARN.....	95
5.3.4. SÍNTESI DE L'ADN COMPLEMENTARI (ADNc).....	99
5.3.4. DETECCIÓ DEL GEN BCR-ABL AMB LA TÈCNICA DE LA PCR.....	102
5.4. PROVES DIAGNÒSTIQUES DE CITOGÈNICA.....	107
5.4.1. CARIOTIP DE LES CÈL·LULES DE LA MEDUL·LA ÒSSIA.....	107
5.4.2. ESTUDI DE LA TRANSLOCACIÓ MITJANÇANT LA TÈCNICA FISH.....	116
6. ENTREVISTES.....	121
7. CONCLUSIONS.....	145
8. GLOSSARI.....	153
9. AGRAÏMENTS.....	157

10. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.....	158
11. ANNEX I.....	166
12. ANNEX II.....	169

0. INTRODUCCIÓ

Aquest treball, titulat *LMC, un gran avenç en la Leucèmia*, és un estudi que pretén donar a conèixer una malaltia que ha experimentat una revolució espectacular en els últims anys amb la introducció de fàrmacs de nova generació. La leucèmia mieloide crònica (LCM) és un tipus de càncer, caracteritzat per un increment de glòbuls blancs a la sang. Fins no fa gaires anys, era una patologia de mal pronòstic, essent la quimioteràpia, radioteràpia i el trasplantament els únics tractaments possibles. Actualment, s'aconsegueix una remissió pràcticament completa de la malaltia, fet que permet al pacient dur a terme una vida normal.

La leucèmia mieloide crònica ha esdevingut una malaltia prototipus pel fet que ha estat la primera leucèmia en què s'ha trobat una relació directa amb una anomalia genètica. Això, ha permès el disseny de medicaments específics que anul·len l'acció del gen anòmal, de manera que amb unes simples càpsules es manté sota control el creixement de les cèl·lules tumorals.

Des de sempre he sentit passió per la Medicina i m'interessava apropar-me a les tècniques modernes de diagnosi de les malalties, per això vaig centrar el meu treball de recerca en l'estudi d'una patologia que es pogués diagnosticar al laboratori d'un hospital, com és el cas de la leucèmia mieloide crònica.

Em vaig posar en contacte amb el Centre de Diagnòstic Biomèdic de l'Hospital Clínic de Barcelona, on em van donar l'oportunitat de diagnosticar un cas real de leucèmia. Més endavant, partint d'una anàlisi de sang i la biòpsia de la medulla òssia d'un pacient de l'hospital, vaig poder determinar el tipus leucèmia del malalt, mitjançant tècniques de Biologia Molecular i Citogenètica.

Des de bon principi em vaig sentir molt il·lusionada i motivada amb aquest projecte. Inicialment, vaig començar a cercar informació sobre els diferents tipus de leucèmia. Després, arran del treball experimental realitzat a l'Hospital Clínic, vaig acabar focalitzant l'estudi en la leucèmia mieloide crònica. Així doncs, el meu treball està

estructurat en dues parts diferenciades, però interrelacionades entre si: un marc teòric i un treball totalment pràctic. La recerca bibliogràfica portada a terme a la primera part del treball permet una aproximació a la composició i funcions de la sang i el sistema immunitari, així com a les característiques, la diagnosi i el tractament de la leucèmia mieloide crònica. Sense aquesta recerca hauria estat impossible comprendre les causes genètiques de la malaltia, el fonament dels fàrmacs amb què es tracta i els complicats mètodes emprats en la seva diagnosi. A la part pràctica, s'exposen els protocols i la metodologia del treball experimental que vaig realitzar a l'Hospital Clínic de Barcelona per diagnosticar la malaltia del pacient, partint de la hipòtesi que es tractava d'una leucèmia mieloide crònica, ja que els resultats de l'anàlisi de sang així m'ho feien pensar.

D'altra banda, el treball de recerca també inclou un apartat d'entrevistes, les quals ens permeten apropar-nos a la malaltia des del punt de vista del pacient i el metge.

La procedència de les il·lustracions i fotografies que apareixen al treball es detalla a l'apartat de les referències bibliogràfiques. Cal esmentar que les fotografies del treball pràctic són d'elaboració pròpia, ja que han estat realitzades a l'Hospital Clínic durant el procés de diagnosi, exceptuant algunes imatges, les fonts de les quals s'especifiquen explícitament.

No resulta fàcil estructurar i redactar un treball biomèdic, com ara l'estudi sobre la leucèmia mieloide crònica, utilitzant la terminologia científica adequada i, alhora, explicant els diferents conceptes de forma clara i entenedora. He intentat introduir tots els conceptes clau necessaris per abordar el tema convenientment i descriure els diferents mètodes de diagnosi, pas a pas, a fi de presentar la investigació realitzada de forma suficientment clara i accessible, però sense deixar de banda el rigor científic que requereix el present treball.

Amb aquest estudi he pogut entendre l'origen de la malaltia, el fonament del tractament i posar en practica el mètode de diagnosi, comprovant que la millor manera de trobar el remei per controlar o guarir una leucèmia crònica consisteix a detectar l'anomalia genètica que la provoca i cercar un tractament que faci diana sobre el gen mutant, a fi de revertir la seva acció. Sembla ser que les línies

d'investigació segueixen aquest camí. En definitiva, aquest treball pretén ser una invitació al coneixement de la leucèmia mieloide crònica i obrir una porta d'esperança, en base a la recerca biomèdica actual, per a totes aquelles persones que pateixen aquesta malaltia o d'altres de semblants.

OBJECTIUS

En començar el treball, em vaig plantejar els objectius següents:

- Conèixer les característiques i causes d'una leucèmia mieloide crònica.
- Conèixer els possibles símptomes que presenta un pacient amb LMC.
- Realitzar una diagnosi aplicant les tècniques de Biologia Molecular i Citogenètica.
- Conèixer quin tractament s'utilitza actualment i comprendre el seu mecanisme d'acció.
- Fer entrevistes a pacients de LMC i metges hematòlegs per apropar-me a la malaltia des de el seu punt de vista.

HIPÒTESIS

A continuació es detallen les hipòtesis proposades en iniciar el treball:

1. La LMC és una malaltia hereditària.
2. Es coneix la causa de la LMC.
3. La LMC no es pot diagnosticar només amb una anàlisi de sang.
4. Aquesta malaltia es pot diagnosticar només amb proves citogenètiques.

5. És una malaltia que evoluciona lentament en la majoria de casos.
6. Un pacient de LMC es pot curar definitivament , per tant hi ha algun tractament eficaç que permet el guariment complet de la malaltia.

METODOLOGIA

En l'elaboració d'aquest treball de recerca vaig seguir el procediment següent:

- **RECERCA D'INFORMACIÓ I ESTRUCTURACIÓ DEL TREBALL**

Un cop escollit el tema, vaig procedir a la recerca d'informació a partir de la consulta de llibres, revistes científiques, pàgines web de font fidedigna i articles mèdics sobre la leucèmia, en especial de la LMC. També vaig obtenir informació dels apunts i conferències de la doctora Dolors Colomer Pujol.

A partir de les diferents fonts consultades, vaig confeccionar un guió dels diferents punts que calia tractar i investigar en el decurs del treball de recerca. També vaig establir els objectius que calia assolir i les hipòtesis d'investigació.

- **ELABORACIÓ DE LA PART TEÒRICA DEL TREBALL**

Partint de la informació recopilada, i tenint en compte els objectius i les hipòtesis plantejades, vaig redactar la part teòrica del treball, centrada principalment en les característiques, la diagnosi i el tractament de la leucèmia mieloide crònica.

- **CERCA D'UN LABORATORI CLÍNIC PER DUR A TERME LA PART PRÀCTICA**

Per portar a terme la part pràctica, vaig cercar centres mèdics amb una àrea de diagnosi i tractament de la leucèmia. Vaig optar per l'Hospital Clínic de

Barcelona i em vaig posar en contacte amb la doctora Dolors Colomer, responsable del departament de Biologia Molecular.

- **PART EXPERIMENTAL. DIAGNOSI DE LA LMC**

A principis del setembre de 2011, al llarg de quinze dies, vaig realitzar la diagnosi d'una LMC a l'Hospital Clínic de Barcelona, a partir de la interpretació d'una analítica de sang d'un pacient, l'observació de la mostra de sang al microscopi, i proves de Biologia Molecular i Citogenètica.

- **MEMÒRIA DE LA PART PRÀCTICA**

Després de l'estada a l'Hospital Clínic de Barcelona, a partir de la metodologia utilitzada, els protocols, i els resultats obtinguts, així com les fotografies de les diferents etapes del treball experimental, vaig elaborar la memòria de la part pràctica del treball, corresponent al procés de diagnosi clínica d'un pacient amb LMC.

- **REALITZACIÓ D'ENTREVISTES A PACIENTS O EXPACIENTS DE LMC**

Per poder tenir accés als testimonis de diferents pacients, vaig realitzar dues entrevistes: una adreçada a una pacient de LMC que segueix el tractament farmacològic actual, i una altra a una expacient de LMC, la qual va ser sotmesa a un trasplantament, ara fa 18 anys.

- **ENTREVISTA AL DR. CERVANTES**

El passat mes de novembre, també vaig realitzar una entrevista al doctor Francisco Cervantes, un hematòleg reconegut a nivell internacional. Aquesta entrevista em va servir per aclarir alguns dubtes referents al tractament i evolució de la malaltia.

- **ANÀLISI DELS RESULTATS I EXPOSICIÓ DE LES CONCLUSIONS FINALS**

En acabar el treball, vaig realitzar una valoració global de la investigació realitzada i vaig exposar les conclusions finals tenint en compte les hipòtesis de recerca plantejades al començament del treball, a fi de corroborar-les o no.

1. LA SANG

1.1. QUÈ ÉS LA SANG?

La sang és un teixit fluid de color vermell que circula per les artèries, les venes i els capil·lars. Té una consistència viscosa, perquè es compon d'una part líquida, anomenada plasma, i una part semisòlida formada per diversos elements cel·lulars. La sang recorre tot l'organisme i realitza diverses funcions, entre les quals destaquen el transport de nutrients i oxigen a tots els teixits i la recollida de substàncies tòxiques o de rebuig per dur-les fins als òrgans responsables d'eliminar-les. També intervé en la defensa de l'organisme i en la regulació tèrmica del cos.

La quantitat de sang d'una persona està relacionada amb l'edat, el pes, el sexe i l'altura. En l'home, el volum de sang correspon a uns 70 ml per kg de pes, mentre que en la dona és d'uns 60 ml/kg de pes. Així, una persona adulta sana pot tenir entre 4 i 6 litres de sang.

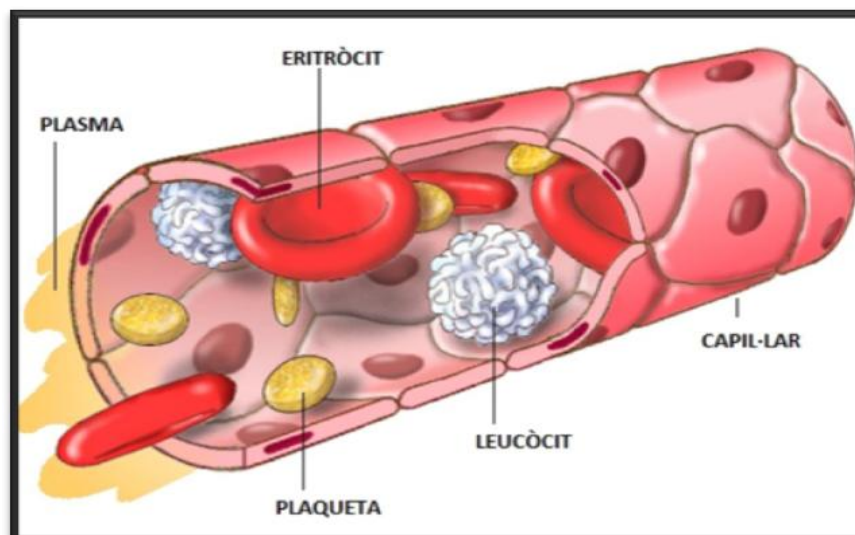


Figura 1. Il·lustració de la secció d'un capil·lar sanguini, mostrant la sang i els seus components.

1.2. COMPOSICIÓ DE LA SANG

Com tots els teixits, la sang està constituïda per cèl·lules i components extracel·lulars. Aquestes dues fraccions tissulars corresponen als elements cel·lulars sanguinis i al plasma.

- Els **elements cel·lulars** o **corpúscles sanguinis**, representats pels diversos tipus de cèl·lules de la sang i per fragments cel·lulars, constitueixen aproximadament el 45% de la sang. Els elements de la fracció cel·lular de la sang són diferents en mida, estructura i funció, i es classifiquen en els grups següents:
 - **Cèl·lules sanguínies**, corresponents als **glòbuls blancs** o **leucòcits**, els quals són cèl·lules completes, ja que tenen nucli.
 - **Derivats cel·lulars**, que estan representats pels **glòbuls vermells**, anomenats també **hematies** o **eritròcits**, i les **plaquetes** o **trombòcits**. Atès que no tenen nucli, no són cèl·lules completes.
- El **plasma sanguini** és un fluid translúcid i grogós que representa la matriu extracel·lular líquida en la qual es troben tots els elements cel·lulars sanguinis. El plasma o fracció acel·lular, representa un 55 % de la sang.

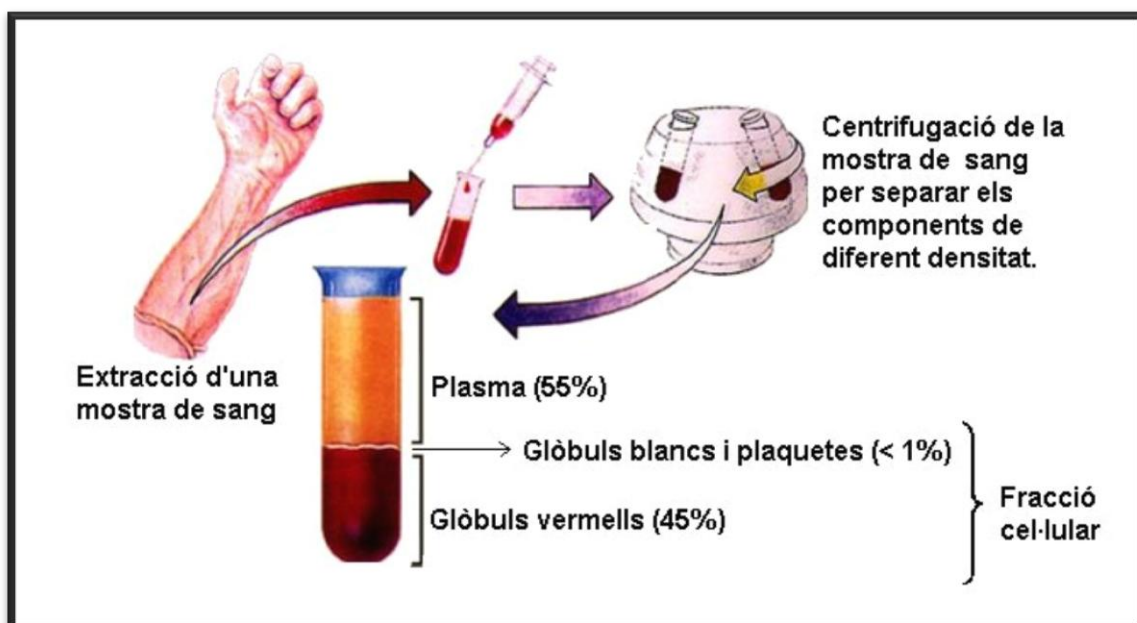


Figura 2. Components de la sang.

1.2.1. ERITRÒCITS

Els **eritròcits** o **hematies**, també anomenats **glòbuls vermells**, són corpuscles tous, flexibles, de superfície llisa i amb forma de disc bicòncav, amb una depressió central. Aquestes característiques els permeten circular fins i tot pels vasos sanguinis més prims. Estan embolcallats per una membrana que delimita un espai intern o citoplasma en el qual hi ha fonamentalment aigua i hemoglobina, una proteïna que confereix el color vermellós a la sang i que s'encarrega de transportar l'oxigen. També contenen enzims i alguns ions.



Figura 3. Glòbuls vermells de la sang.

Els eritròcits no tenen nucli ni orgànuls, per això no poden ser considerats estrictament cèl·lules. A la membrana hi ha les glicoproteïnes¹ que defineixen els diferents grups sanguinis i altres identificadors cel·lulars. El diàmetre longitudinal d'un eritròcit adult normal és de $7,82 \pm 0,62 \mu\text{m}$ i el seu gruix és de $2,2 \mu\text{m}$.

Els eritròcits constitueixen aproximadament el 96 % dels elements cel·lulars de la sang. El valor normal de glòbuls vermells és de $5,5 \pm 1 \times 10^{12}/\text{L}$ en l'home i de $4,8 \pm 1 \times 10^{12}/\text{L}$ en la dona. L'**hematòcrit** és el percentatge del volum de la sang que fa referència a la fracció dels glòbuls vermells. Les xifres normals d'hematòcrit a les persones oscil·len entre 42%-47% a les dones i 45%-52% als homes, depenent de diversos factors fisiològics, com l'edat i la condició física de l'individu.

La funció principal dels eritròcits és el transport d'oxigen des dels alvèols pulmonars fins als diversos teixits de l'organisme, i la captació d'una part del CO_2 resultant del metabolisme cel·lular, per tal de dur-lo fins al pulmó on és eliminat.

Els eritròcits es formen a la medul·la òssia, a partir de les cèl·lules mare que es multipliquen a gran velocitat. Per complir la seva funció transportadora d'oxigen, els

¹ Biomolècula formada per una proteïna i un glúcid.

eritròcits necessiten incorporar hemoglobina al seu citoplasma. Per això, van acumulant cadenes de globina progressivament des de l'estat de proeritroblast (eritròcit immadur). Al final de la seva vida, que sol durar uns 120 dies, els eritròcits són destruïts al fetge i a la melsa.

1.2.2. HEMOGLOBINA

És una proteïna globular de transport d'oxigen que es troba als glòbuls vermells. Cada molècula d'hemoglobina està formada per quatre cadenes proteïques, anomenades **globines**. Cadascuna d'elles està unida a un pigment vermell, identificat com a grup o molècula **hemo**, el qual aporta el color vermell a la sang. Cada grup hemo té un àtom de ferro; per tant, una molècula d'hemoglobina conté quatre àtoms de ferro.

A nivell pulmonar, l'oxigen s'uneix al component hemo de l'hemoglobina i es forma l'*oxihemoglobina* que transporta l'oxigen a tots els teixits de l'organisme, per tal que sigui utilitzat per les cèl·lules. L'hemoglobina també es pot unir amb el diòxid de carboni, formant la *carbaminohemoglobina*, la qual transporta el diòxid de carboni, un dels productes de desfet de les reaccions cel·lulars, des dels teixits fins als pulmons, per tal que sigui expulsat amb l'aire expirat.

A cada eritròcit hi ha aproximadament uns 200-300 milions de molècules d'hemoglobina que constitueixen aproximadament el 95% del pes sec de cada cèl·lula. A la sang dels homes hi sol haver més hemoglobina que en les dones. El valor normal d'hemoglobina en els homes és de 14-16 g per cada 100 mL de sang. En les dones, sol ser de 12-14g d'hemoglobina per cada 100 mL. L'adult que té un contingut d'hemoglobina inferior a 10 g per 100mL de sang, es considera que pateix **anèmia**².

² Malaltia de la sang en què hi ha una disminució de la concentració d'hemoglobina. Hi ha un descens de la concentració de hematies.

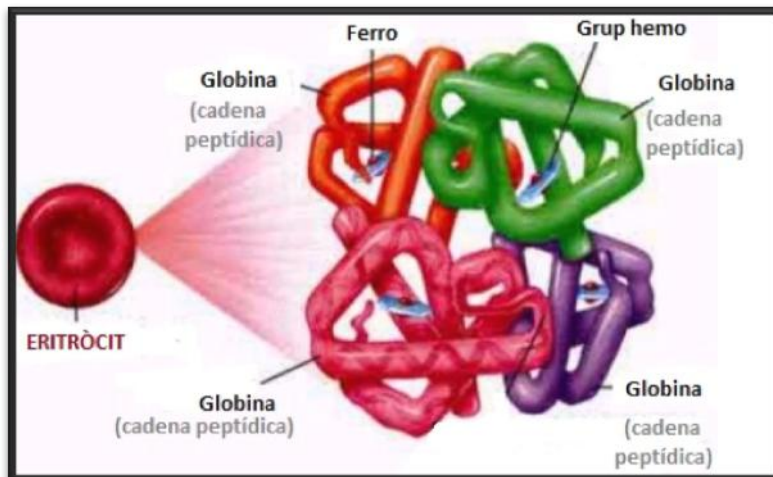


Figura 4. Molècula d'hemoglobina formada per quatre cadenes proteiques, anomenades globines, cadascuna d'elles amb un grup hemo.

1.2.3. LEUCÒCITS

Els **leucòcits**, també anomenats **glòbuls blancs**, són cèl·lules autèntiques, ja que tenen tots els atributs que les caracteritzen (membrana, citoplasma i nucli). Els glòbuls blancs formen part dels efectors cel·lulars del sistema immunològic. Com que són cèl·lules amb capacitat migratòria, utilitzen la sang com a vehicle per accedir a diferents parts del cos. La seva funció principal és encarregar-se de la resposta immunitària, és

a dir, defensen l'organisme contra substàncies estranyes (antígens) o agents infecciosos. La seva mida oscil·la entre 8 i 20 μm . Els leucòcits s'originen a la medulla òssia i al teixit limfàtic. El valor normal de leucòcits és de 5000-9000 leucòcits per cada mm^3 de sang. La disminució del nombre de leucòcits s'anomena **leucopènia** i l'augment, **leucocitosi**.

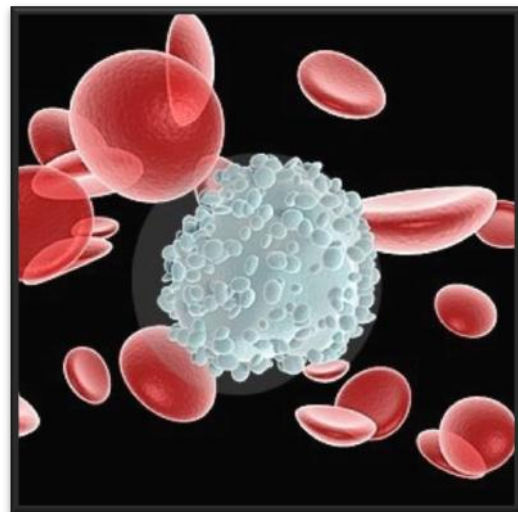


Figura 5. Imatge en què veiem un glòbul blanc o leucòcit envoltat de glòbuls vermells.

Podem classificar els leucòcits en dos grans grups: **granulòcits** i **agranulòcits**, segons la presència o absència de grànuls al citoplasma quan s'observen al microscopi. També es poden classificar en funció de les característiques del nucli. Així, bàsicament, hom distingeix els que tenen un sol nucli, anomenats **monomorfonuclears**, i els que aparentment en tenen més d'un, anomenats **polimorfonuclears**. De fet, els polimorfonuclears tenen un sol nucli, però com que presenta una forma multilobulada, vist al microscopi sembla que n'hi hagi més d'un. D'altra banda, tots els leucòcits polimorfonuclears són glòbuls blancs granulòcits, perquè quan s'observen al microscopi es poden veure al citoplasma diversos grànuls on es troben les substàncies necessàries per a la funció específica de cadascun d'ells.

1.2.3.1. LEUCÒCITS GRANULÒCITS O POLIMORFONUCLEARS

Són els glòbuls blancs que tenen grans grànuls en el seu citoplasma. Tenen el nucli segmentat i es classifiquen en els grups següents:

- **Neutròfils:** són els leucòcits granulòcits més abundants a la sang (45-70%). Els grànuls del seu citoplasma es tenyeixen amb un color púrpura molt clar amb

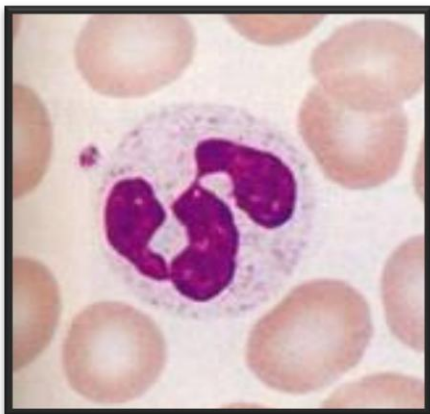


Figura 6. Neutròfil enmig de diversos eritròcits.

colorants neutres, d'aquí deriva el seu nom. Els grànuls són petits i nombrosos i tendeixen a donar un aspecte aspre al seu citoplasma. Són leucòcits molt mòbils i la seva funció és fagocitària³, ja que fagociten bacteris i cossos estranys, per això tenen un paper molt important a l'hora de combatre infeccions bacterianes.

³ La fagocitosi és l'acte que permet, a unes determinades cèl·lules, de copsar, englobar i generalment destruir o digerir elements molt diversos (bacteris, productes del metabolisme, cossos estranys, etc.).

- **Eosinòfils:** representen una petita proporció del total de leucòcits, entre l'1% i el 3%. Tenen el nucli bilobulat. Contenen un gran nombre de grànuls citoplasmàtics grans que es tenyeixen de color taronja amb colorants àcids, com l'eosina, d'aquí el seu nom. Són molt abundants en algunes zones del cos, per exemple, al recobriment de l'aparell respiratori i digestiu. Intervenien en la defensa cel·lular. La seva funció principal és la fagocitosi de cucs i protozois paràsits, participen en les reaccions al·lèrgiques i alliberen substàncies antiinflamatòries.



Imatge 7. Eosinòfil al centre de la fotografia; és una cèl·lula poc present en la sang.

- **Basòfils:** són leucòcits relativament grans, però escassos. Es troben en una proporció mínima, perquè representen el 0,5-1% dels leucòcits totals. Els grànuls del seu citoplasma es tenyeixen de vermell púrpura fosc amb colorants bàsics, d'aquí prové el seu nom. Tenen un nucli irregular amb 2 o 3 lòbuls en

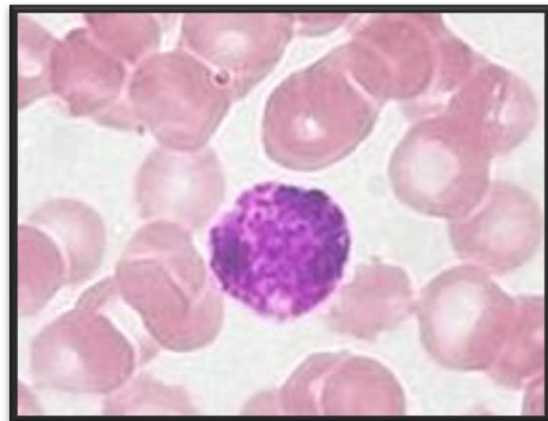


Figura 8. Basòfil envoltat d'eritròcits.

forma de S o de ferradura. Són mòbils i capaços de diapedesi, és a dir, poden abandonar els capil·lars sanguinis i dirigir-se al focus d'infecció. Intervenien en reaccions al·lèrgiques i en la resposta inflamatòria, alliberant histamina (vasodilatador) i heparina (anticoagulant). També secreten substàncies que atreuen els neutròfils i eosinòfils al focus d'infecció.

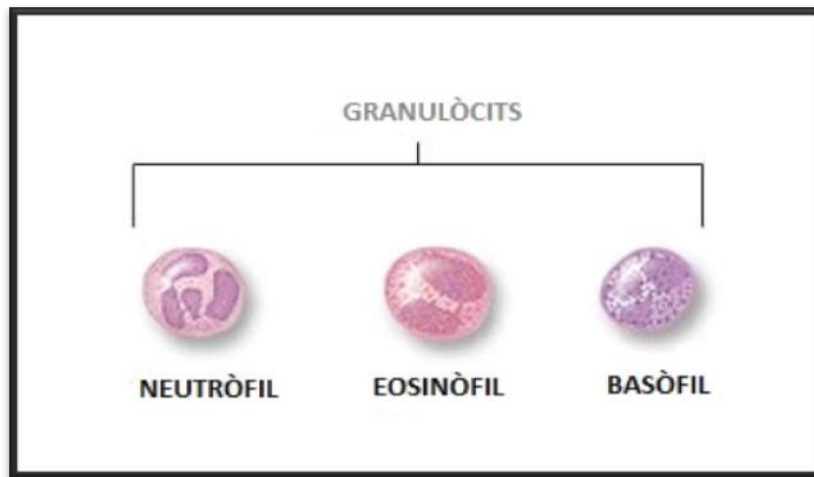


Figura 9. Esquema de les cèl·lules polimorfonuclears o granulòcits.

1.2.3.2. LEUCÒCITS AGRANULÒCITS O MONOMORFONUCLEARS

Són els glòbuls blancs que no tenen el nucli segmentat i no presenten grànuls al seu citoplasma en ser observats al microscopi electrònic. Es classifiquen en els grups següents.

- **Monòcits:** són els leucòcits més grans, amb un diàmetre de 10-20 μm . Representen entre un 3 i un 7 % del total dels glòbuls blancs. El seu nucli és fosc, amb forma de mongeta. Són cèl·lules mòbils i fagocítiques capaces d'absorbir grans bacteris i cèl·lules infectades per virus.

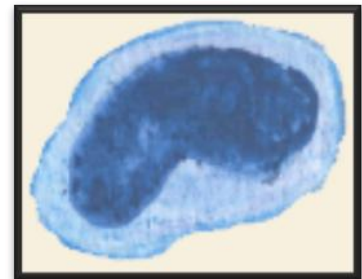


Figura 10. Monòcit caracteritzat pel nucli en forma de mongeta.

- Els **limfòcits:** són els glòbuls blancs més petits (6-8 μm de diàmetre). Constitueixen entre un 30% i un 35% del total de leucòcits. Són cèl·lules arrodonides, amb poc citoplasma i un nucli rodó i gros que ocupa gairebé tot l'interior de la cèl·lula.

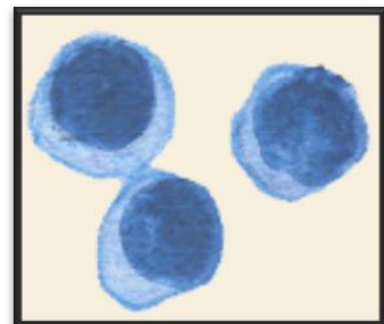


Figura 11. Limfòcits.

Des del punt de vista funcional, es distingeixen tres tipus de limfòcits:

- **Limfòcits B:** limfòcits responsables de la resposta immunitària humoral específica, la qual està ocasionada per unes molècules anomenades anticossos o immunoglobulines. Els limfòcits B es formen a la medul·la òssia i es distribueixen per la melsa, ganglis limfàtics i altres teixits limfoides. A la seva membrana tenen anticossos de superfície que poden reaccionar amb antígens⁴ específics de microorganismes. Quan els limfòcits B s'activen a partir del contacte amb un antigen, es converteixen en cèl·lules plasmàtiques o efectores que s'encarreguen de produir i secretar grans quantitats d'anticossos lliures que recorren per la sang i reaccionen específicament contra l'antigen, destruint-lo o fent-lo inactiu. Altres, resten a l'organisme actuant com a limfòcits B de memòria i són els responsables de la ràpida resposta immunitària que es produeix quan entra un antigen a l'organisme que ja havia aparegut prèviament.

- **Limfòcits T:** responsables de la resposta immunitària cel·lular específica. Es formen a la medul·la òssia i maduren al tim. No produeixen anticossos lliures. Hi ha tres subtipus de limfòcits T:
 1. Limfòcits T citotòxics, els quals destrueixen les cèl·lules infectades per virus o les cèl·lules tumorals.
 2. Limfòcits T col·laboradors o auxiliars, els quals s'encarreguen d'activar els limfòcits B, ja que segreguen unes molècules anomenades limfocines. També activen els macròfags.
 3. Limfòcits T supressors, els quals s'encarreguen d'inhibir l'activitat dels limfòcits T col·laboradors i consegüentment suprimeixen la producció d'anticossos.

⁴ Un antigen és una molècula estranya a l'organisme, que desencadena la producció d'anticossos i la resposta immunitària.

- **Limfòcits NK o cèl·lules assassines:** aporten una defensa inespecífica al cos, ja que destrueixen molts tipus de cèl·lules tumorals o infectades per diferents virus. Es formen a la medul·la òssia i circulen per la sang. Aquestes cèl·lules detecten canvis en la membrana de les cèl·lules infectades, llavors s'hi uneixen i alliberen substàncies citotòxiques que provoquen la mort de la cèl·lula infectada. Per tant, són molt importants en el reconeixement i la destrucció de les cèl·lules canceroses.

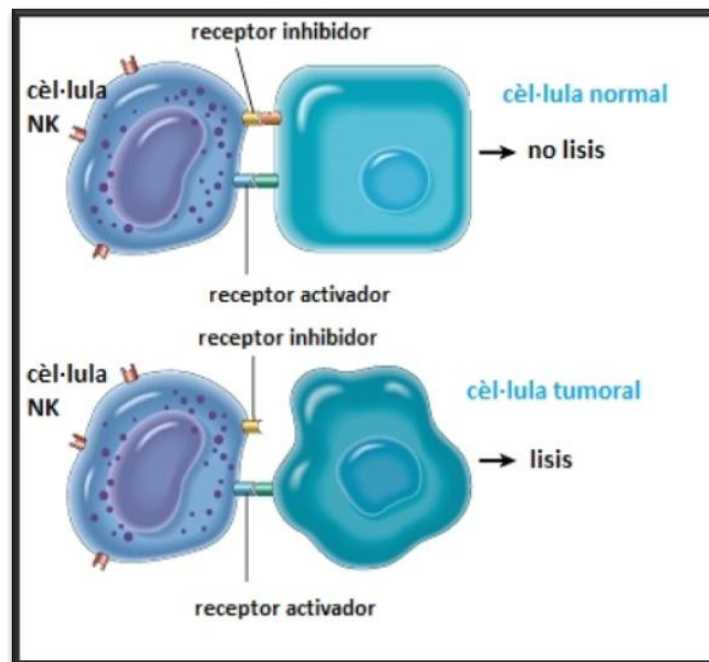


Figura 12. Il·lustració d'un limfòcit NK, a dalt com actua davant les cèl·lules normals, i a sota, com actua i s'activa en el cas de les cèl·lules tumorals.

1.2.4. PLAQUETES

Les plaquetes són els corpuscles més petits de la sang (2-3 μm de diàmetre), ovals i sense nucli. Es formen a la medul·la òssia vermella per la fragmentació citoplasmàtica d'unes cèl·lules molt grans, anomenades megacariòcits. No tenen nucli.

El valor normal en un adult oscil·la entre 150 000 i 350 000 per mm^3 . Les plaquetes

presenten tres característiques físiques importants, que són l'aglutinació, l'adherència i l'agregació, les quals actuen tan aviat com surt sang d'un vas sanguini. Les plaquetes s'adhereixen a qualsevol superfície amb la qual entren en contacte. Això fa que puguin adoptar formes diverses i irregulars. Juguen un paper molt important en la coagulació de la sang quan es produeixen lesions als vasos sanguinis. Si el



Imatge 13. Conjunt de plaquetes adherides a la superfície d'un capil·lar.

nombre de plaquetes és molt baix poden esdevenir hemorràgies excessives. Per altra banda, si el nombre de plaquetes és massa alt, poden formar-se coàguls sanguinis i ocasionar trombosis. La vida de les plaquetes és curta, tan sols de nou dies.

1.2.5. HEMATOPOESI

La hematopoesi és el procés de formació, maduració i pas a la sang de tots els diferents tipus de cèl·lules sanguínies. Aquest procés es regula segons les necessitats de l'organisme.

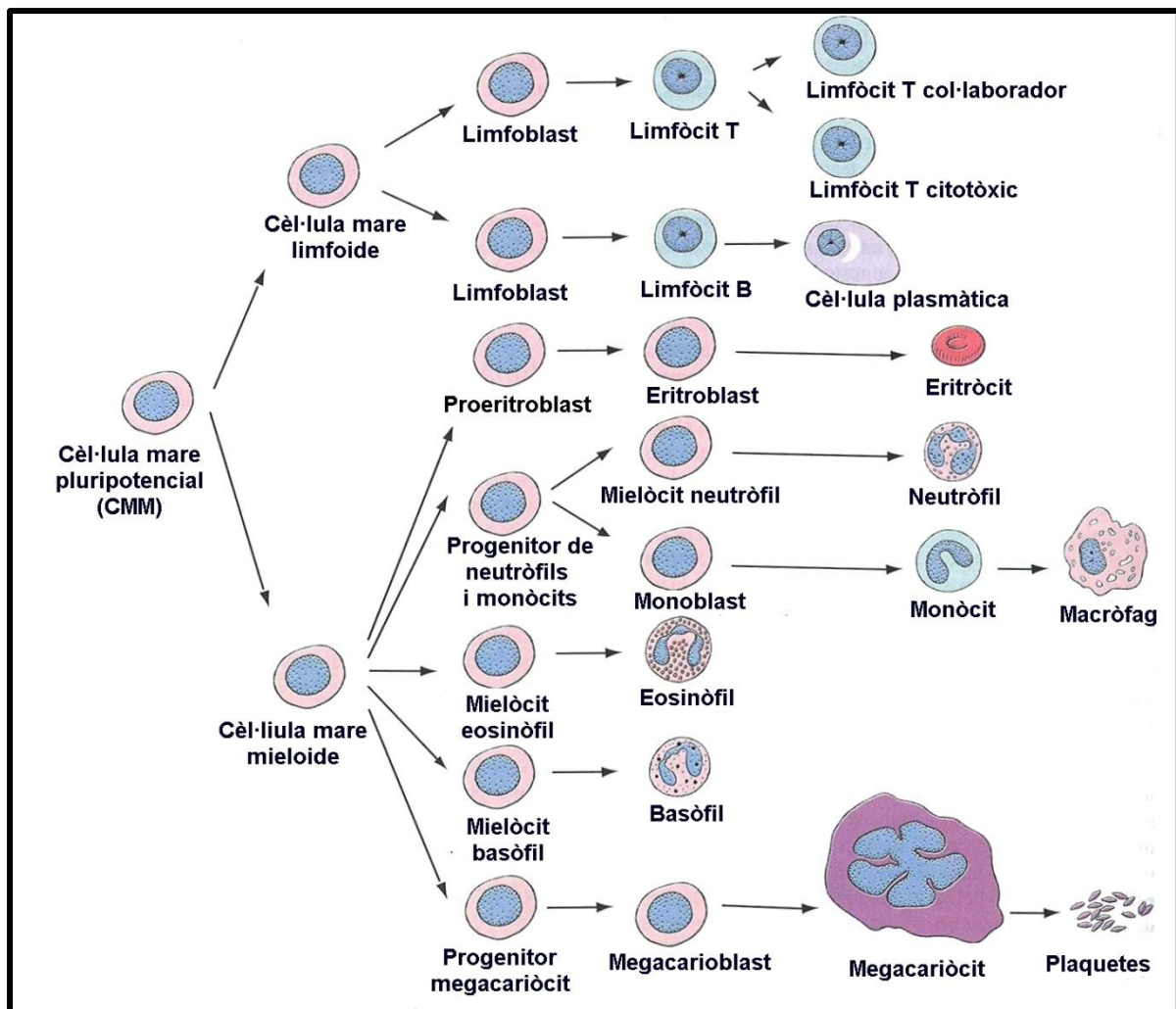


Figura 14. Hematopoesi

La hematopoesi es duu a terme sobretot a la medul·la òssia, on es localitzen unes cèl·lules precursors de totes les cèl·lules sanguínies anomenades **cèl·lules mare pluripotencials (CMP)**. Les cèl·lules mare pluripotencials, a més de multiplicar-se elles mateixes, originen les cèl·lules mare de les línies mieloide i limfoide, que estan preparades per generar concretament un tipus de cèl·lules sanguínies. Cada tipus de cèl·lula experimenta un procés determinat fins atènyer la cèl·lula madura que circula per la sang.

L'**eritropoesi** és la formació de glòbuls vermells. L'origen dels eritròcits es localitza a les **CMP** de la medul·la òssia. Aquestes generen les **cèl·lules mare progenitores dels eritròcits**, les quals es modifiquen i donen lloc a una successió de cèl·lules cada vegada més madures. Així, les cèl·lules precursors de l'eritròcit, els **proeritroblasts**, es divideixen i evolucionen, donant lloc als **eritroblasts basòfils**. Aquests es divideixen i originen els **eritroblasts policromàtics**, els quals produeixen hemoglobina. Finalment, aquestes cèl·lules perden el nucli i es transformen en **reticulòcits**, els quals passen a la sang circulant i es transformen en **eritròcits** madurs al cap de 24-36 hores. La mida de les cèl·lules disminueix a mesura que avança el procés de maduració. L'eritropoesi és regulada principalment per una hormona, l'eritropoetina, la substància precursora de la qual és elaborada al ronyó.

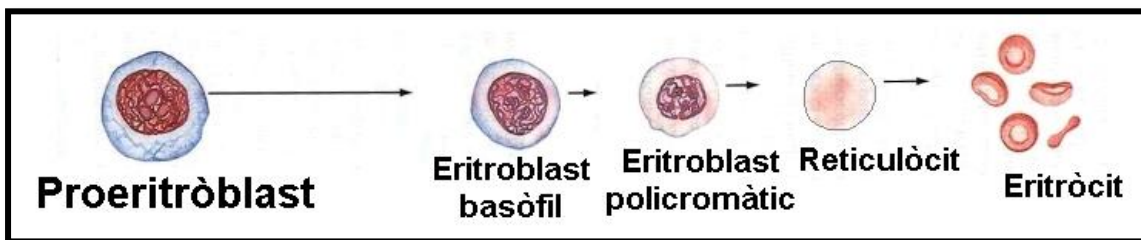


Figura 15. Eritropoesi.

Els leucòcits es formen a partir de dues línies de diferenciació, partint de la cèl·lula pluripotencial de la medul·la òssia. Per una banda, hi ha la línia de maduració i formació dels leucòcits granulocítics i, per altra banda, hi ha la línia de fabricació dels leucòcits agranulocítics.

- La **granulopoesi** és el procés de formació dels leucòcits polinuclears o granulòcits que té lloc a la medul·la òssia. A partir de les **cèl·lules mare pluripotencials** de la medul·la òssia s'originen les cèl·lules mare monopotencials de la **línia mieloide** que donen lloc als granulòcits més immadurs, els **mieloblasts**. Aquests evolucionen i generen els **promielòcits**. A partir dels promielòcits es formen els **mielòcits**. Aquests originen els **metamielòcits**, el nucli dels quals comença a canviar d'aspecte i passa de ser arrodonit a tenir forma de bastó. Finalment, els metamielòcits es diferencien en els diversos tipus de granulòcits madurs (**neutròfils, basòfils i eosinòfils**).

- La **limfopoesi** és el procés de formació dels diversos tipus de limfòcits, que comença a la medul·la òssia. Les **cèl·lules mare pluripotencials** originen una **línia limfoide** que dona lloc als limfòcits immadurs o **limfoblasts**. Durant la vida embrionària, els limfòcits encara immadurs migren cap a diversos òrgans limfoides per completar la seva maduració i es transformen en **limfòcits B**. D'altres es traslladen al tim i es transformen en **limfòcits T**. Quan els limfòcits B i T han madurat es traslladen a la sang i als òrgans limfoides.

La **trombocitopoesi** és el procés de formació de les plaquetes, que té lloc en la medul·la òssia. Les cèl·lules mare pluripotencials originen la primera cèl·lula precursora de les plaquetes, el **megacarioblast**. Aquest origina el **promegacariòcit**, que es transforma en **megacariòcit**. El citoplasma d'aquest es fragmenta en nombroses unitats delimitades al seu torn per fragments de la membrana, formant-se així les **plaquetes**, les quals passen de la medul·la òssia a la sang.

1.2.6. PLASMA SANGUINI

El plasma sanguini és la porció líquida de la sang on hi ha immergits tots els elements cel·lulars de la sang. És salat, d'un color grogós i més dens que l'aigua. Aproximadament n'hi ha 70 g o 80 g per litre de sang. Es tracta d'una solució aquosa que conté:

- Un 90% d'aigua.
- Un 9% de proteïnes plasmàtiques: l'**albúmina**, proteïna soluble que transporta diverses substàncies insolubles per la sang; diverses **globulines**, entre les quals destaquen les **immunoglobulines**, que tenen un paper important en la defensa de l'organisme, ja que constitueixen els anticossos elaborats pel sistema immunitari; proteïnes que formen el **sistema de complement**, les quals inicien el procés inflamatori i estan implicades en la destrucció de microorganismes; i el **fibrinogen**, que participa en la coagulació sanguínia.

- Un 1% format per **ions** com el sodi, el magnesi, el potassi, i **compostos nitrogenats** com la urea, l'àcid úric, i també **hormones** i **vitamines**.

A més de fer de vehicle de les cèl·lules sanguínies, el plasma també transporta nutrients i substàncies de rebuig.

El sèrum sanguini és la fracció fluida que resta quan es coagula la sang i es consumeixen els factors de coagulació.

1.3. TIPUS DE SANG

Quan parlem dels tipus de sang, ens referim al tipus d'antígens presents en la membrana cel·lular de les hematies. Aquests antígens són fonamentals a l'hora de fer una transfusió sanguínia, ja que una transfusió d'un grup sanguini incompatible pot causar una reacció immunològica que provoqui aglutinació de les cèl·lules sanguínies, anèmia hemolítica, aturada renal, xoc circulatori i la mort. Hi ha dos sistemes sanguinis principals, el sistema ABO, i el sistema Rh.

El sistema ABO. Es distingeixen quatre grups sanguinis segons els antígens del sistema ABO presents a la membrana dels glòbuls vermells.

1. **Sang del grup A:** presenta l'antigen A als eritròcits, i l'anticòs anti-B al plasma.
2. **Sang del grup B:** els eritròcits presenten l'antigen B, i el plasma conté l'anticòs anti-A.
3. **Sang del grup AB:** els eritròcits tenen els dos antígens, A i B; però el plasma no conté l'anticòs anti-A ni l'anti-B. Per tant, una persona AB pot rebre sang de qualsevol altre grup del sistema ABO.

4. **Sang del grup O:** els eritròcits no presenten l'antígen A ni el B; però al plasma hi ha els anticossos anti-A i anti-B. Així, doncs, una persona del grup O només pot rebre sang del mateix tipus.

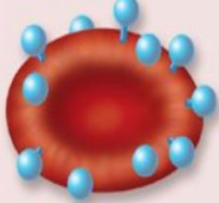
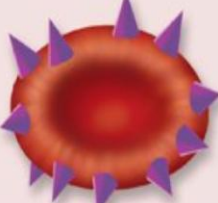
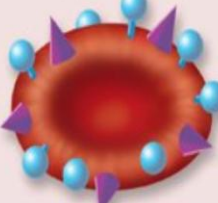



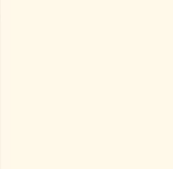

Grups sanguinis				
	Antigen A	Antigen B	Antigens A i B	Cap antigen
Eritròctis				
Plasma				

Figura 16. Grups sanguinis segons el sistema ABO.

Pel que fa al **sistema Rh**, hi ha dos tipus de grups sanguinis: **sang Rh positiva** i **sang Rh negativa**. Són Rh positives les persones que presenten l'antigen Rh, de naturalesa proteica, a la superfície dels seus eritròcits i són Rh negatives les persones que no presenten aquest antigen. Un receptor Rh negatiu reacciona a la sang d'un donant Rh positiu, però no a la inversa.

Una persona del grup O i Rh- pot donar sang a qualsevol altre grup, per això se'n diu *donant universal*. Es produeix la situació inversa amb el grup AB Rh+: són *receptors universals*, ja que poden rebre sang de qualsevol altre grup.

1.4. FISIOLOGIA DE LA SANG

La sang intervé en diverses funcions, com ara les següents:

1. Transporta els nutrients des de l'aparell digestiu cap a totes les cèl·lules de l'organisme.
2. Condueix l'oxigen des dels pulmons cap a totes les cèl·lules del cos, i el diòxid de carboni, produït per les cèl·lules, en sentit invers.
3. Recull els residus derivats del metabolisme cel·lular i els porta a l'aparell excretor perquè puguin ser eliminats a l'exterior de l'organisme.
4. Protegeix l'organisme contra les infeccions, ja que és l'encarregada de transportar els glòbuls blancs i els anticossos implicats en la resposta immunitària.
5. Intervé en la regulació de la temperatura corporal.
6. Controla el pH (grau d'acidesa) del medi intern de l'organisme.
7. Transporta les hormones (missatgers químics) a les cèl·lules de l'òrgan diana, les quals tenen a la membrana receptors específics per a aquelles hormones que poden influir en l'activitat de l'òrgan.
8. Respon a les lesions que produeixen inflamacions.
9. En cas d'una lesió, afavoreix l'hemostàsia⁵ i la coagulació a partir de les plaquetes i els factors de coagulació.

2. EL SISTEMA IMMUNITARI

El **sistema immunitari** o **immune** comprèn un sistema difós de teixits, òrgans, cèl·lules i molècules disseminats per tot el cos, encarregats dels mecanismes de defensa i protecció de l'organisme per fer front als cossos o organismes estranys i invasors, i als processos de transformació de les cèl·lules sanes en cèl·lules tumorals. Per tant, el

⁵ Procés que fa l'organisme per aturar una hemorràgia.

El sistema immunitari juga un paper molt important en la defensa contra els agents que originen les malalties. També està implicat en els trastorns autoimmunitaris, les al·lèrgies i els fenòmens de rebuig.

El sistema immunitari té tres funcions bàsiques:

1. Reconèixer molècules perilloses i alienes a l'organisme, els antígens; així com desordres patològics, com ara els tumors.
2. Respondre davant determinats antígens, controlant-los, neutralitzant-los o destruint-los.
3. Generar una memòria immunitària que permetrà respondre de manera eficient en cas que un mateix antigen torni a entrar en contacte amb l'organisme. Quan passa això, diem que l'organisme ha adquirit immunitat envers un antigen determinat.

2.1. ÒRGANS DEL SISTEMA IMMUNE

2.1.1. ÒRGANS PRIMARIS

- **Medul·la òssia:** ocupa el teixit esponjós que es troba l'interior de diversos ossos. Se'n diferencien dos tipus segons la seva funció i coloració:
 - La **medul·la òssia vermella:** ocupa el teixit esponjós dels ossos plans com l'estèrnum, les vèrtebres, la pelvis i les costelles. Té una funció hematopoètica, ja que s'encarrega de la fabricació de totes les cèl·lules sanguínies.
 - La **medul·la òssia groga:** és un tipus de teixit adipós que es troba en els canals medul·lars dels ossos llargs.

- **El timus o tim:** òrgan que es troba a la part superior del tòrax, sota l'estènum. En aquest òrgan, s'hi emmagatzemen i maduren els limfòcits immadurs procedents de la medul·la òssia vermella, els quals es transformen en limfòcits T que passaran a la sang a través dels vasos limfàtics. El tim es redueix molt després de la pubertat, ja que és reemplaçat parcialment per teixit adipós, però sempre conserva certa activitat.

2.1.2. ÒRGANS SECUNDARIS

- **Ganglis o nodes limfàtics:** són petites estructures de forma ovoide o circular, constituïdes per agrupacions de limfòcits i macròfags en forma de ramets. Es troben intercalats en el trajecte dels vasos limfàtics i actuen com a veritables filtres, reconeixent i eliminant els virus, bacteris i diversos tipus de partícules que es troben suspeses a la limfa, composta dels líquids que provenen de l'espai intercel·lular de tots els teixits de l'organisme. Als ganglis limfàtics també s'estimula la proliferació dels limfòcits i la formació d'anticossos específics enfront un antígen determinat.
- **Melsa:** és un òrgan aplanat, situat a la zona abdominal superior esquerra, just darrere l'estómac. La seves funcions principals són la destrucció de glòbuls vermells vells i el manteniment d'una reserva de sang lliure d'elements estranys. A la melsa també es reproduïxen alguns leucòcits, que després passen a la circulació sanguínia. Actua igualment com a filtre de gèrmens i impureses, ja que es troba en contacte amb nombrosos vasos limfàtics que connecten amb els ganglis adjacents.
- A més a més, el teixit del sistema immunològic està format pel **teixit limfoide**, el qual es troba difós per tot l'organisme. Està format per conjunts de cèl·lules immunitàries que constitueixen els fol·licles limfoides.

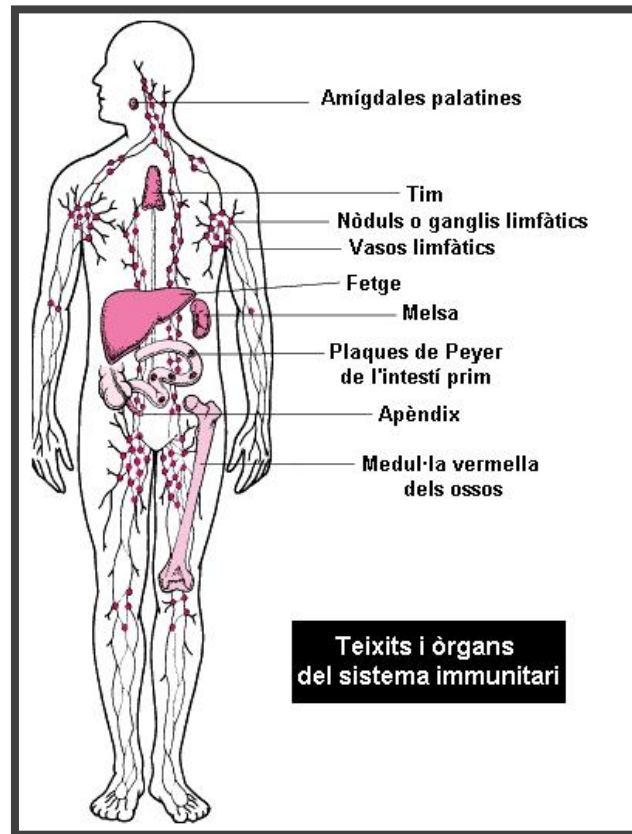


Figura 17. Principals òrgans i teixits del sistema immunitari.

2.2. CÈL·LULES DEL SISTEMA IMMUNE

Com abans hem comentat, a partir d'una cèl·lula mare hematopoètica de la medul·la òssia es poden originar dues línies cel·lulars diferents: **la mieloide**, que dóna lloc als eritròcits, plaquetes i leucòcits granulòcits, i **la limfoide**, que origina els limfòcits B, limfòcits T i les cèl·lules NK. Els leucòcits formats en cadascuna d'aquestes línies desenvolupen diferents funcions en la defensa de l'organisme, que han estat descrites anteriorment.

2.3. MOLÈCULES DEL SISTEMA IMMUNE

- Els **anticossos**: també coneguts com a immunoglobulines, són glicoproteïnes que identifiquen i neutralitzen de forma específica els elements estranys al cos,

com ara els bacteris, virus o paràsits. Els anticossos són sintetitzats pels limfòcits B.

- El **sistema del complement**: està compost per una vintena de proteïnes plasmàtiques que tenen la funció de potenciar la resposta inflamatòria , activar la fagocitosi a través dels neutròfils i macròfags i dirigir la lisi o destrucció de cèl·lules bacterianes, virus encapsulats o cèl·lules estranyes.
- Les **citocines**: són un tipus de molècules senyalitzadores que sovint són secretades per cèl·lules del sistema immunitari que entren en contacte amb un microorganisme patogen. Activen i recluten més cèl·lules immunitàries, a fi d'incrementar i fer més eficient la resposta de defensa enfront el patogen.

Després d'aquesta aproximació als components i funcions de la sang i el sistema immunitari, podem concloure que qualsevol patologia que afecti les cèl·lules mare de la medul·la òssia, com ara la leucèmia mieloide crònica, tindrà repercussions directes en el procés de formació de les cèl·lules sanguínies i, conseqüentment, es produiran disfuncions en el sistema immunitari i en altres sistemes de l'organisme.

3. LEUCÈMIA

3.1. DEFINICIÓ GENERAL

El terme **leucèmia** inclou una sèrie de malalties hematològiques malignes de la medul·la òssia que es caracteritzen per la producció incontrolada de leucòcits, sovint atípics i anomenats en general **cèl·lules leucèmiques**.

Les leucèmies apareixen quan s'altera el procés de maduració de les cèl·lules mare de la medul·la òssia que generen leucòcits i té lloc una proliferació exagerada de leucòcits cancerosos que ocupen tota la medul·la òssia i substitueixen les cèl·lules normals, de manera que l'hematopoesi s'altera globalment, ja que no es pot dur a terme la fabricació normal de la resta de cèl·lules sanguínies. Les cèl·lules leucèmiques solen passar a la sang i poden envair altres òrgans hematològics que intervenen en la formació, maduració o destrucció de les cèl·lules sanguínies com el fetge, la melsa i els ganglis limfàtics, i també teixits i òrgans no hematològics com el ronyó, el tub digestiu, les meninges del sistema nerviós central i la pell.

Les manifestacions leucèmiques són molt diverses i variades segons el cas, perquè depenen de l'alteració funcional dels òrgans que han estat envaïts. Però, en general, provoquen trastorns en la immunitat deguts a un dèficit de leucòcits normals, a una anèmia per falta del desenvolupament dels eritròcits i trastorns hemorràgics deguts a la manca de plaquetes.

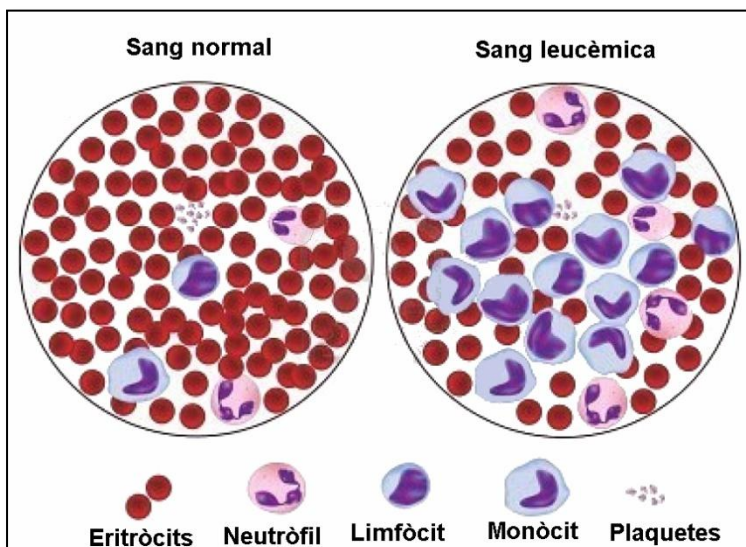


Figura 18. Dibuix comparatiu d'una mostra de sang normal i una de sang amb cèl·lules leucèmiques.

3.2. TIPUS DE LEUCÈMIA

Podem classificar les leucèmies en funció de la velocitat de progressió de la malaltia, el tipus de leucòcit que es responsable de la proliferació exagerada, i l'edat del pacient.

- Segons la velocitat de progressió de la malaltia, s'estableixen dos grans grups:
 1. **Leucèmies agudes:** es caracteritzen per una multiplicació ràpida i descontrolada de leucòcits malignes, molt immadurs, anomenats blasts, que no poden realitzar les seves funcions normals i van envaint del 20 al 100% de l'espai natural de la medul·la òssia corresponent a les altres cèl·lules normals de la medul·la òssia productores de la sang. La multiplicació dels blasts leucèmics pot arribar a ser tan important que acaben sent les cèl·lules més nombroses de la sang. Es produeix una situació molt greu en què el pacient presenta una escassetat de glòbuls vermells, leucòcits normals i plaquetes a la sang. Aquest quadre clínic s'anomena insuficiència medul·lar. Sense tractament, sol ocasionar alteracions i complicacions tan greus que provoquen la mort de la persona a curt termini, en general al cap d'uns mesos.
 2. **Leucèmies cròniques:** es caracteritzen per la proliferació lenta de leucòcits cancerosos, però molt més diferenciats o madurs i amb capacitat de realitzar algunes de les seves funcions normals. La leucèmia crònica sol evolucionar poc a poc, durant alguns anys, ja que el nombre de blasts augmenta més lentament que en el cas de la leucèmia aguda, i pot romandre asimptomàtica durant molt de temps.
- Segons el tipus de cèl·lula afectada, les leucèmies es classifiquen en els grups següents:
 1. **Leucèmies mieloides:** quan les cèl·lules afectades són de la línia mioide (prolifereu els leucòcits granulòcits).
 2. **Leucèmies limfoides:** quan les cèl·lules afectades són les de la línia limfoide (prolifereu els limfòcits).

- Segons l'edat del pacient, distingim:
 1. **Leucèmies infantils** (en nens i adolescents).
 2. **Leucèmies adultes.**

Per tant, tenint en compte tots els factors, podem classificar les leucèmies de forma més específica, segon els quadre següent:

LEUCÈMIA	MIELOIDE	AGUDA (LMA)	ADULT	15 casos per milió
			NEN /ADOLESCENT	8 casos per milió
	LIMFOIDE	AGUDA (LLA)	ADULT	30 casos per milió
			NEN /ADOLESCENT	40 casos per milió
	MIELOIDE	CRÒNICA (LMC)	ADULT	15 casos per milió
			NEN /ADOLESCENT	1 casos per milió
	LIMFOIDE	CRÒNICA (LLC)	ADULT	30 casos per milió
			NEN /ADOLESCENT	excepcional

Taula 1. Classificació dels diferents tipus de leucèmies. Es remarca en blau marí la leucèmia mieloide crònica, corresponent al tipus de leucèmia en què es basa la part experimental del treball.

4. LEUCÈMIA MIELOIDE CRÒNICA (LMC)

4.1. DEFINICIÓ

La leucèmia mieloide crònica (LMC) és una malaltia mieloproliferativa crònica clonal, en què una cèl·lula productora de cèl·lules sanguínies, que es troba a la medul·la òssia, es transforma en cancerosa i pot produir un gran nombre de leucòcits granulòcits anormals.

La LMC és el resultat d'una alteració en l'ADN d'una cèl·lula mare de la medul·la òssia del llinatge mieloide. La mutació no és innata, és a dir, s'adquireix durant la vida i no és hereditària, atès que no es transmet als descendents perquè l'alteració genètica només afecta a les línies cel·lulars que provenen de la cèl·lula mare que ha esdevingut cancerígena a la medul·la òssia i, per tant, no afecta a les cèl·lules d'altres òrgans, com ara les cèl·lules germinals dels testicles o dels ovaris, productores de cèl·lules reproductores (espermatozoides i òvuls); per això, els fills o filles d'una persona amb leucèmia mieloide crònica no són portadors de la mutació genètica causant de la malaltia.

La leucèmia mieloide crònica es produeix a causa d'una alteració genètica adquirida en vida que afecta a una cèl·lula mare mieloide de la medul·la òssia.

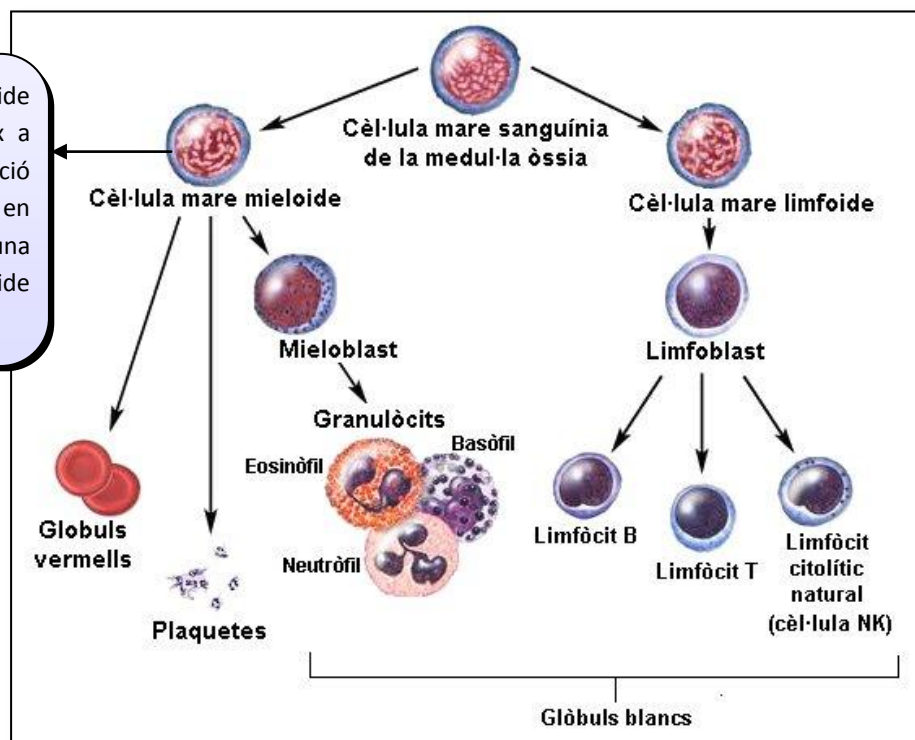


Figura 19. Esquema global de l'hematopoesi segons els dos nivells de línies, la mieloide i la limfoide.

Aquesta alteració genètica en les cèl·lules mare meiloïdes de la medul·la òssia es multiplica, ja que totes les cèl·lules filles resultants de la divisió de la primera cèl·lula cancerígena, portadora de la mutació, són idèntiques genèticament i, per tant, presenten la mateixa alteració al seu ADN. Com que aquestes cèl·lules tumorals tenen alta capacitat de proliferació, es divideixen sense control i, al cap d'un temps, són més abundants que les cèl·lules sanes i ocupen la major part de la medul·la òssia, ja que acostumen a formar grans quantitats de teixit fibrós que reemplaça el de la medul·la òssia normal, desplaçant així la resta de línies cel·lulars sanes, les quals disposen cada cop de menys espai i recursos per multiplicar-se.

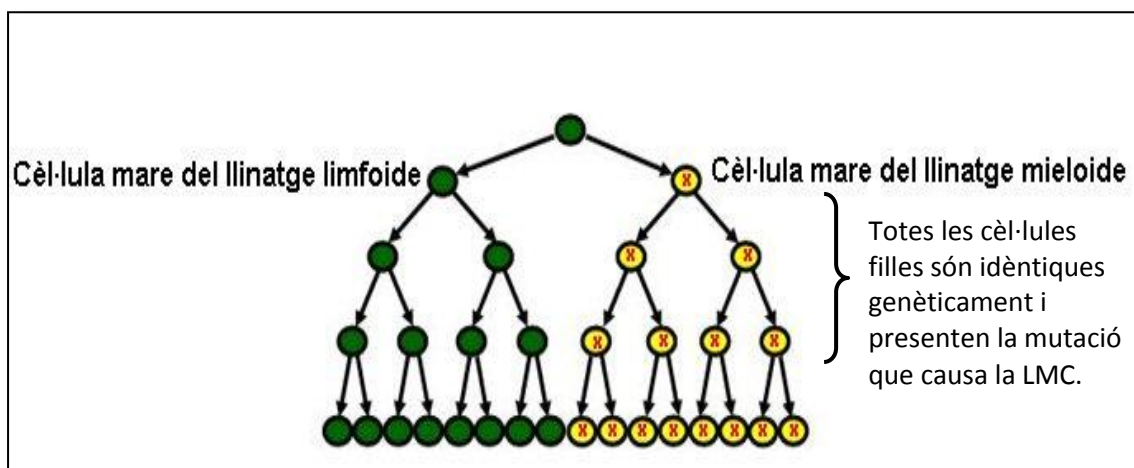


Figura 20. Totes les cèl·lules sanguínies de la línia meiloide que procedeixen de la divisió la cèl·lula mare cancerosa presenten la mutació que origina la LMC, ja que totes són genèticament idèntiques.

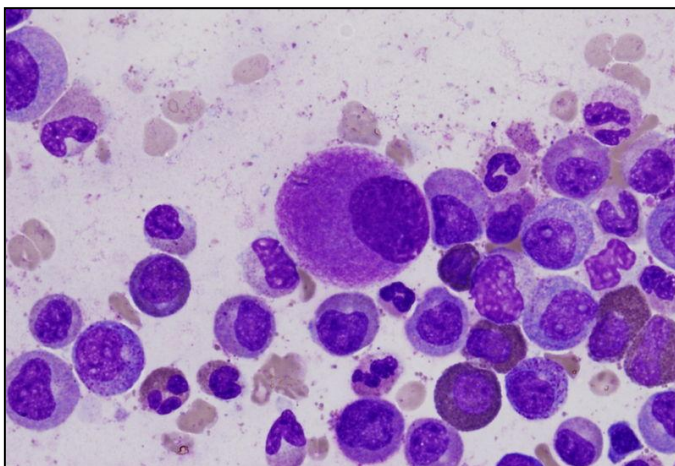


Figura 21. Biòpsia de medul·la òssia d'afectada de leucèmia mieloide crònica. S'observa una gran proliferació de mieloblasts i granulòcits cancerosos, els quals ocupen quasi tot l'espai de la medul·la òssia, substituïnt així les cèl·lules sanes productores de cèl·lules sanguínies

En el decurs de la malaltia, a causa de la proliferació cel·lular dels mieloblasts, augmenta el nombre de leucòcits cancerosos i comencen a aparèixer cèl·lules sanguínies immadures (blasts) al flux sanguini, produint anèmia i trombocitopènia⁶, ja que hi ha manca de glòbuls vermells madurs i plaquetes, mentre que la proporció de glòbuls blancs immadurs (blasts) augmenta bruscament. A vegades, però, la situació encara és més greu quan els granulòcits leucèmics sofreixen encara més canvis i la malaltia origina una crisi blàstica, en què les cèl·lules mare canceroses comencen a produir ja només granulòcits immadurs, fet que assenyala que la malaltia ha empitjorat. En aquest moment, es pot produir una metastasi, ja que poden aparèixer els cloromes, tumors formats pels granulòcits de reproducció ràpida, a la pell, als ossos, al cervell i als ganglis limfàtics.

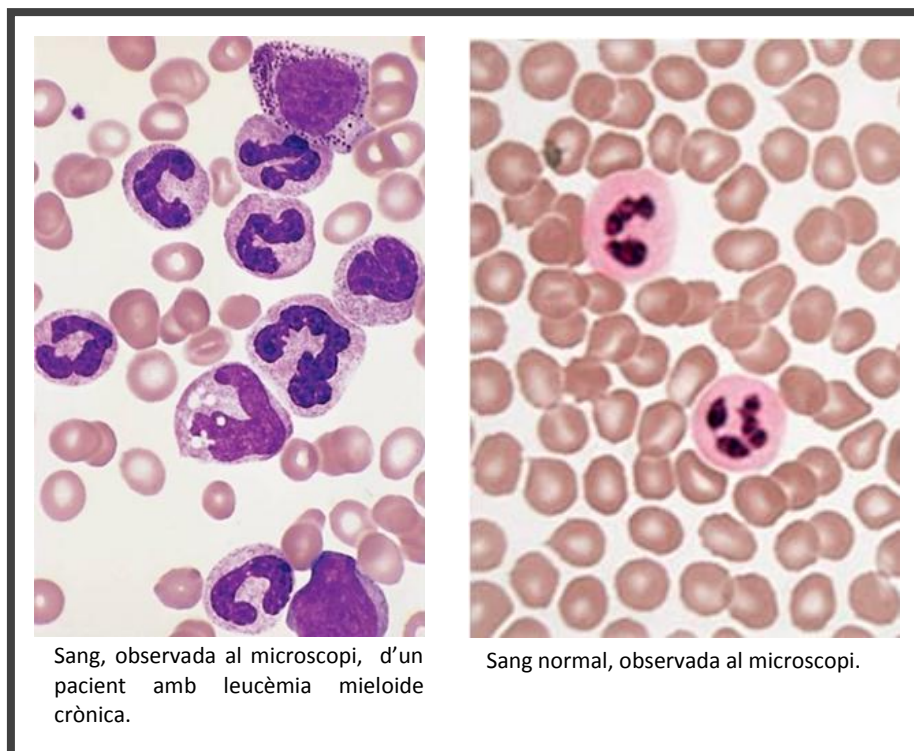


Figura 22. La comparació de les dues imatges permet apreciar la gran proliferació de granulòcits a la sang perifèrica de la persona afectada de leucèmia mieloide crònica.

⁶ Disminució de la quantitat de plaquetes circulants al torrent sanguini.

En quasi tots els casos de LMC s'observa que l'alteració genètica que presenta la cèl·lula mare anormal de la medul·la òssia, i tots els leucòcits procedents d'aquesta, és una anomalia cromosòmica, coneguda com a cromosoma Filadèlfia o Ph.

4.2. EL CROMOSOMA FILADÈLFIA O PH

Al nucli de les cèl·lules hi ha l'ADN (àcid desoxiribonucleic), el qual conté totes les instruccions genètiques que controlen el desenvolupament i funcionament de les cèl·lules de l'organisme. L'ADN es troba associat a proteïnes, com ara les histones, formant la cromatina. Quan la cèl·lula ha de dividir-se, els filaments d'ADN es compacten i formen unes estructures en forma de bastonets, anomenades cromosomes. Per tant, els cromosomes només són visibles al microscopi durant una part del cicle cel·lular, corresponent a la divisió cel·lular.

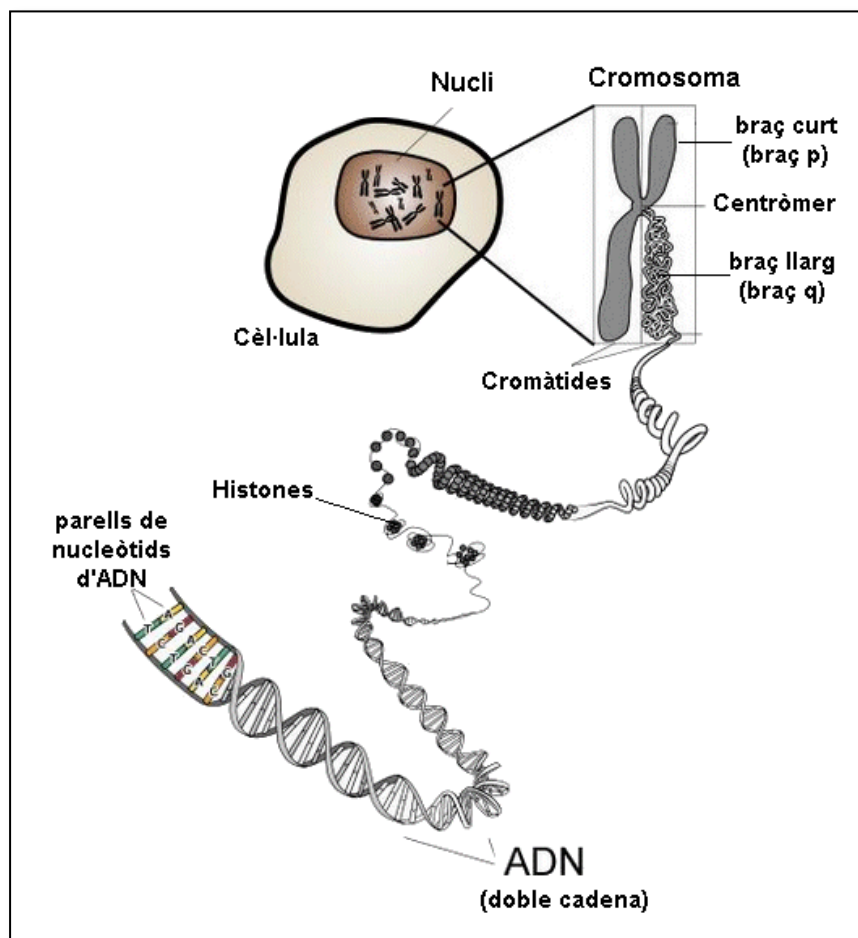


Figura 23. Estructura i composició dels cromosomes del nucli d'una cèl·lula.

Les cèl·lules humanes normals tenen 22 parelles de cromosomes somàtics i una parella de cromosomes sexuals més que determina el sexe de l'individu, ja que les dones tenen la parella de cromosomes sexuals XX, i els homes, la parella XY.

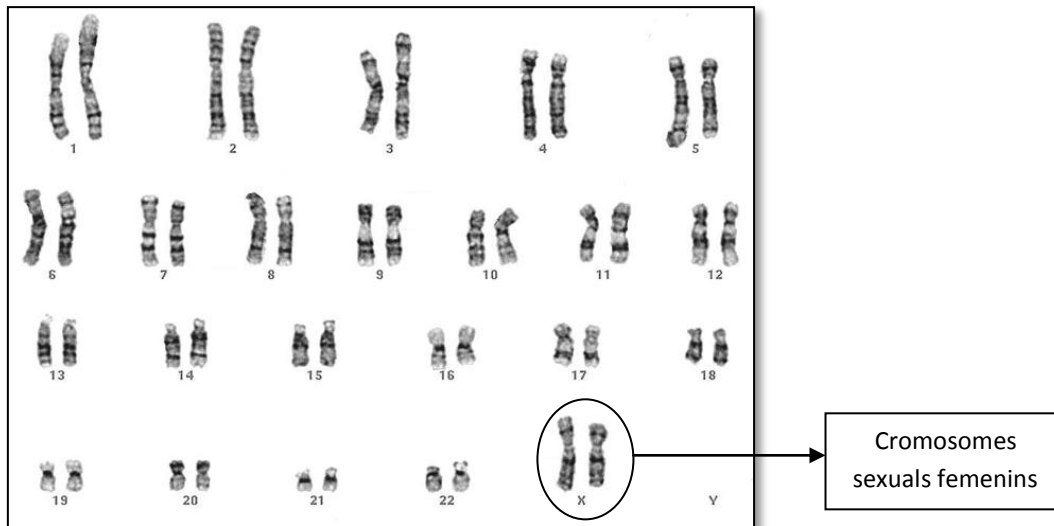


Figura 24. Cromosomes d'una cèl·lula humana normal. Es poden observar els 23 parells de cromosomes, compostos per ADN i proteïnes associades, del nucli d'una cèl·lula humana femenina.

La leucèmia mieloide crònica és el primer tipus de leucèmia en què es va trobar una relació directa amb una anomalia cromosòmica, situada al cromosoma 22. Al 1960, dos científics de la ciutat de Filadèlfia, Peter Nowell i David Hungerford, es van adonar que els pacients amb LMC presentaven **un cromosoma 22 més curt**, ja que li faltava una porció d'àcid desoxiribonucleic (ADN) i aquesta anomalia va rebre el nom de "**cromosoma Filadèlfia**" o "**cromosoma Ph**", ja que va ser descoberta en centres d'investigació d'aquesta ciutat. Estudis posteriors, realitzats a la Universitat de Chicago, van demostrar que en aquesta anomalia cromosòmica també hi estava involucrat el cromosoma 9.

Actualment, sabem que el 95 % dels pacients afectats de leucèmia mieloide crònica, presenten una **translocació recíproca** entre els braços llargs (anomenats **braços q**) dels **cromosomes 9** i el **22**, l'anomenada translocació $t(9;22)(q34;q11.2)$. Això vol dir que una porció petita del cromosoma 9 va a parar al 22, i a l'inrevés, un fragment més gran del cromosoma 22 va a parar al 9, originant d'aquesta manera un cromosoma 22 més curt (**cromosoma 22 q-**) i un cromosoma 9 més llarg (**cromosoma 9 q+**).

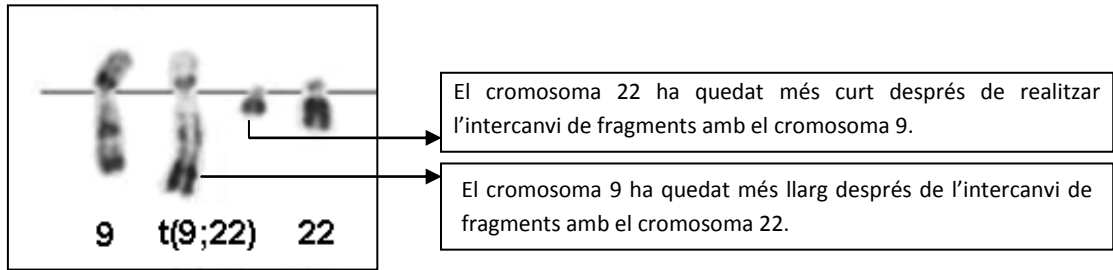


Figura 25. Aquesta imatge correspon a la part d'un cariotip d'una persona amb LMC, en què s'observa clarament la translocació recíproca entre el cromosoma 22 i el cromosoma 9.

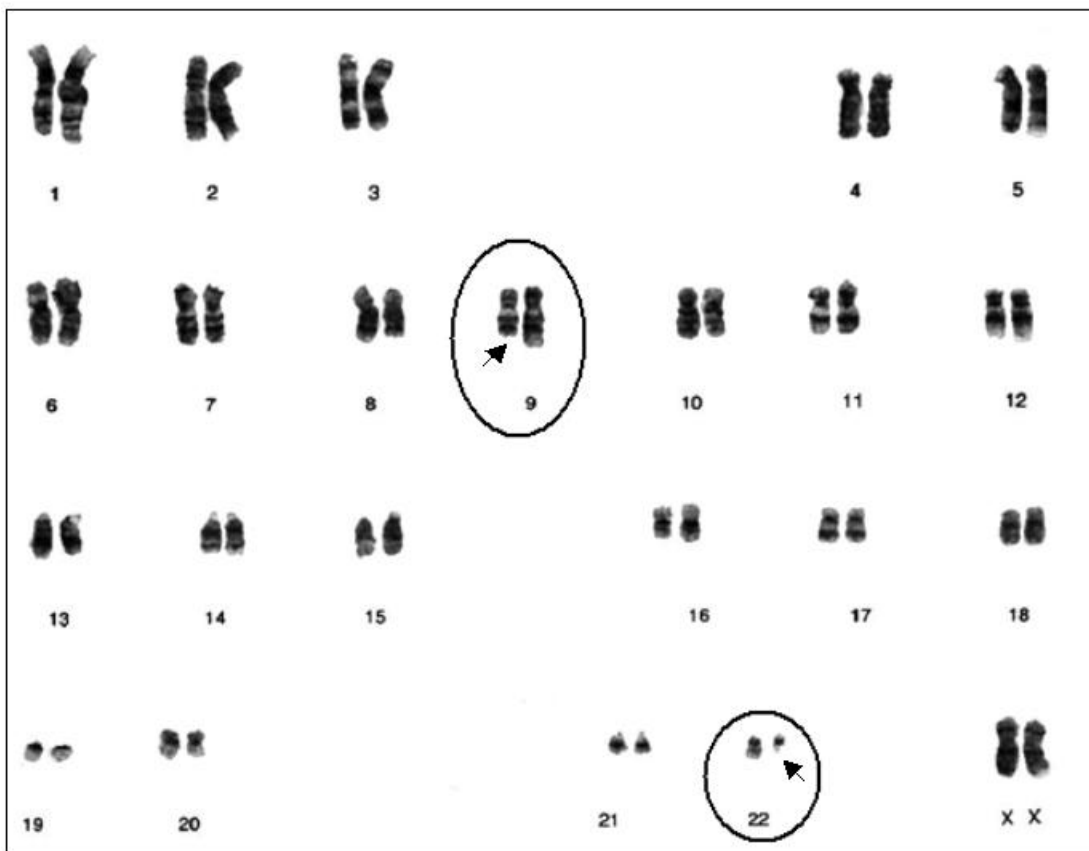


Figura 26. Cariotip d'una persona amb leucèmia mieloide crònica. S'observa un cromosoma 9 més llarg i un cromosoma 22 més curt, com a resultat de la translocació recíproca entre aquests dos cromosomes.

La nomenclatura utilitzada per expressar aquesta translocació és $t(9;22)(q34;q11.2)$, perquè el primer parèntesi ens indica quins són els cromosomes afectats, mentre que el segon parèntesi ens indica la posició, en el braç llarg de cada cromosoma, on es produeix la translocació.

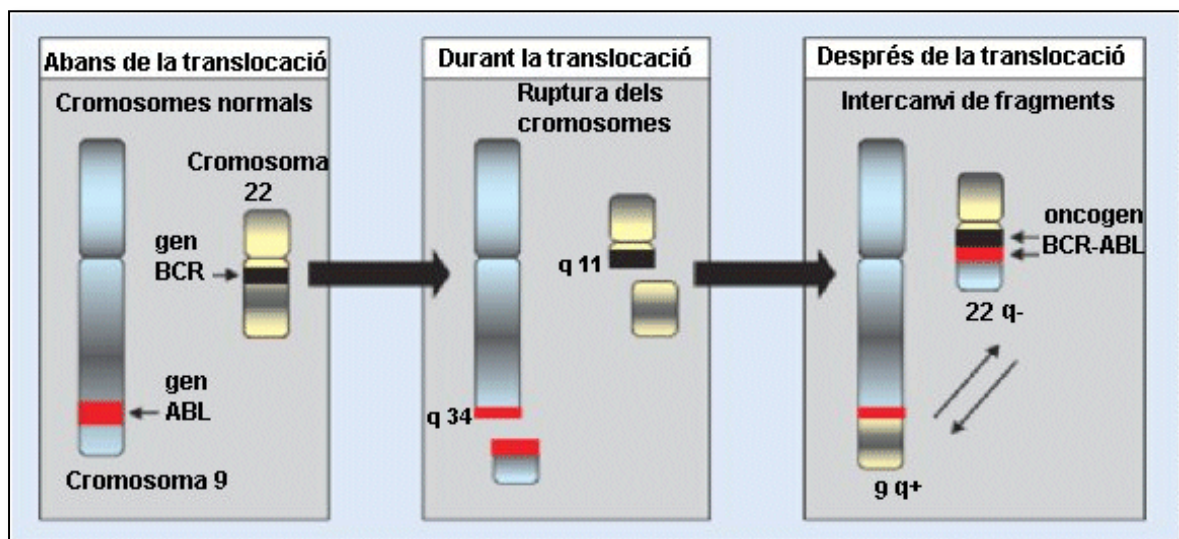
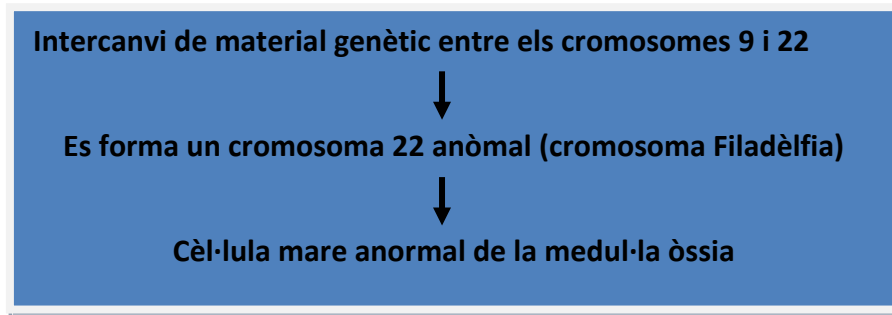


Figura 27. En el primer dibuix s'observen els cromosomes 22 i 9, sense translocació, és a dir, normals; en la imatge del centre veiem el trencament dels fragments de cromosomes, que indica el principi de la translocació, i finalment a la última il·lustració veiem el cromosoma Filadèlfia format, és a dir, ja s'ha produït l'intercanvi de fragments entre els cromosomes 22 i 9 i per tant, la formació del nou gen BCR-ABL, situat al cromosoma 22.

Entre molts altres gens, el cromosoma 9 normal conté un gen anomenat ABL. Per altra banda, el cromosoma 22 normal conté, a la seva cadena d'ADN, el gen BCR. Tots dos gens són normals, compleixen funcions essencials i són presents en cadascuna de les nostres cèl·lules. En els casos de leucèmia mieloide crònica es produeix la ruptura dels cromosomes 9 i 22. La regió de fractura del cromosoma 9 se situa en el gen ABL (justament en la regió del cromosoma 9 anomenada q34) i en el punt de fractura del cromosoma 22 se situa el gen BCR (en la regió q 11 del cromosoma 22). La translocació fa que part del gen ABL es fusioni amb part del gen BCR al braç llarg del cromosoma 22, formant-se un gen híbrid mutant, l'**oncogen BCR-ABL**. L'efecte de la fusió d'aquests

dos gens és explosiva; ja que la cèl·lula que conté el gen BCR-ABL deixa de ser normal i es transforma en cancerosa. El gen mutant BCR-ABL del cromosoma 22 queda permanentment activat i fa que la cèl·lula es divideixi sense parar i sense control, originant-se així un tumor. El gen recíproc ABL-BCR que es forma en el cromosoma 9, com a resultat de la translocació, no sembla tenir cap activitat funcional en la malaltia.

L'oncogen BCR-ABL del cromosoma Filadèlfia és present a les cèl·lules mieloides de la medul·la òssia i als granulòcits de la sang dels malalts amb LMC (però no en les cèl·lules d'altres òrgans) i és el responsable de l'aparició de la malaltia, ja que dóna les instruccions a la cèl·lula per fabricar de forma contínua una proteïna anòmala, la **proteïna BCR-ABL amb activitat tirosina quinasa augmentada**. Aquesta proteïna és un enzim (una biomolècula catalitzadora) que actua de la forma següent:

1. Afavoreix la proliferació cel·lular, ja que activa una sèrie de proteïnes i enzims que intervenen en el cicle de divisió cel·lular, de manera que s'incrementa la multiplicació cel·lular, independentment de la presència o absència de factors de creixement en el medi.
2. Frena l'apoptosi cel·lular, és a dir, inhibeix la mort de la cèl·lula genèticament programada quan es produeix deteriorament o dany en l'ADN, estrès cel·lular o envelliment cel·lular. Com que la proteïna BCR-ABL augmenta la resistència a l'apoptosi en les cèl·lules leucèmiques, es produeix un increment d'aquestes cèl·lules al llarg del temps
3. Altera l'adhesió de les cèl·lules sanguínies immadures a l'estroma medul·lar, per la qual cosa poden migrar fàcilment des de la medul·la òssia cap als capil·lars sanguinis, escapant així dels mecanismes que controlen la proliferació i diferenciació cel·lular exercits habitualment a nivell medul·lar .
4. D'altra banda, inhibeix la reparació de l'ADN, causant la inestabilitat del genoma, la qual cosa afavoreix que la cèl·lula esdevingui cancerosa.

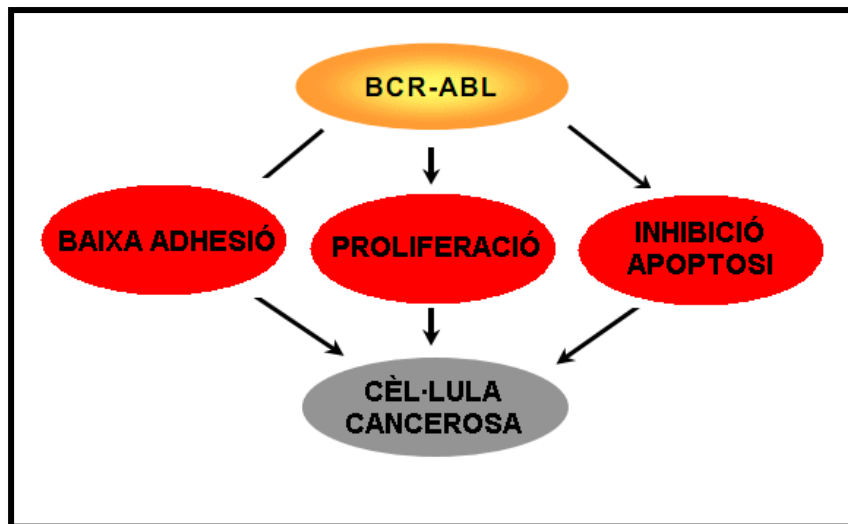


Figura 28. Accions de la proteïna BCR-ABL.

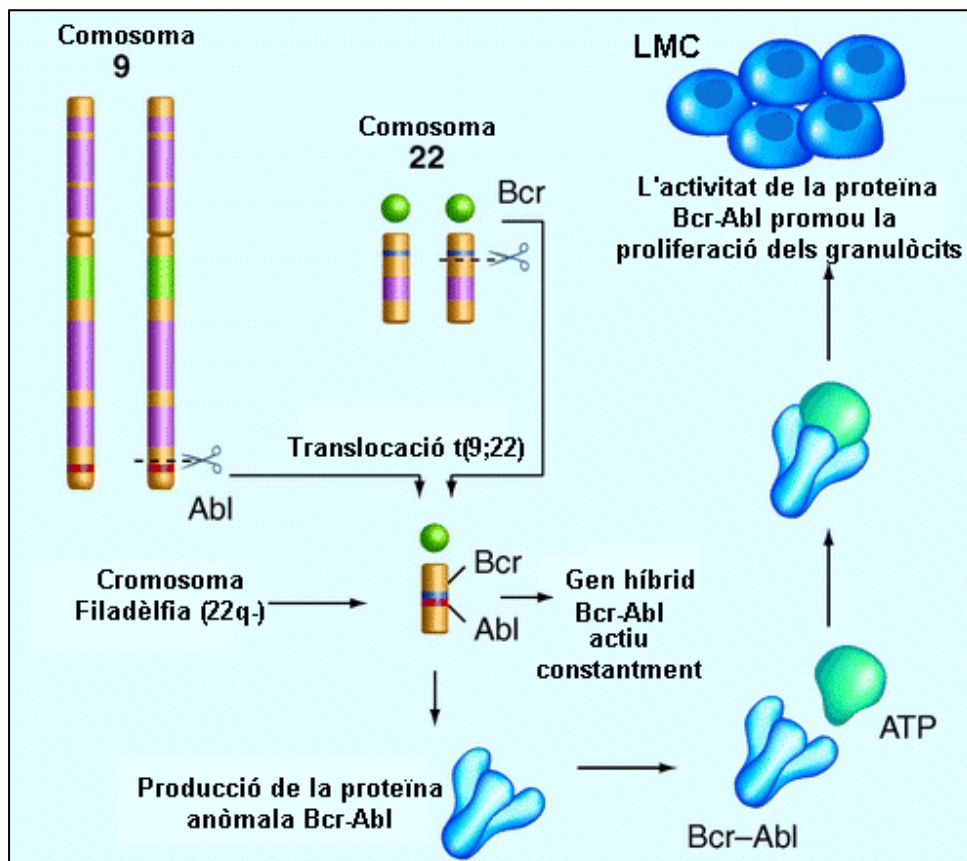


Figura 29. La proteïna Bcr-Abl induïx la proliferació dels glòbuls blancs mieloides.

En realitat s'han detectat tres tipus de proteïnes BCL-ABL, ja que la mida de la proteïna depèn de la zona de ruptura del gen BRC. Les mides de les proteïnes BCR-ABL identificades corresponen a 190 kD, 210 kD i 230 kD. La proteïna de 210 kiloDaltons és

la responsable, en la majoria dels casos, de les anormalitats detectades en la fase crònica de la malaltia. És la proteïna que s'observa en més d'un 95% dels pacients amb LMC.

4.3. CAUSES DE L'APARICIÓ DEL CROMOSOMA FILADÈLFIA

Els científics encara no han pogut trobar les causes i els factors de risc que expliquin amb certesa per què apareix l'oncogen BCR-ABL en algunes persones i en altres no. No obstant, una possible causa de la translocació entre el cromosoma 9 i el 22 és l'exposició a grans quantitats de radiacions ionitzants, com va succeir en l'accident nuclear de Txernòbil, o en rebre tractaments mèdics de radioteràpia, utilitzats anteriorment per tractar un altre tipus de càncer. Malgrat això, la majoria de les persones que han estat sotmeses a un tractament de radiacions no desenvolupa una LMC. L'exposició a certes substàncies químiques cancerígenes, com ara el benzè, pot provocar l'aparició de la LMC. El benzè afavoreix l'aparició de mutacions; s'utilitza àmpliament en la indústria química i també es troba en el fum del tabac i en la benzina.

4.4. INCIDÈNCIA

Cada any es diagnostiquen aproximadament 15 casos nous de leucèmia mieloide crònica per milió d'habitants. La leucèmia mieloide crònica representa entre el 15 i el 20% dels casos de leucèmia en adults. És rara l'aparició de LMC en infants, ja la freqüència d'aquesta malaltia en la població infantil correspon només al 2% dels casos diagnosticats. L'aparició de la malaltia es dona en un rang d'edat dels 45 als 60 anys, tot i que l'edat mitjana en què apareix la malaltia se situa entorn dels 53 anys. La incidència d'aquesta malaltia és lleugerament major en homes que en dones (1,4 homes/1 dona).

4.5. SÍMPTOMES

En les primeres etapes de la malaltia, el pacient pot romandre totalment asimptomàtic durant força temps. A mesura que evoluciona la malaltia, el pacient pot experimentar alguns dels símptomes següents:

- Entre els primers símptomes, a causa de la migració dels granulòcits des de la medul·la òssia vermella cap a altres òrgans, molts pacients presenten molèsties degudes a l'engrossiment de la melsa (esplenomegàlia); pot haver dolor i una sensació de pes a la regió abdominal esquerra, que s'accentuen després de menjar; fins i tot es pot arribar a percebre un bony abdominal.
- Debilitat i fatiga a l'hora de realitzar les activitats diàries.
- Febre.
- Sudoració nocturna.
- Pèrdua de pes.
- Pigmentació pàl·lida a causa de l'anèmia.
- Petites infeccions.
- Dolors en els ossos i articulacions.
- Hemorràgies a causa de la manca de plaquetes, i hematomes no justificats.

Tots aquests símptomes, però, solen desaparèixer en rebre el tractament i el pacient roman estable fins que no avança la malaltia.

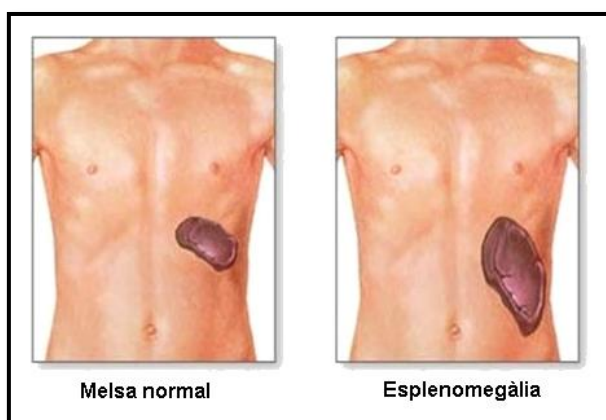


Figura 30. L'esplenomegàlia o engrossiment de la melsa és un dels primers símptomes de la LMC.



Figura 31. Hemorràgies cutànies i hematomes en un malalt amb leucèmia mieloide crònica.

4.6. FASES DE LA LMC

En la evolució de la leucèmia mieloide crònica LMC es poden distingir tres estadis característics: la **fase crònica**, la **fase d'acceleració** i la **crisi blàstica**. En la majoria dels casos, aquesta malaltia és diagnosticada en la primera fase, tot i que en alguns pacients la diagnosi es realitza en les altres dues fases perquè la primera sovint esdevé asimptomàtica.

Un percentatge baix dels pacients diagnosticats en la fase crònica evolucionen cap a la fase d'acceleració perquè deixen de respondre positivament al tractament que segueixen, de manera que la malaltia evoluciona cap a les fases més agressives i, per tant, el malalt experimenta un empitjorament notable. Normalment, el pas de la fase crònica a les fases d'acceleració i crisi blàstica està associat a alteracions addicionals en els gens de les cèl·lules leucèmiques. Malauradament, són pocs els casos en què s'identifiquen aquestes mutacions addicionals al laboratori amb les proves convencionals de diagnosi.

4.6.1. FASE CRÒNICA

Aquesta fase té una durada variable, essent el promig de 4 a 6 anys. Es caracteritza per una sobreproducció de cèl·lules mieloides immadures i granulòcits madurs. Generalment, és una fase que progressa de forma asimptomàtica, però en aquesta etapa es detecta un increment del nombre de leucòcits i plaquetes; i el recompte de cèl·lules blàstiques (immadures) és inferior al 10 %. Aquestes característiques fan que no sigui fàcil diferenciar una leucèmia mieloide crònica en la primera etapa d'una leucèmia aguda.

En alguns casos, els pacients poden presentar fatiga, pal·lidesa i debilitament, per falta de glòbuls vermells normals i el conseqüent dèficit d'oxigen als teixits. És freqüent que consultin al metge per distensió abdominal a causa d'una esplenomegàlia (creixement

de la melsa) i, en alguns casos, per hepatomegàlia (creixement del fetge) o també per febre, sudoració nocturna i pèrdua de pes sense motiu aparent. En els casos més extrems, pot aparèixer insuficiència renal.

El 80-85% dels pacients són diagnosticats en aquesta fase, generalment després d'un anàlisi de sang rutinari en què es posa de manifest l'augment de leucòcits a la sang. És una fase inicial i estable de la malaltia, amb bon pronòstic. Quan els malalts inicien el tractament, els paràmetres sanguinis assoleixen els valors normals en poc temps. Un cop tractats, la majoria dels pacients diagnosticats en aquesta etapa pot fer vida normal.

4.6.2. FASE D'ACCELERACIÓ

Aquesta fase té una durada d'uns 18 mesos, tot i que en alguns casos pot progressar a la fase blàstica en tan sols 6 o 8 mesos.

En aquest estadi de la LMC es dona una menor resposta al tractament. És una fase que es caracteritza per una major esplenomegàlia, leucocitosi que no respon al tractament, disminució del nombre de cèl·lules sanguínies normals, un increment dels blasts o formes cel·lulars immadures del 10 al 30% en la sang perifèrica i en la medul·la òssia, un augment del 20 % dels basòfils en la sang, una disminució del nombre de les plaquetes, i **evolució clonal**, és a dir, l'aparició d'altres mutacions addicionals (anomalies citogenètiques diferents a la translocació entre el cromosoma 9 i el 22). En cas que un pacient presenti una o més d'aquestes característiques es considera que es troba en la fase accelerada de la malaltia. En aquest estadi, els malalts presenten febre, anèmia greu, fatiga, infeccions, hemorràgies i dolor als ossos.

No es coneixen bé els factors que promouen el pas de l'etapa crònica a la fase d'acceleració, però l'aparició d'aquesta segona fase sovint s'associa amb les noves alteracions cromosòmiques que sorgeixen, com l'aparició de còpies addicionals del cromosoma Filadèlfia, una trisomia (tres còpies) del cromosoma 8 o del 19, o bé una deleció (pèrdua d'un fragment) en el cromosoma 17.

No tots els pacients passen per la fase accelerada, alguns evolucionen directament de la fase crònica a la crisi blàstica.

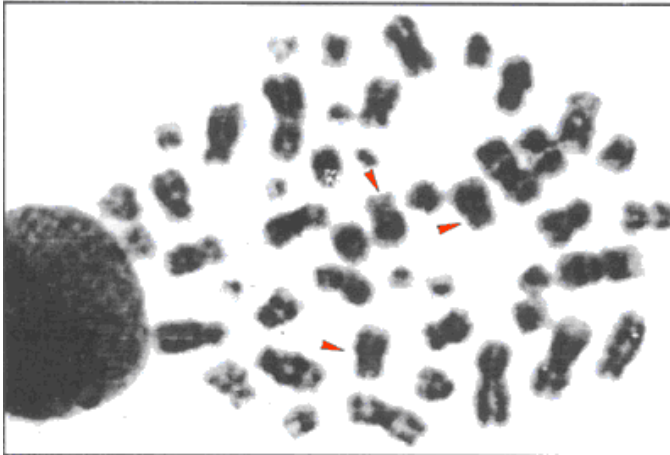


Figura 32. Trisomia del cromosoma 8 (apareixen tres cromosomes 8 en lloc de dos) en un pacient amb LMC en fase accelerada.

4.6.3. CRISI BLÀSTICA

En aquesta fase, el nombre de blasts s'incrementa notablement ja que al menys 1/3 de les cèl·lules de la medul·la òssia i la sang són cèl·lules immadures. Poden aparèixer cúmuls d'aquestes cèl·lules en forma de tumors a nivell dels ossos o ganglis. El nombre d'eritròcits, plaquetes i neutròfils normals disminueix encara més que en les altres fases, fet que produeix episodis infecciosos repetitius i hemorràgies. El pacient està més cansat cada vegada, experimenta pèrdua significativa de pes i, a més, presenta dolor ossi, insuficiència respiratòria i dolor abdominal per un creixement excessiu de la melsa i el fetge. En el 85% dels pacients que es troben en aquesta fase, la LMC es transforma en una leucèmia mieoloblàstica aguda, i en el 25 % dels pacients esdevé una leucèmia limfoblàstica aguda. Si el pacient no respon als tractaments, el temps de vida en aquesta fase és de 2 a 4 mesos.

Tant la fase accelerada com la blàstica són considerades fases avançades de la malaltia, i el 15% dels pacients amb LMC són diagnosticats en aquests estadis.

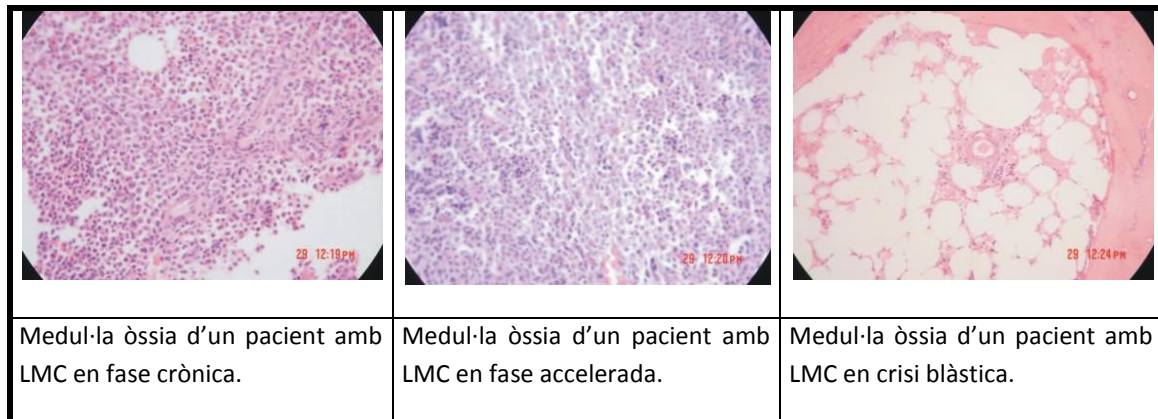


Figura 33. Evolució de la leucèmia mieloide crònica. Es pot observar l'increment de cèl·lules blàstiques a la medul·la òssia a mesura que evoluciona la malaltia.

4.7. DIAGNÒSI

Per realitzar una diagnosi completa d'una LMC s'ha d'analitzar la sang perifèrica i la medul·la òssia del pacient. La diagnosi es farà mitjançant una visualització al microscopi de les cèl·lules de la sang, una aspiració i biòpsia de medul·la òssia, un estudi citogenètic i un estudi molecular. L'exploració física del pacient també pot ajudar a la diagnosi, sobretot si es detecta esplenomegàlia acompanyada d'altres símptomes característics de la LMC.

4.7.1. ANÀLISI SANGUÍNIA

Aquesta prova ens permet observar i fer el recompte de les cèl·lules que hi ha a la sang. En una LMC trobarem canvis en les característiques normals de les cèl·lules sanguínies:

- Leucocitosi: augment en el nombre de leucòcits a la sang.
 - Neutrofília: increment del nombre de neutròfils.
 - Eosinofília: augment en el nombre d'eosinòfils.
 - Basofília: increment del nombre de basòfils.

- Mielèmia: presència, a la sang, de cèl·lules precursorses o immadures que normalment es troben només a la medul·la òssia, com ara els mielòcits.
- Disminució en els nivells d'hemoglobina.

El valor normal de leucòcits d'una anàlisi de sang és de 5.000-11.000 leucòcits/mm³. En la leucèmia mieloide crònica, la xifra total de leucòcits és en general superior a 50.000 leucòcits/mm³; sovint supera els 100.000/mm³ i, de vegades, els 200.000/mm³. Generalment, hi predominen els metamielòcits i els granulòcits madurs.

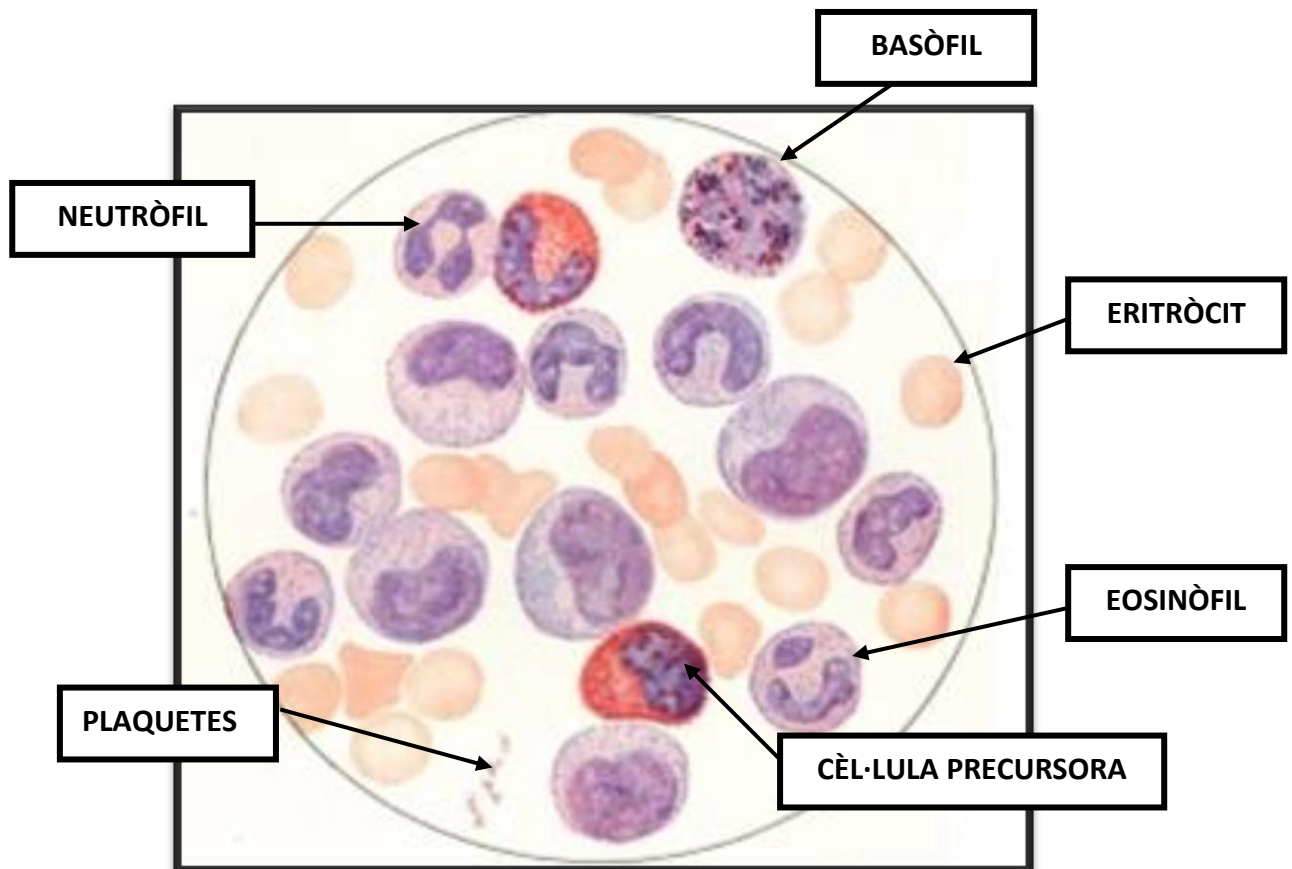


Figura 34. Microfotografia de la sang capil·lar d'un pacient amb LMC, en què observem una leucocitosi.

4.7.2. ASPIRACIÓ MEDUL·LAR I BIÒPSIA DE LA MEDUL·LA ÒSSIA

L'aspiració i biòpsia de la medul·la òssia són proves especialment útils, perquè posen de manifest la infiltració cel·lular exagerada, les característiques concretes de les cèl·lules leucèmiques i la disminució d'altres cèl·lules hematològiques, ja que són desplaçades pels leucocits cancerosos.

L'**aspiració medul·lar** és una tècnica senzilla, tot i que pot resultar una mica molesta. Consisteix a introduir una agulla bastant fina en un os fàcilment accessible com la cresta dels ossos ilíacs. Quan la punta de l'agulla arriba a interior de l'os, s'hi adapta una xeringa i s'aspira de manera que s'obté una petita quantitat de medul·la òssia. La prova es realitza sota anestèsia local. La mostra obtinguda, després de procedir a les tincions adequades, és examinada al microscopi. Si s'ha pogut obtenir una quantitat suficient de medul·la òssia, s'observa en primer lloc si és rica en cèl·lules o bé en conté poques. Així, es poden determinar les característiques de les cèl·lules de la medul·la i s'obté el **mielograma**, que és la relació detallada de la proporció en què es troben els diversos tipus de cèl·lules. Els paràmetres que permet interpretar el mielograma són:

- La quantitat global de cèl·lules a la medul·la òssia.
- La proporció leucoeritroide: el nombre de cèl·lules blanques per cada cèl·lula nucleada vermella, és a dir, sense comptar els eritròcits madurs.
- El recompte diferencial i el grau de maduració. Després de fer el recompte de 500 elements cel·lulars, el mielograma permet obtenir els percentatges dels diferents tipus cel·lulars de la medul·la òssia i del seu grau de maduració. A l'hora de diagnosticar una LMC, caldrà posar especial atenció en els percentatges de cèl·lules blàstiques, basòfils i eosinòfils.
- La morfologia cel·lular permet avaluar la presència de cèl·lules anormals, com ara les cèl·lules tumorals.
- Mitjançant tècniques especials de citoquímica es pot determinar el contingut cel·lular, identificant alguns components químics d'interès, com ara la fosfatasa

alcalina, lípids, glicogen, etc. Això permet reconèixer a quin llinatge cel·lular pertanyen les cèl·lules o acabar de determinar quina patologia sanguínia presenta el pacient.

De vegades, no es pot obtenir una quantitat suficient de medul·la òssia per realitzar un estudi correcte, o bé els resultats que se n'obtenen són dubtosos; aleshores, pot ser convenient realitzar una biòpsia medul·lar.

- La **biòpsia de la medul·la òssia** ha d'ésser realitzada sempre amb anestèsia local, ja que la punció és efectuada amb una agulla més gruixuda per tal d'obtenir un fragment d'os de 3 a 5 cm de longitud. La biòpsia constitueix un estudi histològic més ampli i detallat que el de l'aspiració, ja que permet descobrir cèl·lules anormals que poden passar desapercebudes, valorar amb més exactitud la capacitat hematopoètica⁷ de la medul·la òssia, o bé establir un pronòstic sobre la possibilitat de recuperació. D'altra banda, en el cas de la LMC, la biòpsia de la medul·la òssia permet determinar el grau d'expansió de les cèl·lules mieloides a l'espai medul·lar, i el grau de reducció de les llacunes grasses de la medul·la òssia.

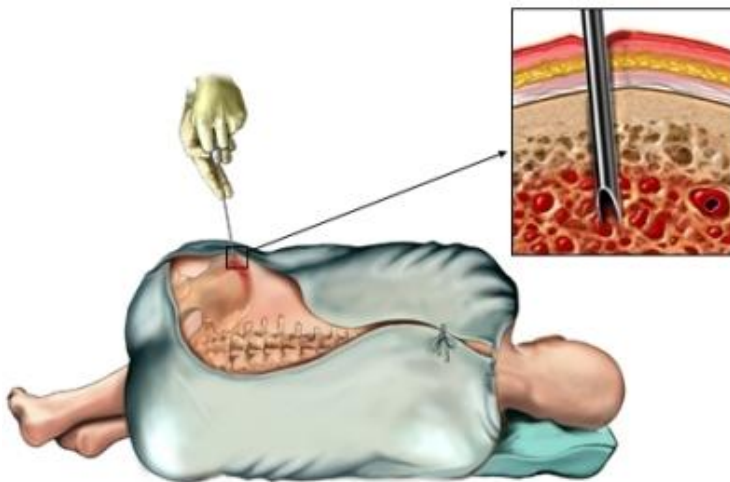


Figura 35. Procés emprat a l'hora de realitzar una biòpsia de la medul·la òssia de la cresta ilíaca posterior.

⁷ Capacitat de formar, madurar i alliberar a la sang els diferents tipus de cèl·lules sanguínies.

4.7.3. DIAGNOSI AMB TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

Abans d'explicar les tècniques de Biologia Molecular emprades en la diagnosi de la leucèmia mieloide crònica, cal conèixer l'estructura de l'ADN i el mecanisme de producció de proteïnes a partir de la informació continguda a l'ADN del nucli de la cèl·lula.

ESTRUCTURA I FUNCIO DELS ÀCIDS NUCLEICS

Els **àcids nucleics** són unes biomolècules formades per seqüències nucleòtids⁸, encarregades d'emmagatzemar i difondre la informació genètica. Hi ha dos tipus d'àcids nucleics: l'ADN i l'ARN.

L'**ADN** (àcid desoxiribonucleic) està format per dues cadenes de desoxiribonucleòtids o nucleòtids d'ADN. Cada desoxiribonucleòtid està constituït per un grup fosfat, un sucre, que en el cas del DNA és la desoxiribosa, i una de les següents bases nitrogenades: adenina, guanina, timina o citosina.

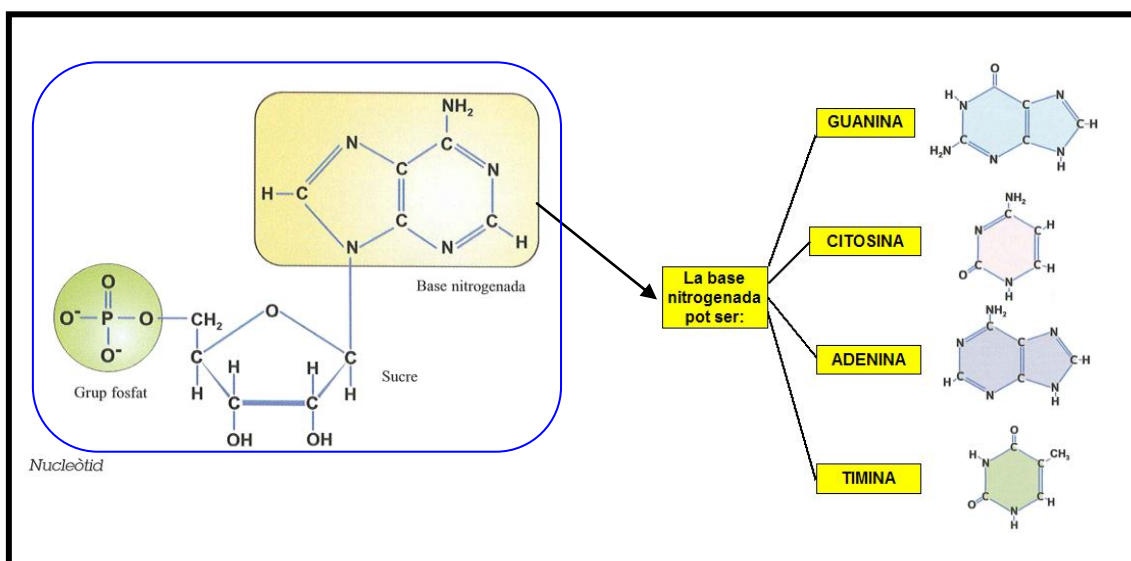


Figura 36. Estructura dels nucleòtids de l'ADN.

⁸ Unitats estructurals bàsiques dels àcids nucleics, és a dir, els àcids nucleics estan formats per l'encadenament de nucleòtids. També es poden trobar lliures a totes les cèl·lules.

Les bases nitrogenades dels nucleòtids de les dues cadenes s'aparellen entre elles, formant la doble hèlix d'ADN. La guanina sempre s'aparella amb la adenina, mentre que la timina sempre s'uneix amb la citosina. Les dues cadenes aparellades es disposen de forma antiparal·lela.

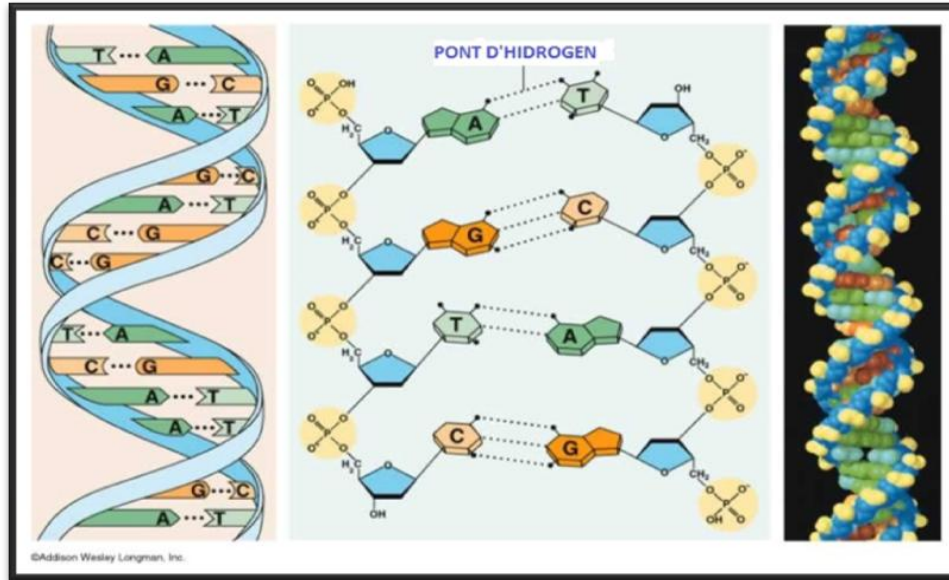


Figura 37. Imatge en què a la esquerra veiem un fragment de DNA en forma d'hèlix, al mig l'estructura i l'enllaç entre bases nitrogenades dels nucleòtids de les dues cadenes, i a l'esquerra, una microfotografia amb color del DNA. (C= citosina, G= guanina, A= adenina, T= timina).

L'**ARN** (àcid ribonucleic), en canvi, està format per una sola cadena de ribonucleòtids. Cada ribonucleòtid o nucleòtid d'ARN està constituït per un grup fosfat, un sucre, que en el cas de l'ARN és la ribosa, i una de les següents bases nitrogenades: adenina, guanina, citosina o uracil.

Les cèl·lules humanes, com totes les cèl·lules eucariotes⁹, tenen tres parts fonamentals: un embolcall anomenat membrana plasmàtica, un medi intern o citosol, i un nucli on es troba l'ADN. Les cèl·lules posseeixen material genètic en forma d'**ADN**, el material hereditari dels gens, que conté les instruccions per a la fabricació de les proteïnes i el funcionament cel·lular, així com **ARN**, necessari per tal que l'ADN s'expressi. Els diferents gens, com ara el gen BCR-ABL implicat en la LMC, són porcions

⁹ Cèl·lules que tenen el seu material hereditari fonamental (la seva informació genètica, ADN) tancat dins d'una membrana cel·lular doble, l'embolcall nuclear, que delimita un nucli cel·lular. Són presents en els animals i vegetals.

d'àcid desoxiribonucleic (ADN) que porten la informació necessària per a la fabricació de les proteïnes, de manera que el gen s'expressa a partir de la proteïna per a la qual codifica. L'ADN és una macromolècula que no pot sortir del nucli de la cèl·lula, però la maquinària cel·lular per fabricar les proteïnes es troba al citosol. Per això, cada gen o fragment d'ADN es **transcriu** a una molècula intermediària, l'ARN (àcid ribonuclèic), que és més petita i pot sortir del nucli, arribant al citosol de la cèl·lula. Allà, la informació continguda en l'ARN és **traduïda** a una seqüència d'aminoàcids¹⁰ que constitueix la proteïna, a través de la qual s'expressa el gen.

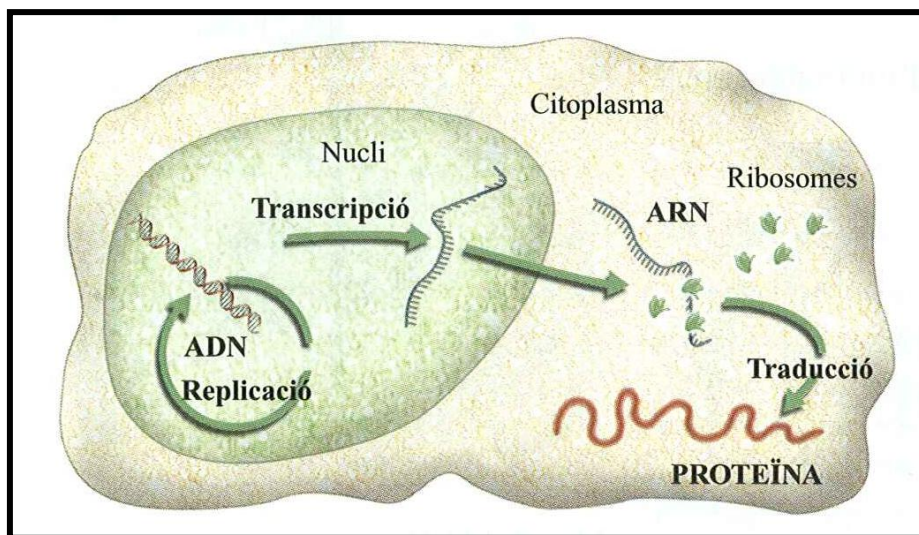
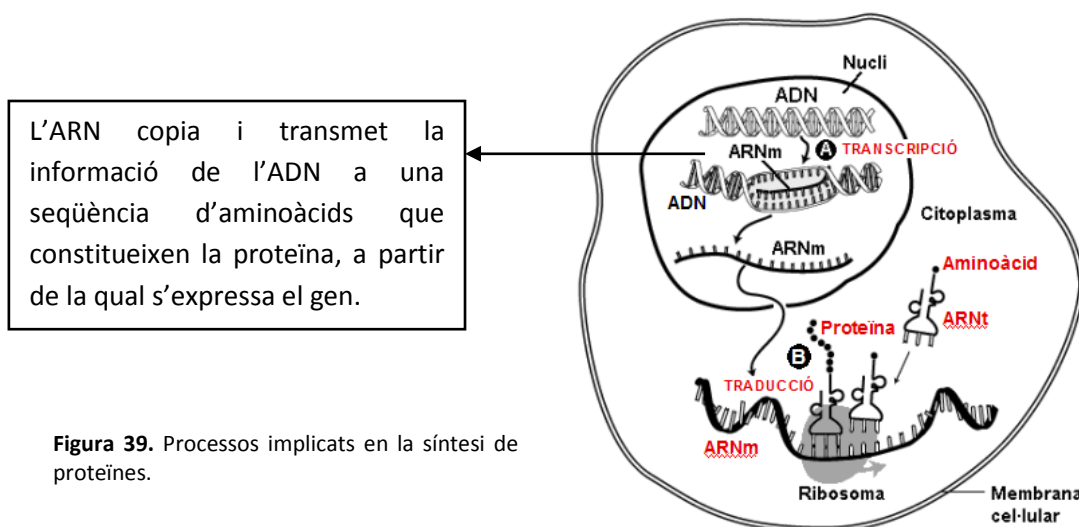


Figura 38. Flux de la informació genètica.



L'ARN copia i transmet la informació de l'ADN a una seqüència d'aminoàcids que constitueixen la proteïna, a partir de la qual s'expressa el gen.

Figura 39. Processos implicats en la síntesi de proteïnes.

¹⁰ Molècules que contenen un grup amino, un grup carboxil i una cadena lateral que varia entre els diferents aminoàcids. Els elements bàsics d'un aminoàcid són el carboni, l'hidrogen, l'oxigen i el nitrogen. Serveixen com a blocs de construcció per a les proteïnes.

Quan té lloc la transcripció de l'ADN a ARN, les dues cadenes d'ADN se separen i, a partir d'una d'elles, es realitza la còpia d'un dels dos filaments de la doble hèlix d'ADN. La còpia resultant és un filament d'ARN. El filament d'ADN que fa de motlle s'anomena filament patró. El fragment d'ADN transcrit correspon a un gen.

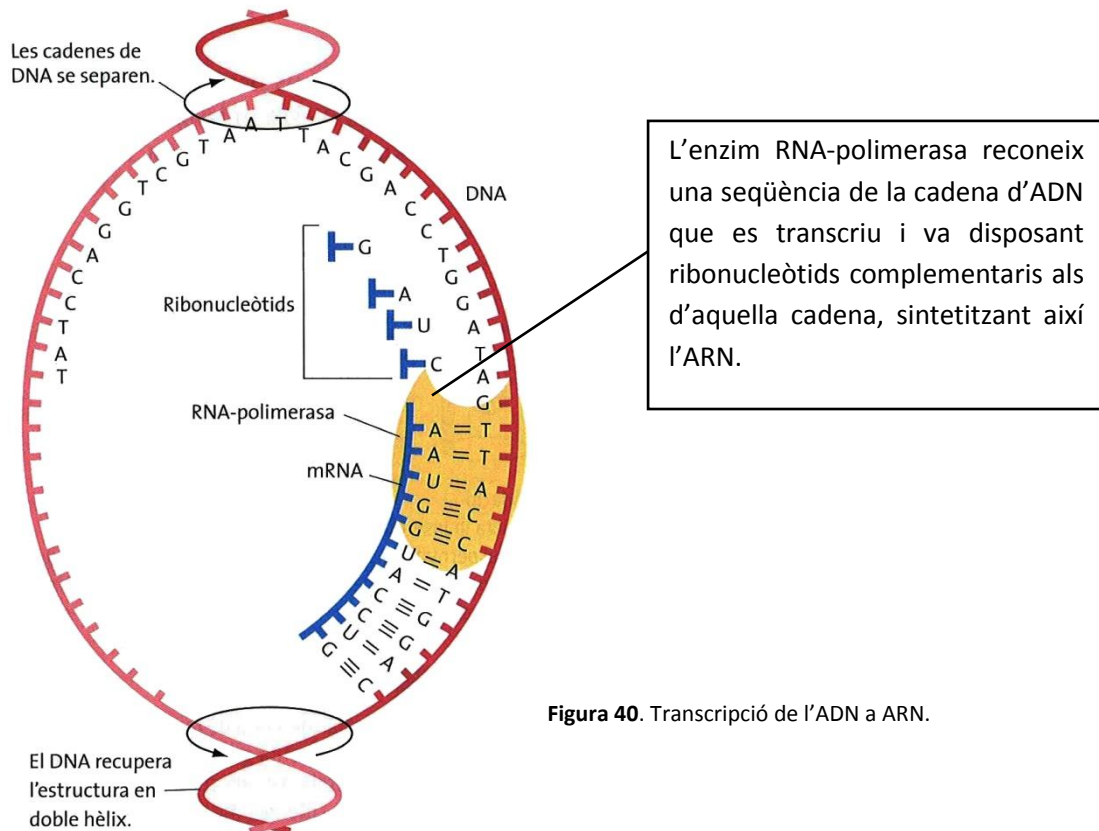


Figura 40. Transcripció de l'ADN a ARN.

L'ARN resultant de la transcripció, anomenat ARN transcrit primari, pateix un procés de maduració més o menys complicat fins a donar l'ARN madur. La majoria dels gens que codifiquen per a les proteïnes són **discontinus** (interromputs), amb **exons** (zones codificants) i **introns** (zones no codificants). En el procés de maduració de l'ARN, s'han de tallar els introns (ja que són parts de l'ARN que no porten informació per a la fabricació de la proteïna) i cal unir els exons (parts de l'ARN amb la informació necessària per fabricar la proteïna), en un procés anomenat *splicing* o empalmament. Per això, el nombre de nucleòtids de l'ARN missatger (ARNm) madur que codifica una proteïna sol ser menor que el nombre de nucleòtids de la cadena d'ADN que va servir de motlle per fer l'ARN, ja que a l'ADN hi ha els introns i els exons, però a l'ARNm madur només hi ha els exons.

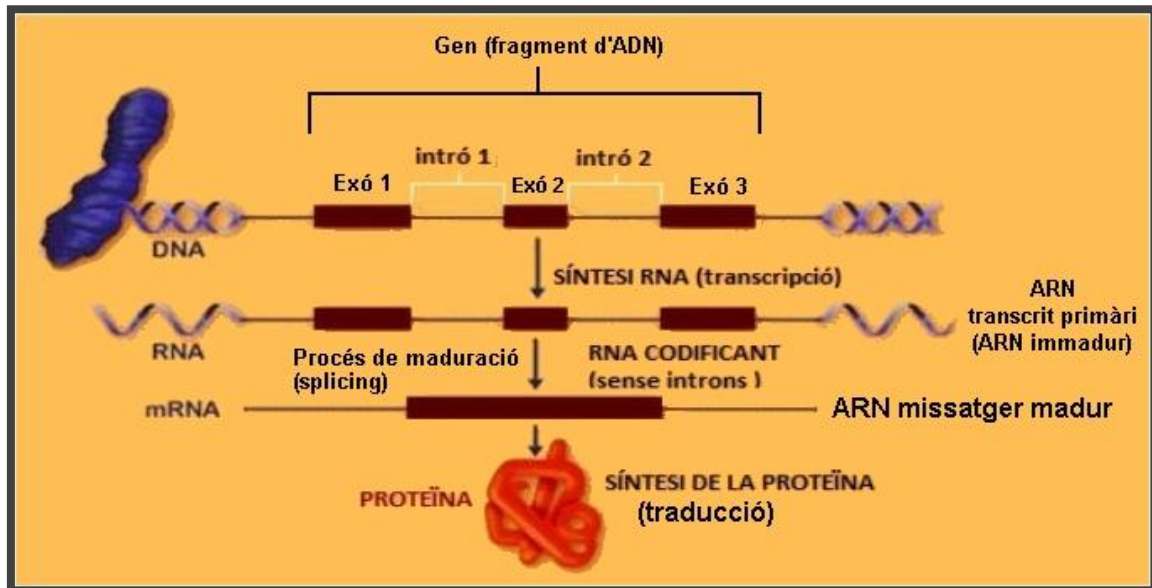


Figura 41. Procés de maduració de l'ARN missatger.

4.7.3.1. DIGANOSI DE LA LMC A PARTIR DE LA PCR

Mitjançant tècniques de biologia molecular es detecta fàcilment la presència del gen híbrid BCR-ABL del cromosoma 22q- (gen anòmal del cromosoma Filadelfia). S'utilitza la tècnica de la **Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)**, la qual permet amplificar un fragment específic de DNA a partir d'una quantitat mínima, en poc temps i en un microtub d'assaig. Per tant, és possible obtenir milions de còpies d'una petita porció de l'ADN, corresponent al gen d'interès, com ara el gen BCR-ABL, posant així de manifest seva la presència en el genoma¹¹ objecte d'estudi. El procés d'amplificació facilita la identificació i l'estudi del gen mutant BCR-ABL, ja que aquesta alteració genètica correspon a un fragment minúscul de la cadena de l'ADN de les cèl·lules afectades del pacient. La tècnica de la PCR permet, per tant, detectar quantitats mínimes del gen BCR-ABL en les cèl·lules d'una persona afectada de LMC.

Actualment s'utilitzen tècniques de PCR quantitativa per poder determinar el nombre de cèl·lules en la sang, que tenen el gen BCR-ABL.

¹¹ És tot el material genètic contingut en els cromosomes de cadascuna de les cèl·lules d'un organisme en particular. El genoma de l'ésser humà conté 3.000 milions de nucleòtids (uns 20.000 gens) El genoma es refereix només al DNA nuclear.

TÈCNICA DE LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

El tècnica de la PCR és basa en la realització de cicles de tres reaccions successives produïdes a temperatures diferents. Aquests cicles es repeteixen entre vint i quaranta vegades.

Per poder dur a terme la tècnica de la PCR es necessiten els components següents:

- El **fragment d'ADN**, corresponent al gen d'interès (ADN motlle).
- Els **encebadors oligonucleòtids** o **primers**, uns segments d'ADN curts i de cadena simple que són complementaris a cada un dels extrems 3' (extrems per on s'inicia la còpia) del fragment d'ADN que es vol amplificar (multiplicar). Els encebadors o primers delimiten la zona de l'ADN que cal amplificar i permeten iniciar la reacció. Per sintetitzar-los al laboratori cal conèixer, al menys, la seqüència de nucleòtids dels extrems del fragment d'ADN que es vol amplificar.
- Un enzim¹² anomenat **ADN polimerasa termoestable** (Taq), capaç de suportar temperatures de 95°C. Va ser aïllat per primer cop el 1979, d'un bacteri hipertermòfil anomenat *Thermus aquaticus* (d'aquí l'abreviatura "Taq"), que viu sotmès a altes temperatures en fonts hidrotermals submarines. La funció d'aquest enzim és unir els nucleòtids que formaran les noves cadenes d'ADN.
- **Cofactors de la polimerasa**: ions necessaris per tal que l'ADN polimerasa termoestable sigui activa.
- **Una solució amortidora** que manté el pH adequat per al funcionament de l'ADN polimerasa.
- **Els quatre tipus de nucleòtids de l'ADN (desoxiribonucleòtids trifosfat d'adenina, timina, guanina i citosina)**, necessaris per sintetitzar les còpies del fragment d'ADN d'interès.

¹² Biomolècula que catalitza les reaccions químiques, és a dir, n'augmenta la velocitat de reacció. Gairebé tots els enzims són proteïnes.

Aquests reactius es barregen en un tub d'assaig que s'introdueix en un aparell anomenat **termociclador**, que fa generalment de 20 a 40 cicles repetits i cada un consta de tres etapes a temperatures diferents.

- 1) **Desnaturalització.** La mostra s'escalfa a 94-96°C, durant uns 10 minuts, per separar les dues cadenes que constitueixen el fragment d'ADN que es vol amplificar.

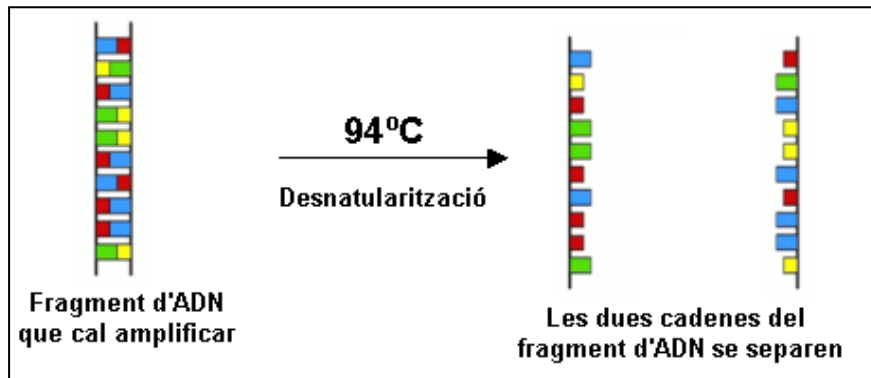


Figura 42. Primera etapa de la PCR: desnaturalització de l'ADN que es vol amplificar.

- 2) **Hibridació o alineament dels encebadors.** Es redueix la temperatura a 50-65°C aproximadament, durant 20-40 segons, per tal que es produeixi l'aparellament o hibridació dels encebadors amb els extrems complementaris en cada una de les cadenes del fragment d'ADN que cal multiplicar. Els encebadors actuen com a límits de la regió de l'ADN per amplificar, és a dir, delimiten el lloc en el qual comença la síntesi de les noves cadenes d'ADN. S'utilitzen dos encebadors diferents, ja que cada un d'ells té la seqüència de nucleòtids complementària a l'extrem d'una de les dues cadenes del fragment d'ADN que s'ha d'amplificar.

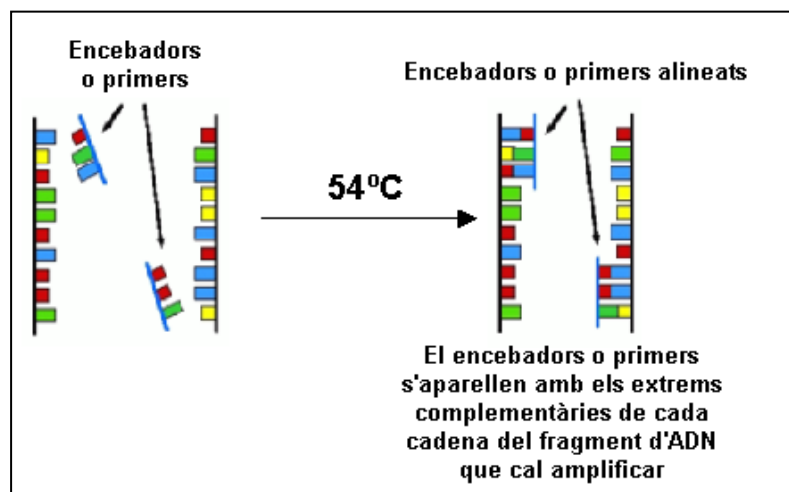


Figura 43. Segona etapa de la PCR: hibridació o alineació dels encebadors.

- 3) **Elongació o extensió de la cadena.** Per realitzar aquest procés, es puja la temperatura de la mostra fins a 72°C, a la qual l'enzim ADN polimerasa estable (Taq) és activa. Partint de l'encebador com a suport inicial necessari per a la fabricació del nou ADN, l'enzim ADN polimerasa sintetitza una nova cadena complementària a cada una de les cadenes motlle del fragment d'ADN inicial, afegint els desoxinucleòtids trifosfat complementaris (dNTPs). Com a regla general, a la seva temperatura òptima, l'ADN polimerasa pot amplificar una cadena d'ADN d'1kb en aproximadament 30 segons. Actualment s'utilitzen ADN polimerases termoestables modificades per tal minimitzar la taxa d'error a l'hora de sintetitzar les noves cadenes d'ADN.

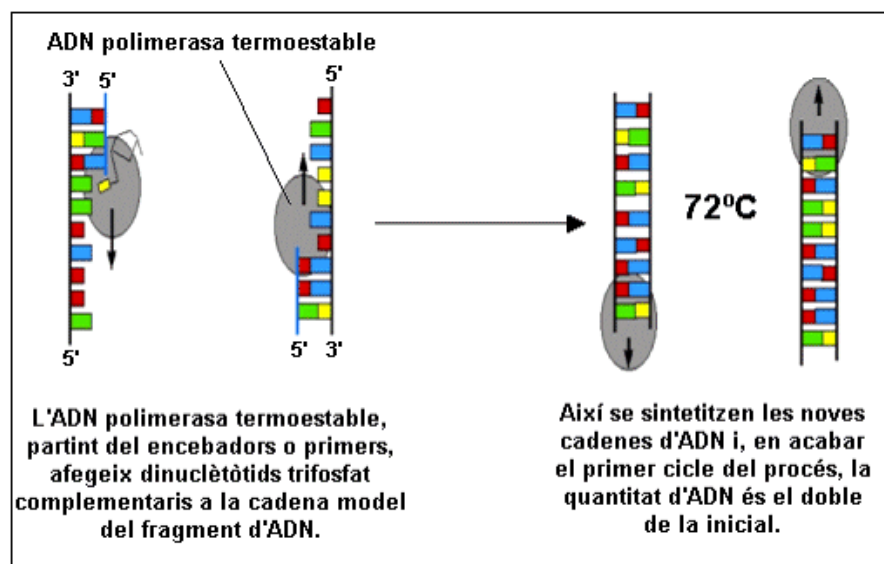


Figura 44. Tercera etapa de la PCR: elongació de cada cadena d'ADN.

Al final d'aquest cicle de tres reaccions (desnaturalització, hibridació i elongació) el tram d'ADN que es volia amplificar, s'ha duplicat. Es repeteix el cicle tantes vegades com sigui necessari, i es duplica la quantitat d'ADN en cada cicle. Finalment, l'ADN amplificat es conserva a 4°C. Després, es poden emprar tècniques d'electroforesi en gel que separen els fragments d'ADN, generats mitjançant la PCR, segons la seva longitud.

Aplicant aquesta tècnica es pot fer un diagnòstic genètic de malalties. Cadascun dels gens, objecte d'estudi, es pot amplificar mitjançant els seus cebadors corresponents i posteriorment se'l pot seqüenciar per detectar l'existència de mutacions. En el cas de

la leucèmia mieloide crònica, la tècnica de la PCR permet amplificar i identificar amb una fiabilitat molt elevada el gen BCR-ABL implicat en aquesta malaltia.

La tècnica de la PCR pot fallar per diverses raons, però normalment els errors són deguts a la seva sensibilitat a la contaminació amb ADN estranys, que a vegades provoca l'amplificació d'ADN "fals". Per això, s'han desenvolupat una sèrie de tècniques i processos per optimitzar la PCR.

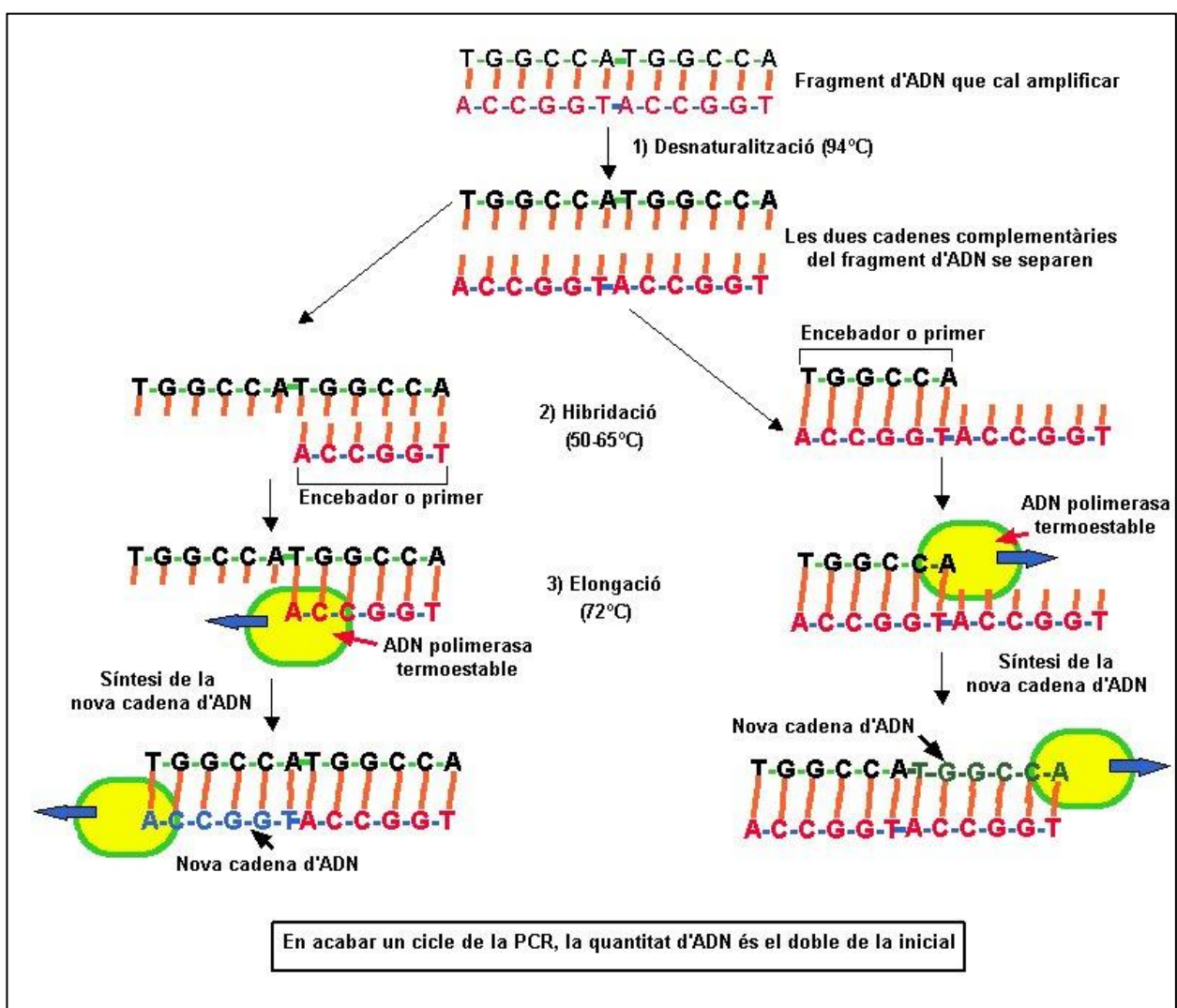


Figura 45. Esquema en què es visualitzen globalment les diferents etapes d'un cicle de la tècnica de la PCR.



Figura 46. Termociclador: màquina que s'encarrega de realitzar i controlar els canvis de temperatura que requereix la tècnica de la PCR

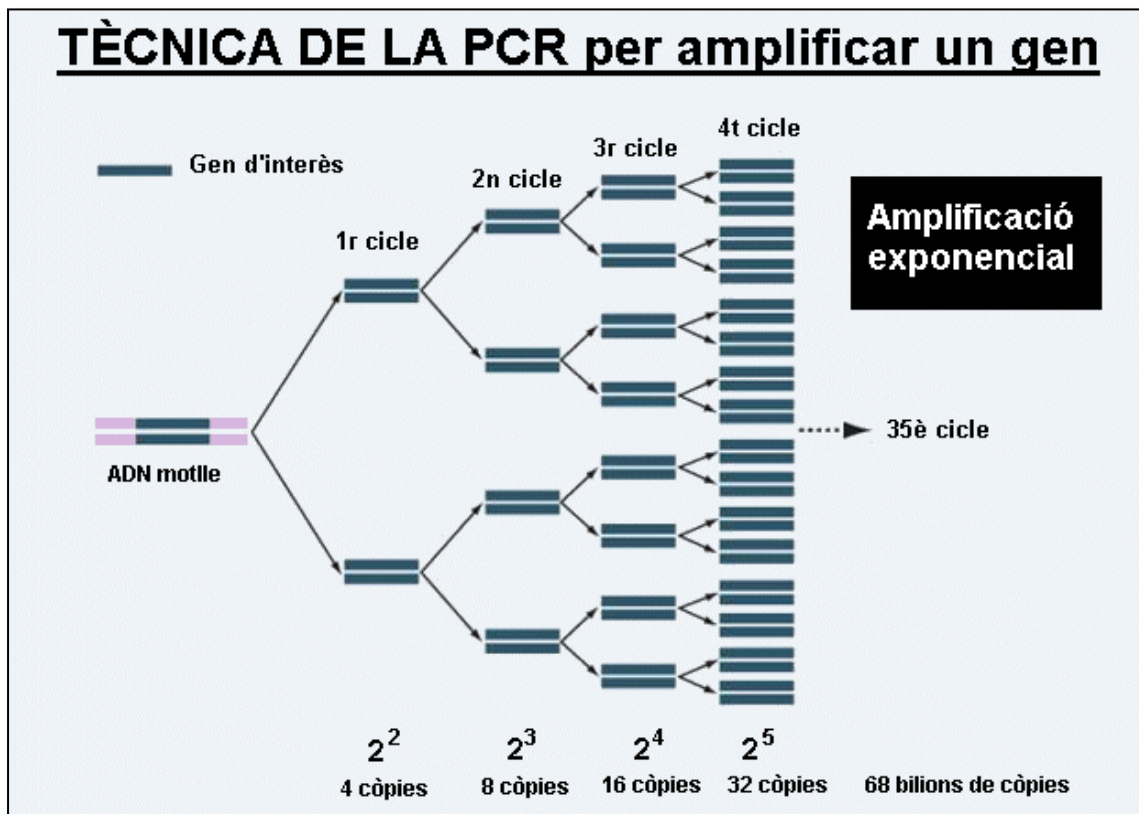


Figura 47. La tècnica de la PCR permet una amplificació exponencial del fragment d'ADN inicial.

Actualment, la presència del gen BCR-ABL es detecta a partir d'una variació de la PCR bàsica, la **tècnica RT-PCR** (transcripció inversa i reacció en cadena de la polimerasa), que permet amplificar un fragment d'ADN, corresponent al gen d'interès, a partir de l'ARN missatger corresponent. Per això, s'aïlla l'ARN dels glòbuls blancs del pacient i s'utilitza la tècnica de transcripció inversa, la qual fa servir l'ARN missatger com a motlle per fabricar una molècula d'ADN complementari (ADNc) formada per una sola cadena de nucleòtids. Aquesta molècula és idèntica a l'ADN del gen BCR-ABL, però no té els introns (zones no codificants) presents a l'ADN original. Tot seguit, s'utilitza l'ADNc com a motlle per realitzar una PCR convencional. Actualment, el mètode de reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa (RT-PCR) és el més sensible per a la detecció d'un nombre molt baix de molècules d'ARN transcrits del gen BCR-ABL.

L'esquema següent mostra el procés de la tècnica RT-PCR.

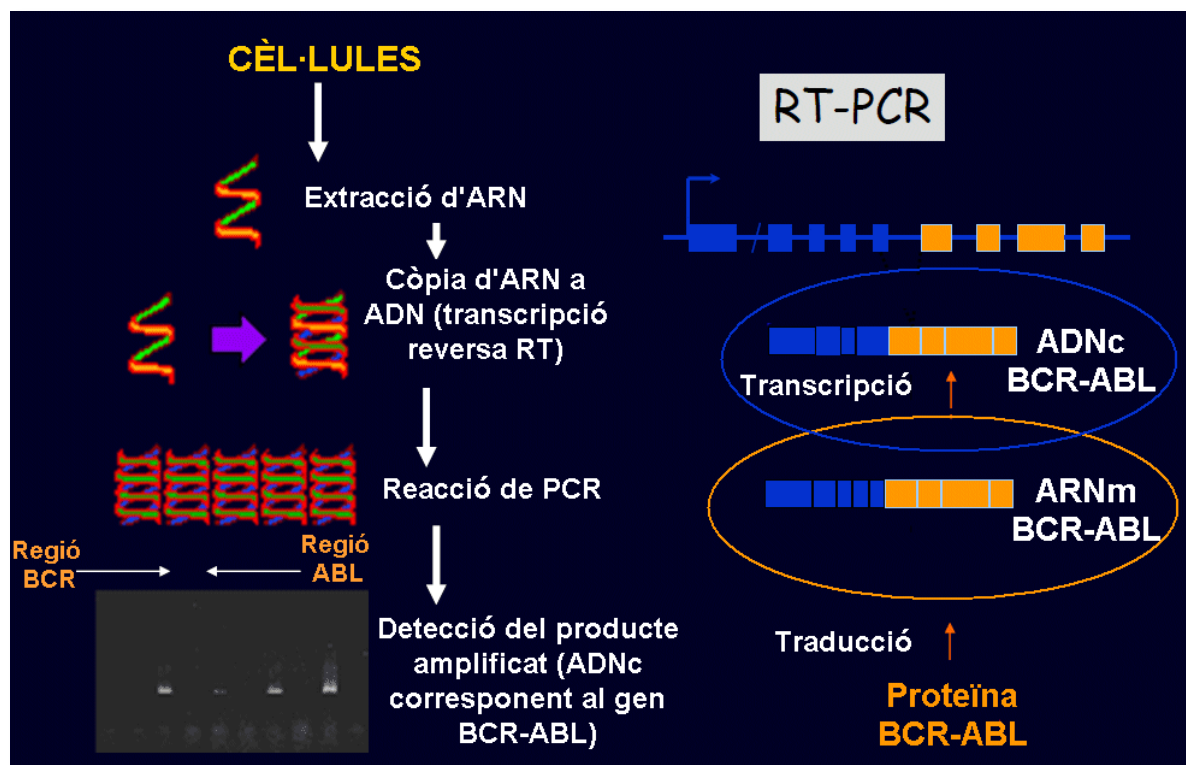


Figura 48. Detecció del gen BCR-ABL a partir de la tècnica de RT-PCR.

4.7.4. ESTUDI CITOGENÈTIC

L'estudi molecular va acompanyat d'un estudi citogenètic que consisteix en l'anàlisi cromosòmic de les cèl·lules del pacient que es realitza mitjançant el cariotip, una composició fotogràfica dels cromosomes d'una cèl·lula ordenats segons un patró estàndard. Amb aquesta prova podem analitzar el nombre, la forma i la mida dels cromosomes, i esbrinar si es detecta o no el cromosoma Filadèlfia.

En el cas de la leucèmia mieloide crònica, l'estudi citogenètic s'acostuma a fer a partir de cèl·lules obtingudes d'una mostra de la medul·la òssia. Mitjançant l'estudi del cariotip al microscopi, podem observar la translocació recíproca entre els cromosomes 9 i 22, en la majoria dels pacients que presenten una LMC. Aquesta prova també serveix per detectar altres mutacions que poden aparèixer en el decurs de l'evolució d'aquesta malaltia.

Aproximadament en el 95% dels casos de les persones amb LMC es detecta el cromosoma Filadèlfia en les seves cèl·lules de la medul·la òssia. La translocació t(9;22) apareix com a única anomalia cromosòmica en la fase crònica de la malaltia i es manté també durant les fases avançades, però entre el 50 i el 80% dels pacients adquireixen anomalies cromosòmiques addicionals a mesura que avança la malaltia. Concretament, les anomalies cromosòmiques secundàries i diferents al cromosoma Filadèlfia resulten les més freqüents en els pacients que es troben en la fase accelerada o en crisi blàstica (81,5% i 96%, respectivament). Els resultats obtinguts confirmen la relació que existeix entre les alteracions cromosòmiques i les diferents fases evolutives de la leucèmia mieloide crònica.

El cariotip es prepara a partir d'una mostra de cèl·lules en divisió activa, com els leucòcits de la medul·la òssia. Cal efectuar-lo en condicions de total esterilitat, seguint els passos següents:

- Es pren la mostra de cèl·lules de la medul·la òssia i es manté en un tub estèril que conté una solució fisiològica amb heparina (anticoagulant) i antibiòtic, per

evitar contaminacions bacterianes. Després se centrifuga per separar els leucòcits de la resta de les cèl·lules, ja que els glòbuls blancs són les úniques cèl·lules sanguínies amb nucli i, per tant, amb cromosomes.

- Per realitzar el cariotip, les cèl·lules han de trobar-se en divisió, per això s'incuben en un flascó estèril en presència d'una substància mitògena que les estimula i indueix la divisió cel·lular o mitosi.
- Després d'unes hores de cultiu, de 24 a 72 hores segons el cas, s'afegeix una substància anomenada colquicina que atura la divisió de les cèl·lules en un etapa anomenada metafase en què els cromosomes són perfectament visibles al microscopi.
- Per tal que els cromosomes se separin, les cèl·lules són sotmeses a una solució hipotònica amb KCl (clorur potàssic), de manera que entra aigua al seu interior i augmenten de volum.
- S'estén la mostra de cèl·lules sobre un portaobjectes. Es fixen i es tenyeixen els cromosomes amb un colorant específic de l'ADN, de manera que en cada cromosoma apareixen unes zones o bandes densament tenyides i altres regions menys tenyides i, per tant, més clares. Cada cromosoma presenta un patró de bandes característic que permet identificar-lo i diferenciar-lo dels altres cromosomes. Aquesta tècnica de tinció rep el nom de "bandeig cromosòmic". Un cop tenyits, els cromosomes s'observen al microscopi i es fotografien, per tal d'estudiar-los i detectar les possibles anomalies.
- Actualment, els cariotips humans se solen preparar mitjançant màquines automatitzades que poden escanejar un portaobjectes amb una càmera de vídeo acoblada al microscopi. La càmera fa una fotografia dels cromosomes del nucli trencat d'una cèl·lula, la imatge és digitalitzada, i els cromosomes es classifiquen i s'ordenen electrònicament mitjançant un ordinador.
- Per fer l'estudi del cariotip, s'observen uns 20 nuclis perquè pot haver-hi molts falsos positius pel fet que s'ha afegit a la mostra substàncies mitògenes, de manera que les cèl·lules s'han dividit de forma ràpida i precipitada, i colquicina

(substància antimitòtica que no deixa progressar la divisió cel·lular més enllà de la metafase); aquests reactius poden provocar mutacions i irregularitats en els cromosomes. Si els 20 nuclis observats no són iguals pot ser a causa d'aquestes substàncies o bé que ens trobem davant d'un organisme amb mutacions que només afectin a determinades línies cel·lulars; llavors hauríem d'estudiar més nuclis.

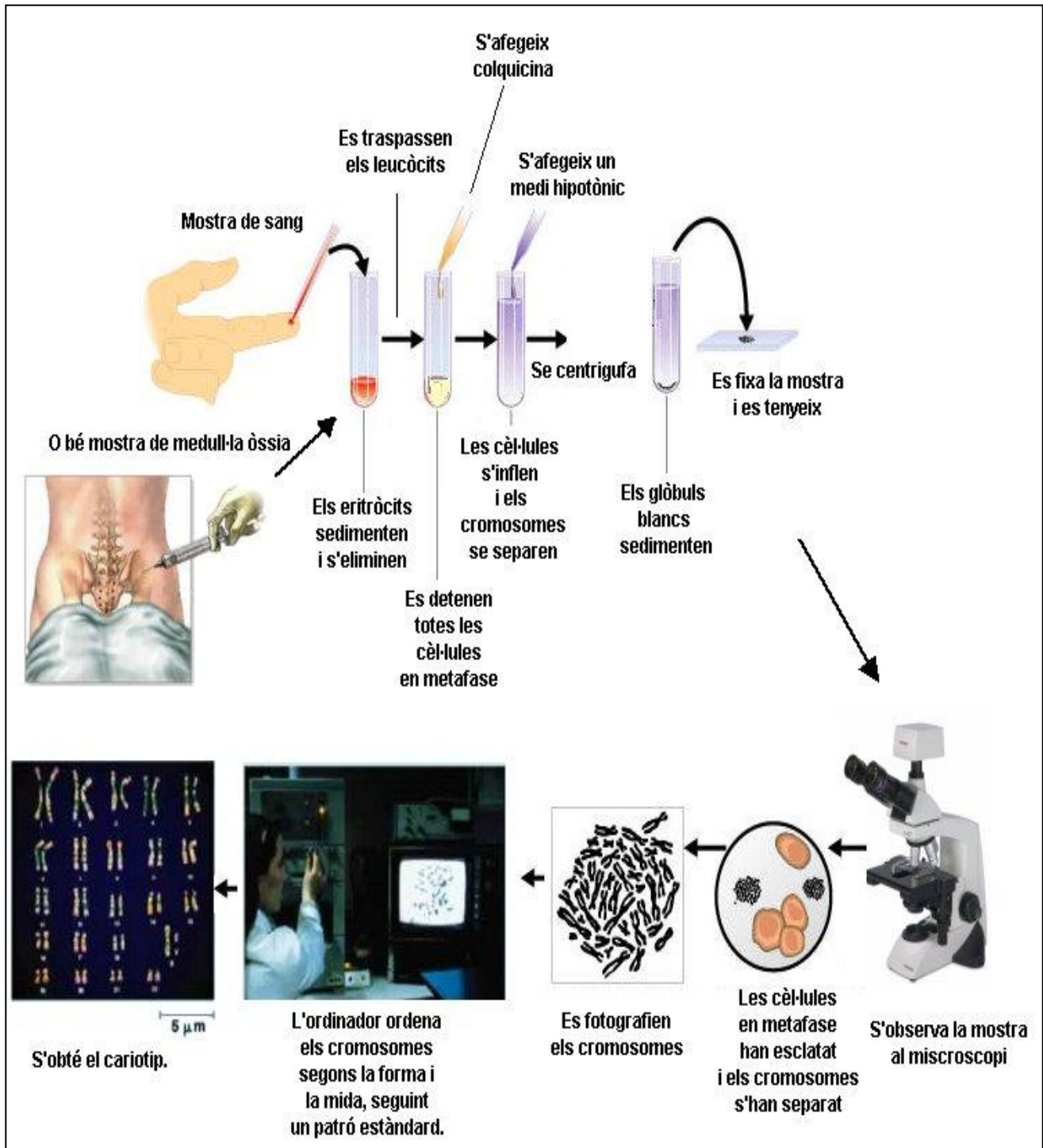


Figura 49. Procés d'elaboració d'un cariotip.

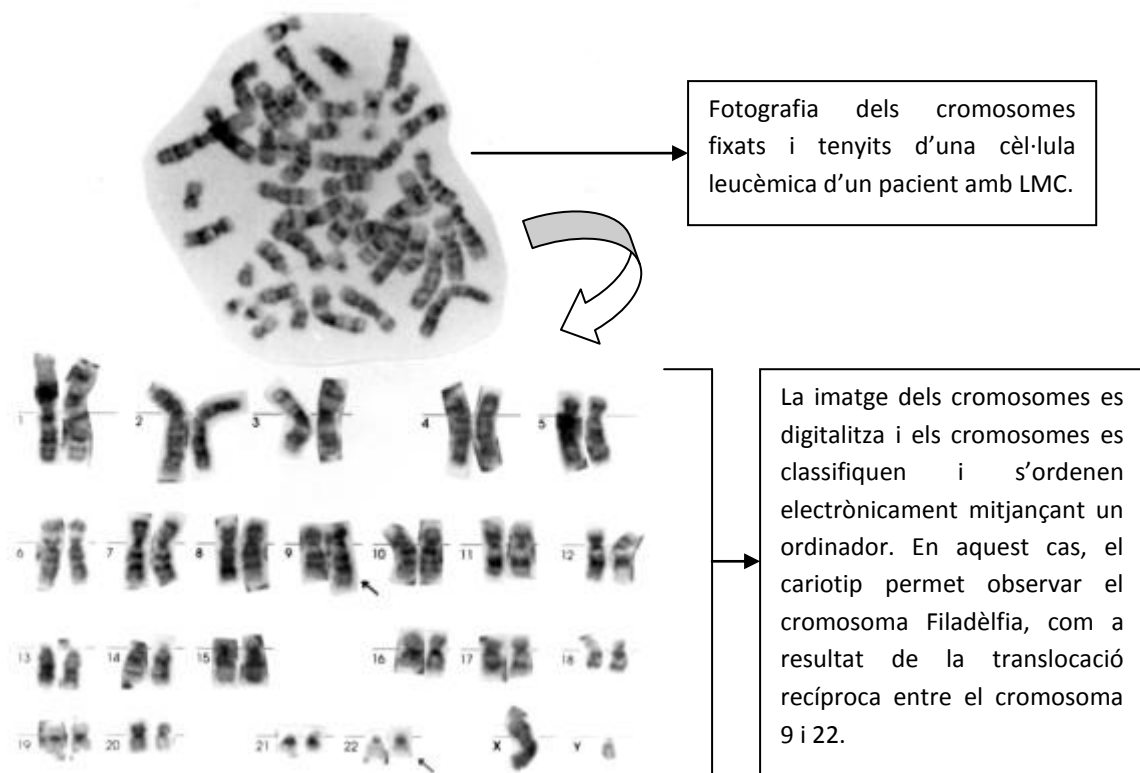


Figura 50. Fotografia dels cromosomes d'un pacient amb LMC que permet elaborar el cariotip d'un pacient amb LMC.

A l'hora d'efectuar les proves de diagnosi de la LMC, cal tenir en compte que, en els pacients que reben tractament, es redueix molt el nombre de cèl·lules canceroses durant la remissió de la malaltia i, per tant, en el moment d'efectuar el cariotip és possible que cap de les cèl·lules en metafase de la mostra tingui el cromosoma Filadèlfia, la qual cosa no vol dir que no existeixi una mínima quantitat de cèl·lules leucèmiques, portadores del cromosoma Filadèlfia (cèl·lules Ph+) en el pacient, que generalment no són detectables per microscopia òptica; llavors es parla de **malaltia mínima residual**. En aquest estadi de la malaltia és necessari emprar tècniques de citogenètica molecular més sensibles, com el mètode FISH, o bé proves de Biologia Molecular, basades en la RT-PCR, per detectar la presència del gen BCR-ABL. Per això, les proves diagnòstiques de citogenètica convencional s'han de complementar amb de proves de biologia molecular o de citogenètica molecular.

4.7.4.1. MÈTODE FISH (HIBRIDACIÓ IN SITU PER FLUORESCÈNCIA)

Aproximadament en un 10 % dels casos, el cariotip realitzat amb la tècnica de citogenètica convencional no permet la diagnosi de la malaltia perquè, com abans hem comentat, en les fases de remissió s'ha reduït el nombre de cèl·lules leucèmiques i és possible que en la mostra utilitzada per a la realització del cariotip no hi hagi cèl·lules canceroses en metafase amb el cromosoma Filadèlfia. Per tant, les tècniques citogenètiques convencionals tenen limitacions. Actualment, s'utilitza una tècnica més complexa de citogenètica molecular, anomenada **FISH (hibridació in situ per fluorescència)**. És una tècnica de tinció dels cromosomes amb fluorocroms¹³, amb la qual s'aconsegueix que els cromosomes específics o els fragments d'interès de cromosomes concrets emetin fluorescència, "brillin", sota el microscopi. Així es poden visualitzar, distingir i estudiar els diferents cromosomes i les anomalies que puguin presentar, com ara la translocació entre el cromosoma 9 i 22. La tècnica FISH s'anomena *in situ* perquè permet examinar els gens dels cromosomes en la seva posició natural.

Amb aquesta tècnica es poden detectar alteracions cromosòmiques a nivell de l'ADN, fins i tot quan la cèl·lula no es troba en divisió, és a dir, quan es troba en la fase d'interfase (fase de repòs). Per tant, amb aquesta tècnica es podran visualitzar els cromosomes de qualsevol cèl·lula i en qualsevol moment del cicle cel·lular. L'assaig FISH té l'avantatge de detectar el **gen BCR-ABL** en el 95% dels casos de LMC. En canvi, aproximadament en la meitat dels casos, no es podria detectar el cromosoma Filadèlfia mitjançant la tècnica de citogenètica convencional. El mètode FISH pot detectar una cèl·lula leucèmica entre 200 o 500 cèl·lules normals, per la qual cosa resulta una tècnica més sensible que el mètode citogenètic convencional per diagnosticar la LMC mínima residual.

El primer pas de la tècnica FISH consisteix en la desnaturalització de l'ADN per separar les dues cadenes de la doble hèlix. A la mostra desnaturalitzada se li afegeix la sonda d'interès (un fragment específic d'ADN desnaturalitzat i marcat fluorescentment). Les

¹³ És un component d'una molècula que fa que aquesta sigui fluorescent.

sondes s'hibriden amb regions concretes de l'ADN dels cromosomes. Després, es tenyeixen els nuclis amb un color de contrast inespecífic.

En el cas de la leucèmia mieloide crònica, mitjançant la tècnica de FISH, el fragment d'ADN que conté el gen BCR es marca amb una sonda de color verd, és a dir amb molècula d'ADN complementari i fluorescent de color verd; i el fragment d'ADN que conté el gen ABL es marca amb una altra sonda diferent, que correspon a molècula d'ADN complementari i fluorescent de color vermell. Per tant, quan es realitza l'assaig FISH, en les cèl·lules normals que no presenten la translocació (9;22) apareixen dos senyals vermells i dos senyals verds aïllats, ja que el gen ABL del cromosoma 9 s'observa de color vermell, i el gen BCR del cromosoma 22, de color verd. En canvi, en les cèl·lules canceroses en les quals ha tingut lloc una translocació recíproca entre els cromosomes 9 i el 22, el patró de senyals serà: un senyal vermell i un senyal verd aïllats que representen els gens no reordenats, i dos senyals de fusió vermell/verd (de color groc) que representen la fusió dels gens *BCR/ABL* en el cromosoma 22 (cromosoma Filadèlfia) i la fusió recíproca *ABL/BCR* en el cromosoma 9, ja que ambdós cromosomes estan implicats en la translocació.

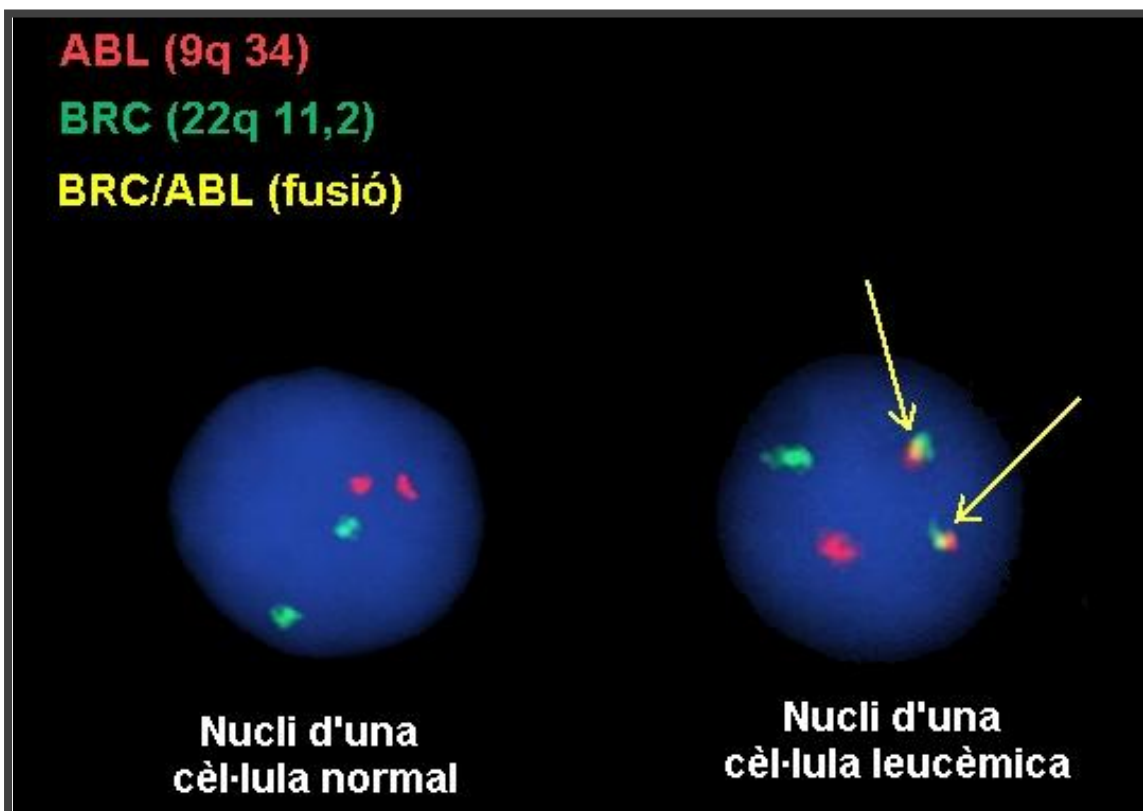


Figura 51. Detecció del gen híbrid BCR-ABL del cromosoma Filadèlfia, mitjançant la tècnica de FISH. S'observa el gen ABL de color vermell; el gen BCR, de color verd; i de groc els gens híbrids de fusió, formats com a conseqüència de la translocació recíproca entre els cromosomes 9 i 22.

A diferència del cariotip convencional, en què cal fer un procés previ per fer entrar les cèl·lules en divisió, i és necessari observar els cromosomes d'un mínim de 20 nuclis de cèl·lules en metafase, l'assaig FISH és una tècnica ràpida, molt sensible i específica, que permet analitzar uns 200 nuclis de cèl·lules en repòs (en interfase) o bé de cèl·lules en divisió (en metafase).

4.8. TRACTAMENT

Actualment, la leucèmia mieloide crònica és el tipus de leucèmia que té el tractament més innovador, menys agressiu i que ha revolucionat i canviat la manera de viure dels pacients.

En la majoria dels casos, el tractament permet controlar els símptomes de la LMC, reduir el nombre de leucòcits i evitar l'evolució de la malaltia cap a les fases terminals. Com que la LMC es produeix a causa d'una anomalia genètica, l'objectiu primari de la teràpia consisteix en l'eliminació de les cèl·lules portadores del cromosoma Filadèlfia.

L'eliminació total del cromosoma Filadèlfia en la medul·la òssia es considera una resposta citogenètica completa (RCC).

4.8.1. CRITERIS DE RESPOSTA AL TRACTAMENT

L'eficàcia del tractament es mesura mitjançant dos criteris fonamentals: la resposta hematològica i la resposta citogenètica. Generalment, també es comprova la resposta molecular.

- **Resposta hematològica.**

La resposta hematològica completa s'assoleix amb la normalització dels recomptes sanguinis durant al menys quatre setmanes. Aquests recomptes indicaran fins a quin punt s'ha controlat la proliferació dels glòbuls blancs. Durant la resposta hematològica, es possible que encara es detectin cèl·lules amb el cromosoma

Filadèlfia (cèl·lules Ph+). La normalització total en el recompte de les cèl·lules sanguínies i l'absència de blasts o elements immadurs en la sang perifèrica és qualifica com a resposta hematològica completa (RHC).

- **Resposta citogenètica**

La resposta citogenètica és la desaparició o reducció de cèl·lules amb el cromosoma Filadèlfia. És una clara evidència de la eficàcia del tractament i indica el grau de control assolit sobre l'origen de la malaltia. Una resposta citogenètica completa (RCC) significa que no es detecten cèl·lules Ph+.

- **Resposta molecular**

Tot i que les respostes hematològiques i citogenètiques siguin completes, encara pot haver-hi còpies del gen mutant BCR-ABL. Tot i que és important assolir la RCC, el tractament es considera més eficaç quan el pacient presenta una resposta molecular (RM), la qual posa de manifest la desaparició o la clara reducció del gen BCR-ABL que codifica per a la proteïna anòmala BCR-ABL tirosina quinasa, responsable de la proliferació incontrolada dels glòbuls blancs en pacients amb leucèmia mieloide crònica. Una resposta molecular completa (RMC) indica que el nivell del gen BCR-ABL és indetectable. La resposta molecular es mesura amb la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCC), la qual és capaç de quantificar nivells mínims de còpies del gen BCR-ABL.

CRITERIS DE RESPOSTA AL TRACTAMENT	
Resposta hematològica completa (RHC)	<ul style="list-style-type: none"> • Normalització completa dels recomptes de cèl·lules sanguínies (glòbuls blancs <10.000; plaquetes < 450.000). • Absència de cèl·lules immadures en la sang perifèrica. • Absència de tots els símptomes de la malaltia, incloent l'esplenomegàlia.
Resposta citogenètica completa (RCC)	Cromosoma Ph (Filadèlfia) absent en totes les metafases estudiades.
Resposta citogenètica parcial	Cromosoma Ph en 1-34% de les metafases.
Resposta citogenètica menor	Cromosoma Ph en 35-90% de les metafases.
Resposta citogenètica major	Inclou la resposta citogenètica completa i parcial (cromosoma Ph <35%).
Resposta molecular completa (RMM)	Sense evidència del gen BCR-ABL ni de la proteïna codificada per aquest gen.
Resposta molecular parcial	Amb evidències de malaltia residual (es detecten mínimes quantitats del gen BCR-ABL).
Resposta molecular major	Reducció de: > 3 log en BCR-ABL mRNA.

Taula 2. Classificació dels criteris de resposta al tractament.

EVOLUCIÓ DELS DIFERENTS TRACTAMENTS EN LA LMC

- 1860: introducció de l'arsènic
- 1902: radioteràpia
- 1930: radioteràpia esplènica
- 1953: el fàrmac Busulfan
- 1964: el fàrmac Hydroxyurea
- 1975: trasplantament de medul·la òssia
- 1983: Interferó alfa
- 1999: el fàrmac Imatinib
- 2005: els fàrmacs de segona generació, Dasatinib i Nilotinib.
- 2007: tercera generació d'inhibidors tirosina quinasa

4.8.2. EL FÀRMAC IMATINIB

El fàrmac imatinib ha estat el dissenyat a partir del coneixement de les alteracions genètiques i moleculars pròpies de la LMC i ha suposat una autèntica revolució en el tractament d'aquesta malaltia. Aquest medicament funciona bloquejant l'acció de la proteïna anòmala BCR-ABL tirosina quinasa, la qual dóna el senyal a les cèl·lules cancerígenes per tal que es multipliquin de forma contínua, de manera que l'efecte del fàrmac deté la proliferació de les cèl·lules leucèmiques.

L'imatinib ha demostrat ser molt més eficient que els tractaments anteriors, com ara l'interferó alfa combinat amb arabinòsid de citosina, el qual es va establir com a primera línia de defensa en el tractament de la LMC. L'interferó alfa aconseguia una resposta citogenètica completa d'un 5-20% en els pacients de LMC que es trobaven en la fase crònica o estadi primerenc de la malaltia, però presentava una forta toxicitat i s'observava una disminució de la seva eficàcia directament proporcional a la durada de la fase crònica.

Els estudis demostren que l'imatinib controla la malaltia, evitant que aquesta progressi cap a les últimes fases en la majoria dels pacients. Tot i aquest avenç, cal aclarir que aquest fàrmac i altres de nova generació no curen totalment la malaltia, sinó que simplement allarguen la fase crònica per tal de que els pacients puguin viure més temps i en millors condicions. L'única teràpia que cura totalment la malaltia és el trasplantament al·logènic, és a dir, el trasplantament de medul·la òssia o cèl·lules precursoras hematopoètiques.

Actualment, l'imatinib és comercialitzat per l'empresa Novartis sota el nom comercial de *Gleevec* a EE.UU o *Glivec* a Europa/Austràlia. S'utilitza com a principal tractament de la LMC des de 2001.



Figura 52. Càpsules d'imatinib.

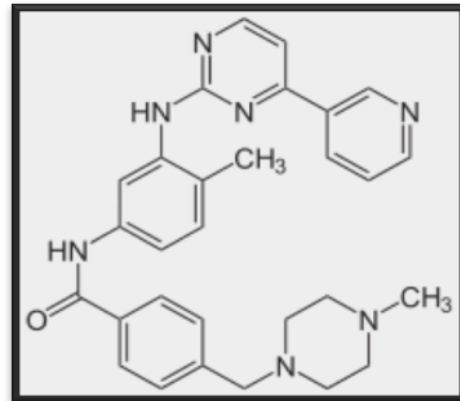


Figura 53. Fórmula i configuració de l'imatinib.

ACTUACIÓ DE L'IMATINIB

Els enzims són proteïnes biocatalitzadores, és a dir, són biomolècules que acceleren i fan possible les reaccions químiques dels éssers vius. L'enzim s'uneix a la molècula sobre la que actua, el substrat, per una regió concreta que s'anomena centre actiu o centre d'unió, i llavors es forma el complex enzim-substrat. Finalment, com a resultat de la reacció química, el substrat es transforma en un producte determinat i l'enzim torna a quedar lliure en el medi, sense experimentar modificacions. L'activitat dels enzims es pot veure afectada per altres molècules. Així, per exemple, els inhibidors són molècules que redueixen l'activitat enzimàtica, i els activadors són molècules que l'augmenten.

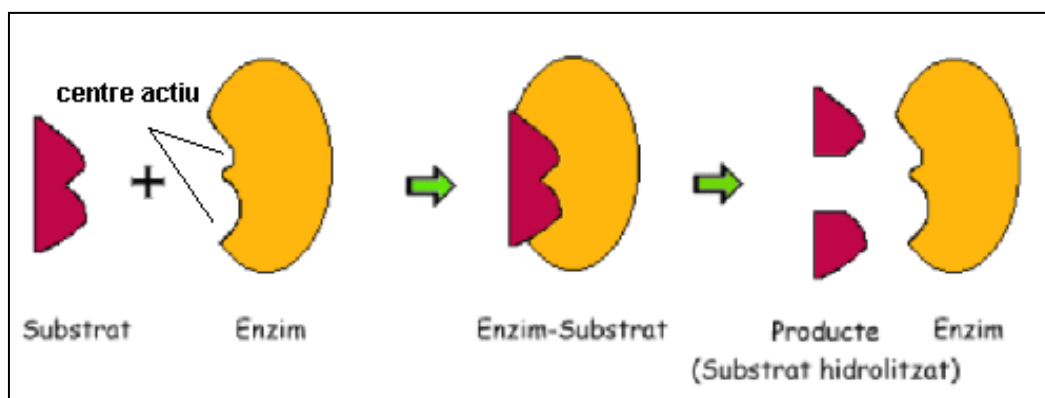


Figura 54. Esquema general d'actuació dels enzims.

Una **tirosina quinasa** és un enzim que pot transferir un grup fosfat d'una molècula d'ATP¹⁴ (trifosfat d'adenosina) a aminoàcids específics d'una proteïna que actua com a substrat. Aquest enzim funciona com un interruptor (activant o desactivant reaccions) en moltes funcions cel·lulars. La fosforilació de proteïnes per part dels enzims tirosina quinases és un mecanisme important en la transducció d'un sistema de senyals dins d'una cèl·lula, implicats en la regulació de processos biològics importants, com la divisió, la diferenciació i la mort cel·lular.

En les cèl·lules amb cromosoma Filadèlfia de les persones que pateixen la leucèmia mieloide crònica, l'oncogen BCR-ABL produeix la proteïna BCR-ABL tirosina quinasa que roman activa de forma contínua i incontrolada. L'ATP s'uneix a un lloc del centre actiu de la BCR-ABL tirosina quinasa i aquest enzim catalitza la transferència d'un grup fosfat de l'ATP a l'aminoàcid tirosina de les diferents proteïnes que li serveixen com a substrat i, conseqüentment, s'activa un sistema de senyals en la cèl·lula que promou la divisió cel·lular incontrolada i inhibeix l'apoptosi cel·lular i la reparació de l'ADN, de manera que la cèl·lula es multiplica sense control i esdevé cancerosa.

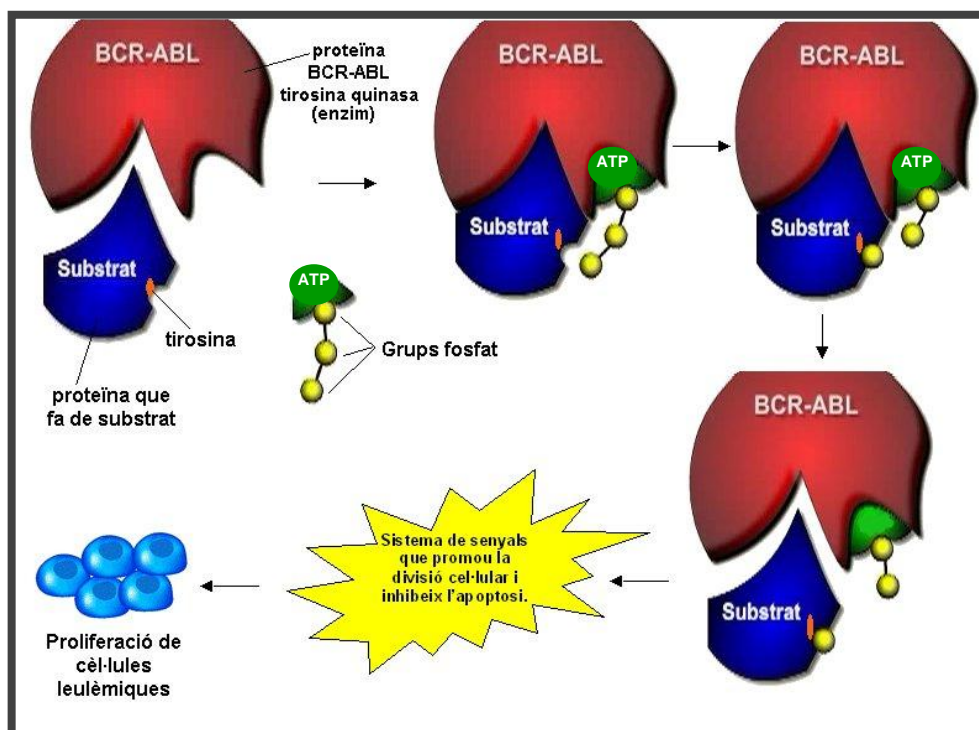


Figura 54. Mecanisme d'actuació de la proteïna BCR-ABL tirosina quinasa implicada en la LMC.

¹⁴ Trifosfat d'adenosina (ATP), molècula de transferència energètica intracel·lular. Entre altres funcions, s'utilitza com a cosubstrat en les rutes de transducció de senyals per quinases que fosforilen proteïnes.

L'imatinib funciona com a inhibidor específic de la proteïna BCR-ABL tirosina quinasa, ja que competeix amb l'ATP i es col·loca en el lloc d'unió de l'ATP en la proteïna BCR-ABL tirosina quinasa, de manera que la proteïna BCR-ABL, en no disposar d'ATP, no pot transferir el grup fosfat als seus substrats i, per tant, esdevé inactiva. S'aconsegueix així la inhibició del creixement i la divisió cel·lular i, a més, s'indueix l'apoptosi d'aquestes cèl·lules canceroses sobre les quals actua l'imatinib.

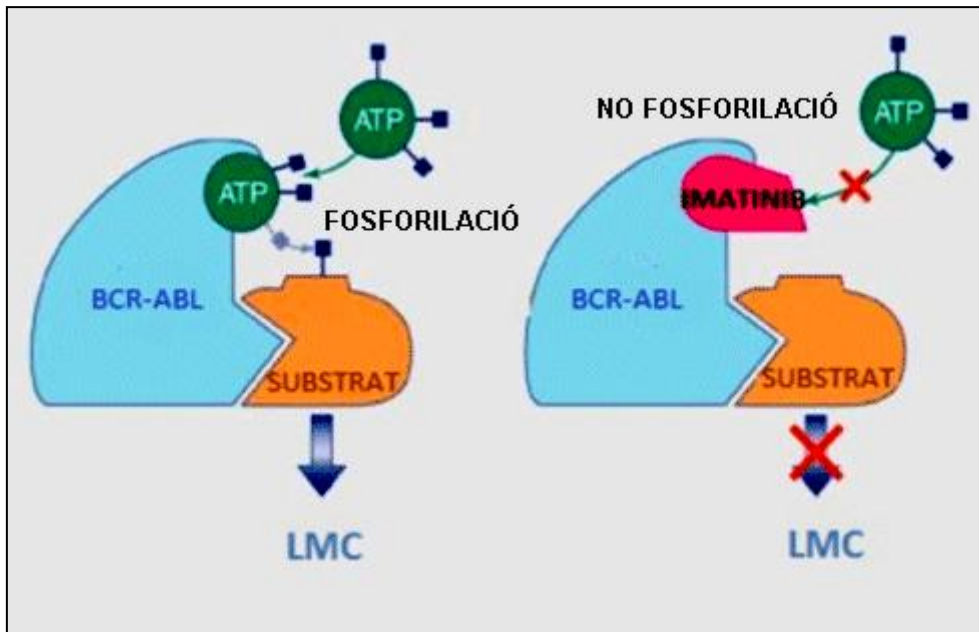


Figura 56. Mecanisme d'acció de l'imatinib.

L'imatinib també inhibeix la proteïna *ABL* de cèl·lules no cancerígenes, però aquestes cèl·lules normalment tenen altres enzims tirosina quinases addicionals, els quals permeten continuar l'activitat cel·lular.

La proteïna BCR-ABL és la diana ideal per a l'imatinib, ja que està present en quasi tots els pacients de leucèmia mieloide crònica i la seva activitat és essencial per induir la LMC. L'acció de l'imatinib acaba matant les cèl·lules mieloides en proliferació que contenen la proteïna BCR-ABL, però és mínimament perillós per a les cèl·lules normals. L'objectiu del tractament amb imatinib és aconseguir una resposta hematològica completa (normalització completa de l'hemograma, amb un recompte de leucòcits menor a $10.000/\text{mm}^3$ en sang perifèrica, recompte de plaquetes menor a $450.000/\text{mm}^3$, absència de cèl·lules immadures com ara mielòcits, promielòcits, o

blasts en la sang perifèrica) i inexistència de signes o símptomes de malaltia, incloent la desaparició de l'esplenomegàlia als tres mesos de seguiment.

L'imatinib s'utilitza per al tractament dels pacients amb LMC en la fase crònica, administrant una dosi de 400 mg al dia; en les fases accelerada i blàstica de tipus mieoloide, la dosi és de 600 mg al dia, aproximadament. S'administra per via oral i és de ràpida absorció.

4.8.2. TIPUS DE RESPOSTA A L'IMATINIB

1. **Resposta òptima:** el pacient presenta una resposta hematològica completa als 3 mesos, i als 12 mesos manifesta una resposta citogenètica completa. En aquest cas, la taxa de supervivència és molt alta. No obstant, el pacient ha de seguir amb el tractament i controlar l'evolució de la resposta al fàrmac al llarg del temps.
2. **Resposta subòptima:** és la resposta dels pacients que no hagin assolit una resposta hematològica completa als 3 mesos, o que als 6 mesos no hagin mostrat una resposta citogenètica parcial, o bé que als 12 mesos no tinguin una resposta citogenètica completa, o que als 12 mesos no mostrin una millor resposta molecular, o que en qualsevol moment presentin anormalitats clonals (anomalies genètiques addicionals) en les cèl·lules que tenen el cromosoma Filadèlfia. En aquests casos, es considera que el pacient pot presentar alguns mecanismes de resistència a l'imatinib i s'aconsella canviar de tractament, utilitzant nous inhibidors de tirosina quinasa, anomenats inhibidors de segona generació, o bé augmentar la dosi de l'imatinib i controlar l'evolució de la malaltia.

3. **Fracàs o fallida en la resposta:** és dona quan als 3 mesos no hi ha resposta hematològica completa, als 12 mesos no s'ha assolit una resposta citogenètica parcial i als 18 mesos no hi ha resposta citogenètica parcial. L'aparició de mutacions poc sensibles a l'imatinib es considera també un cas de falta de resposta al medicament.

Aproximadament un 20-30% dels pacients als que se'ls administra imatinib desenvoluparan resistència a aquest fàrmac. En els casos de resistència o intolerància a l'imatinib, cal administrar un altre fàrmac inhibidor de segona generació, com ara el **nilotinib**, **bosutinib**, o **dasatinib**, tots ells més potents que l'imatinib. No obstant, en alguns casos també s'opta pel **trasplantament de medul·la òssia**; malgrat els perills que comporta, està indicat en pacients que hagin desenvolupat la fase accelerada o la crisi blàstica, o bé en aquells que presentin una resistència als fàrmacs associada a determinades mutacions secundàries, com la T315I, la qual modifica el centre actiu de la proteïna BCR-ABL on s'uneixen l'imatinib, el dasatinib o el nilotinib i, per tant, confereix resistència a aquests medicaments. També es pot plantejar el trasplantament en pacients joves, menors de 40 anys, atès que la probabilitat d'èxit és més alta que en persones grans i és un tractament que permet la curació definitiva de la malaltia. Es recomana cercar un donant compatible de medul·la òssia després de la diagnosi d'una LMC en un infant i, en els pacients adults, immediatament després de l'aparició de la fase avançada de la malaltia o quan es constata el fracàs del tractament amb l'imatinib o qualsevol altre inhibidor de la tirosina quinasa. En cas que el trasplantament tampoc sigui factible, l'única alternativa és participar en algun assaig clínic utilitzant alguna teràpia experimental, és a dir, encara en fase d'investigació.

4.8.3. TOXICITAT DEL FÀRMAC IMATINIB

Normalment la tolerància del tractament amb l'imatinib és excel·lent, només un 8% dels pacients tractats en la fase crònica de la LMC han de suspendre el tractament amb aquest fàrmac degut a la seva toxicitat. Aquests pacients presenten una sèrie d'efectes adversos, essent les molèsties gastrointestinals els més freqüents. Depenent de la dosi, també es poden manifestar altres efectes secundaris, com ara nàusees, irritació en la mucosa gàstrica, diarrees, presència d'edemes, acumulació de líquid a l'espai tissular intercel·lular o intersticial i en les cavitats de l'organisme, erupcions cutànies, canvis en la pigmentació de la pell i dels cabells, espasmes musculars involuntaris, hepatotoxicitat (dany al fetge), dolor ossi, molèsties oculars, hemorràgies digestives i pneumònia intersticial. Alguns d'aquests símptomes es poden evitar ingerint el fàrmac després de l'àpat principal. D'altra banda, els pacients que prenen 800g al dia, divideixen aquesta quantitat en dues parts. Quan es presenten aquests símptomes, a més d'una major disminució en alguns valors de les cèl·lules sanguínies com les plaquetes i neutròfils, és important no interrompre el tractament, fins a esbrinar quina evolució experimenta a malaltia, excepte quan la toxicitat és alta (toxicitat de grau 4). En tot cas, es pot optar per un altre inhibidor de segona generació.

4.8.4. FERTILITAT I GESTACIÓ EN RELACIÓ AMB EL TRACTAMENT AMB IMATINIB

L'imatinib és un tractament relativament nou i, per tant, no existeix suficient informació sobre els efectes que té sobre la fertilitat i l'estat de gestació. No obstant, al centre oncològic M.D. Anderson, recentment s'han realitzat estudis en 146 dones sotmeses al tractament d'imatinib. D'aquestes, un 71% va estar exposat al tractament només durant el primer trimestre de gestació, un 26% va prendre el fàrmac durant tota la gestació, i un 3% va iniciar el tractament després del primer trimestre. Es van estudiar 128 embarassos d'aquest grup de dones. En un 50% dels casos van néixer nens sans, en un 28% es van produir avortaments terapèutics en identificar anomalies

fetals importants, un 9'6% dels fetus va néixer amb malformacions i un 14'4% dels embarassos va acabar amb un avortament espontani.

Algunes de les malformacions observades en els fetus i nadons, van ser:

- Tancament prematur de les sutures del crani.
- Desenvolupament deficient dels pulmons, doble ronyó esquerre o falta del ronyó dret.
- Escoliosi: desviació o curvatura anormal de la columna vertebral. Gairebé sempre implica una rotació vertebral.
- Hipospàdia: deformació congènita de la uretra, de manera que el meatus urinari s'obre en un lloc anormal del penis.
- Paladar enfonsat i polidactília (presència de més dits a la mà o al peu dels que li corresponen).
- Hidrocefàlia: acumulació excessiva de líquid al cervell.

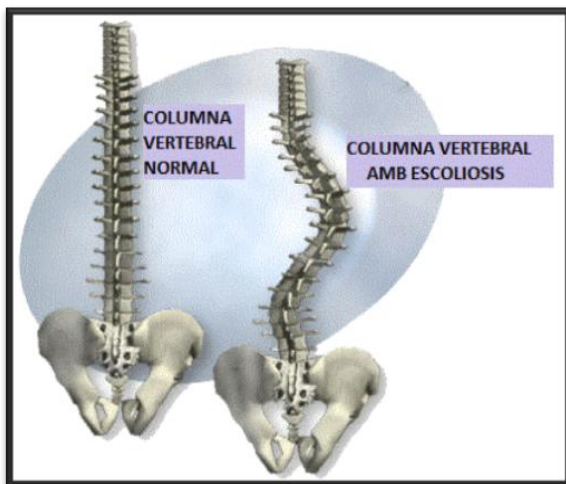


Figura 57. L'escoliosi és una de les anomalies que es produeixen en el fetus quan la mare es tractada amb imatinib.

Després de realitzar aquests estudis, els investigadors van arribar a les següents conclusions :

- Tot i que es recomana no concebre durant el tractament, no s'han observat casos de malformacions en nens en què el pare estigui rebent l'imatinib i la mare sigui una dona sana. L'imatinib sembla no afectar al procés de formació dels espermatozoides.

- En canvi, en les dones és important continuar amb mètodes anticonceptius. En el cas d'una interrupció del tractament per poder tenir fills, existeix un risc de recaiguda. Si la dona es troba en plena gestació, s'ha de suspendre el tractament i el seu embaràs serà considerat d'alt risc. No obstant, si es detecten alteracions o malformacions en el fetus, cal considerar l'opció d'un avortament terapèutic. Per això, és aconsellable no concebre mentre s'està en tractament.

4.8.5. INHIBIDORS DE SEGONA GENERACIÓ

Com ja s'ha esmentat abans, el primer fàrmac inhibidor de la tirosina quinasa (ITC) aprovat va ser l'imatinib, un cop es va demostrar que tenia una eficàcia superior a l'interferó alfa. No obstant això, no tots els pacients responen adequadament al tractament amb aquest inhibidor, i d'altres l'han de suspendre per intolerància. En aquests casos, els inhibidors de segona generació ofereixen altres opcions terapèutiques per aconseguir una remissió de la malaltia, mantinguda en el temps i, per tant, una major supervivència. Alguns d'aquests fàrmacs són el Nilotinib, el Dasatinib, i el Busotinib, tots ells amb activitat per inhibir la tirosina quinasa, però molt més potents que l'imatinib.

4.8.5.1. NILOTINIB

El nilotinib actua inhibint la proteïna BCR-ABL, però de manera més selectiva i potent; és unes 30 vegades més potent *in vitro* que l'imatinib. D'altra banda, inhibeix la majoria de les mutacions de BCR-ABL resistents a l'imatinib, excepte la T315I. El nilotinib s'administra a pacients en fase crònica o accelerada resistents a l'imatinib, amb una dosi recomanada de 400 mg dues vegades al dia, per via oral.

4.8.5.2. DASATINIB

El dasatinib és capaç d'inhibir un nombre elevat de proteïnes amb activitat tirosina quinasa, però és inactiu contra la mutació T315I. Té una estructura diferent a la de l'imatinib i és 325 vegades més potent que aquest *in vitro*. A diferència de l'imatinib i el nilotinib, inhibeix tant la conformació activa com la inactiva de la proteïna BCR-ABL.

S'utilitza com a tractament de la LMC resistent o intolerant a l'imatinib. Es pot fer servir en les tres fases de la malaltia. Amb el dasatinib es pot obtenir una resposta hematològica completa en la fase crònica del 90%; en la fase accelerada, del 33%; i en la fase blàstica mieloide, del 24%.

La dosi recomanada per als pacients en fase crònica és de 100 mg al dia, i 140 mg per als pacients que es trobin en fase accelerada o crisi blàstica.

4.8.5.3. BUSOTINIB

Aquest inhibidor de les proteïnes quinases, és 200 vegades més potent que l'imatinib. Tot i que actua en múltiples mutacions, no és efectiu en el cas de la mutació T315I. Redueix la migració de les cèl·lules tumorals i la interacció entre les cèl·lules leucèmiques i sanes.

4.7.5.4. TOXICITAT AMB INHIBIDORS DE SEGONA GENERACIÓ

Hi ha pacients que tampoc toleren els inhibidors de segona generació i presenten reaccions de toxicitat o bé resistència a aquests fàrmacs.

El tractament amb el dasatinib pot donar lloc a diversos símptomes, com ara: alteracions gastrointestinals, retenció hídrica, vessament pleural, hemorràgies i arítmia ventricular.

Entre els efectes secundaris del Nilotinib, cal esmentar les erupcions cutànies, molèsties lleus gastrointestinals, la pancreatitis aguda i l'arítmia ventricular.

4.8.6. TRASPLANTAMENT AL·LOGÈNIC DE MEDUL·LA ÒSSIA

En el cas dels pacients amb leucèmia mieloide crònica que no responguin a l'imatinib ni als fàrmacs de segona generació, o bé que no hagin obtingut una resposta hematològica completa al cap de tres mesos, cal buscar un donant HLA¹⁵ compatible per tal d'efectuar un trasplantament al·logènic de medul·la òssia.

El trasplantament al·logènic de medul·la òssia, és l'únic procediment curatiu de la LMC, però des de la introducció dels nous fàrmacs en el tractament de la LMC, el nombre de trasplantament durant la fase crònica ha disminuït considerablement. Avui dia, el trasplantament de medul·la òssia té un paper secundari en el tractament de la malaltia i es reserva per als pacients que es troben en fases avançades o bé presenten resistència o intolerància als fàrmacs inhibidors de la tirosina quinasa.

El trasplantament al·logènic de medul·la òssia consisteix en la substitució dels elements hematopoètics de la medul·la òssia del pacient per uns altres que siguin actius i sans, procedents d'un donant. El fonament d'aquesta pràctica es basa en la propietat de les cèl·lules mare hematopoètiques que es troben a la medul·la òssia, les quals tenen la particularitat de reproduir-se per si mateixes i generar la formació de tots els elements cel·lulars; per tant, n'hi ha prou que es trasplanti una quantitat suficient d'aquestes cèl·lules perquè quan s'integrin en la medul·la òssia del malalt comencin a produir tots els corpuscles sanguinis normals.

Per tal de poder efectuar el trasplantament, cal disposar d'elements cel·lulars de la medul·la òssia compatibles antigènicament amb l'organisme receptor, és a dir, amb un

¹⁵ El sistema HLA (Antígens Leucocitaris Humans) correspon a les molècules que es troben en els leucòcits de la sang i en la superfície de gairebé totes les cèl·lules dels teixits d'un individu. La seva funció és reconèixer el què és propi per a l'organisme i el que és estrany, per tant asseguren la resposta immunitària, la qual defensa l'organisme dels antígens que generen les infeccions. És important aquest sistema en el trasplantament ja que permet una millor comprensió en el rebuig donant contra receptor i permet una millor compatibilitat.

sistema HLA idèntic o molt similar. El sistema HLA (*Antígens Leucocitaris Humans*) correspon a les molècules que es troben en la superfície de gairebé totes les cèl·lules dels teixits d'un individu i també en els leucòcits de la sang. La seva funció és reconèixer el què és propi de l'organisme i el que li és estrany; per tant, asseguren la resposta immunitària, la qual defensa l'organisme contra les infeccions causades per elements estranys (virus bacteris, paràsits, etc.) que envaeixen l'organisme. Molts dels element estranys (antígens) que entren a l'organisme són identificats com una possible amenaça i el sistema de defensa reacciona, procedint a la seva neutralització i/o destrucció. Per això, les cèl·lules de la medul·la trasplantada han de tenir uns marcadors de membrana iguals o similars als que tenen les cèl·lules del pacient, de manera que el donant i el receptor han de ser "HLA compatibles". En cas contrari, les cèl·lules de la medul·la òssia trasplantada seran identificades com a estranyes i el sistema immunitari del pacient procedirà a destruir-les, la qual cosa conduiria al rebuig del teixit trasplantat.

Així, l'ideal és que el donant sigui un germà bessó univitel·lí del receptor, ja que les característiques antigèniques són idèntiques en aquest cas i, per tant, que no es produirà cap mena de rebuig. Tanmateix, com que ben poques persones es troben en aquesta situació, el més habitual és que el donant sigui un altre familiar proper, com ara un germà, que comparteixi les màximes característiques de compatibilitat amb el receptor; en aquest cas la compatibilitat no és mai completa, i per això cal adoptar mesures destinades a prevenir un possible rebuig. El trasplantament també es pot dur a terme amb un donant no emparentat, el qual es pot trobar a partir del Programa Nacional de donants de Mèdul·la Òssia. En el cas dels infants que pateixen una LMC es pot aconseguir un donant compatible a partir d'un "germà a la carta" o "germà salvador" de manera que la mare del nen malalt és sotmesa a una fecundació in vitro i després, al laboratori, mitjançant la tècnica de diagnòstic genètic preimplantacional, se selecciona un embrió sa que tingui un sistema antigènic HLA compatible amb el pacient; aquest embrió s'implanta en úter de la mare i, en finalitzar l'embaràs, s'utilitzarà el cordó umbilical del nadó per realitzar el trasplantament al germà malalt,

ja que el cordó umbilical conté un nombre molt elevat de cèl·lules mare hematopoètiques.

Com que la LMC afecta bàsicament a adults, la majoria dels trasplantaments destinats a curar aquesta malaltia es fa a partir de la medul·la òssia. La consecució de la medul·la òssia que ha de ser trasplantada és relativament senzilla. Es tracta d'obtenir una aspiració medul·lar en què es trobin les cèl·lules mare que s'han de trasplantar. Aquest procediment és efectuat amb anestèsia general o raquídia. Un cop s'ha practicat l'anestèsia, es fan una sèrie de puncions òssies, generalment als ossos ilíacs, per realitzar l'aspiració de la medul·la òssia; normalment es fan nombroses puncions que permeten obtenir una quantitat suficient de medul·la, entre 500 i 1000 cm³. El producte final és filtrat per tal d'eliminar els possibles fragments d'os que s'hagin extret i desfer els grumolls que formen els conglomerats cel·lulars. S'aconsegueix així un producte homogeni que s'introdueix en una bossa especial que conté substàncies anticoagulants i conservants, de manera que ja queda preparat per al trasplantament. Pel que fa al donant, aquest procediment no representa cap problema important, ja que la seva pròpia medul·la òssia es regenera en un període curt.

El tractament preparatori del trasplantament és complex, perquè és imprescindible deprimir el sistema immunitari del receptor per tal que no ataqüi les cèl·lules que s'han d'implantar; d'altra banda, cal eliminar totes les cèl·lules canceroses abans del trasplantament. Per aconseguir aquest objectiu, s'efectua un tractament intensiu amb fàrmacs anticancerosos i immunodepressors, i radioteràpia si cal. En el cas dels pacients amb LMC, no es fa quimioteràpia abans del trasplantament sinó que se subministra imatinib o un altre fàrmac inhibidor de la tirosina quinasa per reduir al mínim les cèl·lules canceroses. Aquests mètodes serveixen com a prevenció d'un possible rebuig, però també s'eliminen totes les defenses de l'organisme, de manera que és fàcil d'ésser contagiats per una infecció. Així, a partir del moment que la teràpia comença a ser efectiva, cal que el receptor sigui ingressat en un ambient estèril especial perquè no entri en contacte amb gèrmens.

Un cop realitzat aquest tractament preparatori, es procedeix a la trasplantació. L'operació és força senzilla, ja que consisteix en la introducció, via intravenosa, del material medul·lar obtingut, de la mateixa manera que es fa una transfusió de sang. Un cop han estat introduïts en la sang, els elements transfosos arriben a la medul·la òssia amb la circulació sanguínia, s'hi insereixen i comencen a proliferar.

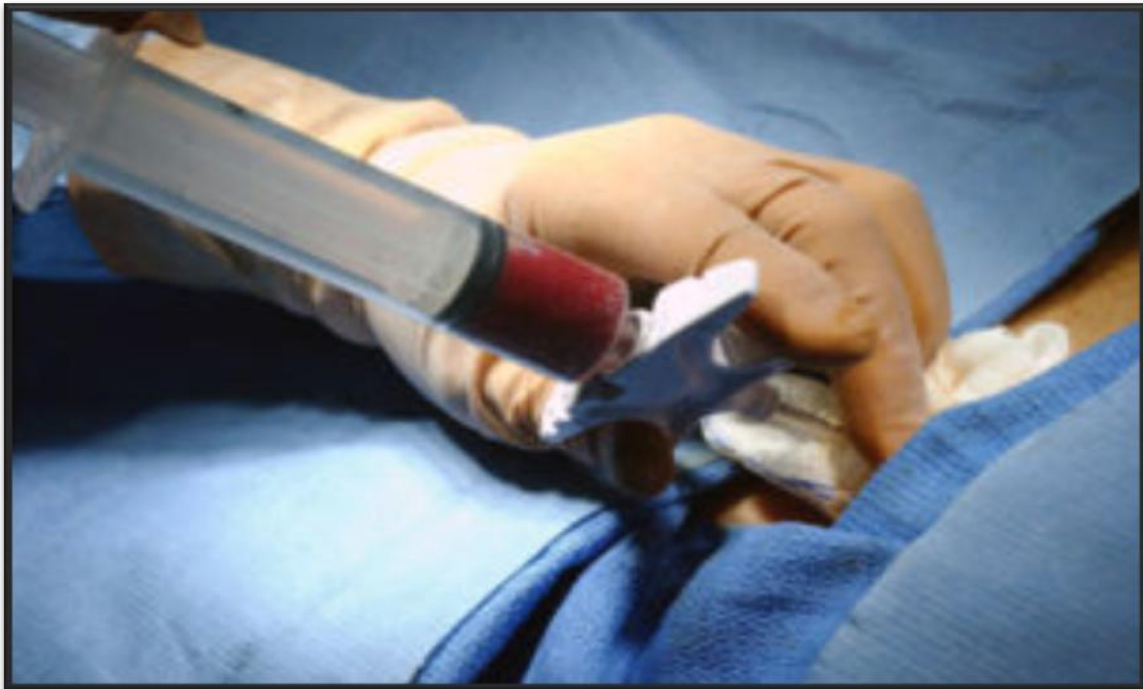


Figura 58. Extracció de la mèdul·la ossia del donant.

El tractament posterior al trasplantament és complex perquè, encara que tot vagi bé, fins al cap d'unes quantes setmanes, la medul·la no elaborarà prou elements sanguinis, en especial leucòcits, que actuen contra les infeccions, o les plaquetes que impedeixin les hemorràgies. Per tant, el pacient ha de romandre ingressat en habitacions estèrils i és habitual que necessiti transfusions de glòbuls blancs o de plaquetes. D'altra banda, es duen a terme nombrosos controls per tal d'avaluar la nova funció medul·lar i investigar l'aparició de complicacions. Si el trasplantament ha estat eficaç, quan es practica un examen de la medul·la òssia al cap de dues setmanes ja es pot observar que hi ha algunes cèl·lules hematopoètiques actives; al cap de tres o cinc setmanes

l'activitat medul·lar és gairebé normal. Les xifres de cèl·lules sanguínies en sang perifèrica solen assolir la normalitat al cap d'un mes o dos.

Tot el procediment de la trasplantació, inclosa la preparació, pot originar diverses complicacions. Per exemple, el tractament previ al trasplantament, quan se suprimeix l'activitat del sistema immunitari del pacient, pot afavorir l'aparició d'infeccions greus. Una altra complicació és l'anomenada "malaltia d'empelt contra l'hoste" causada per la introducció de cèl·lules immunològiques actives del donant en l'organisme del receptor, que poden atacar diversos teixits.

Les possibles complicacions derivades del trasplantament, nombroses i de vegades greus, comporten una mortalitat elevada que se situa entre el 20 i el 35%. De totes maneres, el trasplantament es realitza en persones amb LMC que no responen satisfactòriament als fàrmacs específics per a aquesta malaltia i que tenen, per tant, poca esperança de vida.

Aproximadament un 65% de les persones que experimenten aquest trasplantament aconseguen una curació total de la LMC. La probabilitat d'èxit és major en pacients joves.

5. TREBALL PRÀCTIC

5.1. INTRODUCCIÓ

La part pràctica d'aquest treball es basa en la diagnosi real d'un cas de leucèmia mieloide crònica, partint d'una mostra de la sang i de medul·la òssia d'un pacient, seguint tots els protocols estàndards establerts.

Per portar a terme aquest estudi em vaig posar en contacte amb la Dra. Dolors Colomer Pujol, responsable de l'Àrea de Biologia Molecular de la Unitat d'Anatomia Patològica del Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB) de l'Hospital Clínic de Barcelona. La Dra. Colomer em va explicar que el seu equip de treball desenvolupa bàsicament les activitats següents:

- Detecció d'alteracions moleculars en leucèmies i limfomes.
- Detecció i quantificació de la mínima malaltia residual en leucèmies i limfomes, mitjançant tècniques de biologia molecular.
- Estudi del mecanisme d'acció i d'eficàcia "in vitro" de nous fàrmacs que puguin ser d'utilitat en el tractament de les leucèmies.
- Establiment dels protocols estàndards de les tècniques de quantificació del gen BCR-ABL.

Em vaig adonar que aquestes tècniques de diagnosi i línies d'investigació estaven relacionades amb el meu treball de recerca i vaig demanar a la Dra. Colomer l'orientació i els medis necessaris per tal de posar en pràctica les tècniques de citogenètica i biologia molecular utilitzades en la diagnosi d'una leucèmia mieloide crònica a l'Hospital Clínic de Barcelona.

A continuació s'exposa la seqüència de proves i processos, necessaris per establir la diagnosi d'una LMC, que vaig realitzar a l'Hospital Clínic.

1. **Estudi de l'anàlisi de sang d'un pacient anònim.**

Aquesta prova ens servirà per determinar a primer cop d'ull si hi ha alguna alteració en els valors normals dels components de la sang.

2. **Observació al microscopi de les cèl·lules de la sang perifèrica del pacient.**

Podem observar al microscopi una petita mostra de la sang del pacient per tal de confirmar alguns dels resultats de l'anàlisi.

3. **Detecció del gen BCR-ABL mitjançant tècniques de Biologia Molecular.**

Verificats tots els resultats de l'anàlisi, i si se sospita d'una LMC, caldrà assegurar el diagnòstic mitjançant la detecció del gen BCR-ABL en les cèl·lules del pacient. Un cop extret i aïllat l'ARN dels leucòcits, es portarà a terme la reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa (RT-PCR). Mitjançant aquesta tècnica, l'ARN es retrotranscriurà a ADN complementari (ADNc) i, finalment, es farà la tècnica de PCR convencional, per tal d'amplificar el gen BCR-ABL i poder confirmar la seva presència en els leucòcits del pacient.

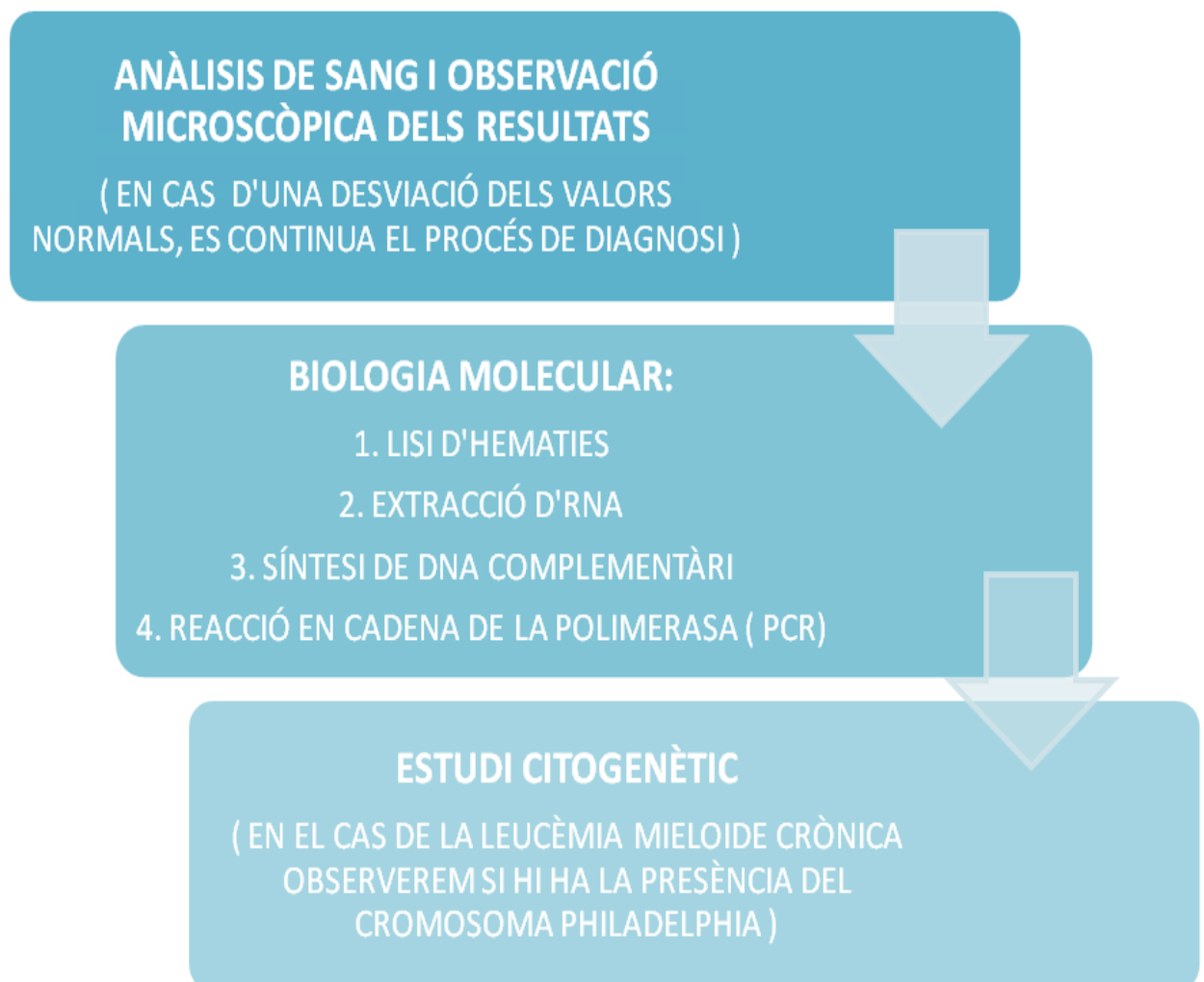
4. **Estudi citogenètic per identificar el cromosoma Filadèlfia.**

Per corroborar la diagnosi, es faran els estudis citogenètics a fi de confirmar l'existència de la translocació entre els cromosomes 9 i el 22, i identificar, al mateix temps, el cromosoma Filadèlfia, portador del gen híbrid BCR-ABL, el qual dona les instruccions per a la fabricació contínua de la proteïna BCR-ABL, responsable dels canvis que experimenten les cèl·lules que esdevenen canceroses en els pacients de LMC.

És recomanable realitzar els estudis citogenètics i moleculars en les primeres 24 hores després de l'extracció de la sang perifèrica i la mostra de medul·la òssia del pacient.

A continuació es detallen els protocols que s'han seguit, els procediments realitzats, la interpretació dels resultats de les diferents proves diagnòstiques i les conclusions finals.

ESQUEMA DEL TREBALL REALITZAT A L'HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA



5.2. INTERPRETACIÓ I OBSERVACIÓ DE LA SANG

Ens arriba l'anàlisi d'un pacient al laboratori, la qual presenta els següents valors:

	VALORS DEL PACIENT	VALORS NORMALS
RECOMPTE DE LEUCÒCITS	37.56/A ($10^9/L$)	(4.00 – 11.00)
CONCENTRACIÓ D'HEMOGLOBINA	113/B (g/L)	(120 – 170)
HCM (Hb. CORPUSCLE MITJANA) ¹⁶	24.9/B (pg)	(26.7 – 33.3)
RECOMPTE PLAQUETES	814/A ($10^9/L$)	(130 – 400)
RECOMPTE HEMATIES	4.55 ($10^{12}/L$)	(3.90- 5.50)
NEUTRÒFILS SEGMENTATS	13/A %	(0 – 6)
BASÒFILS	3/A %	(0 – 2)
LIMFÒCITS	7/B %	(17 – 55)
METAMIELÒCITS	6/A %	(0)
MIELÒCITS	4/A %	(0)

Taula 3. Valors destacats en la anàlisi d'un pacient anònim.

¹⁶ Quantitat mitjana d'hemoglobina en cada glòbul vermell.

Observant els valors de les diferents cèl·lules sanguínies que figuren a l'anàlisi de sang del pacient, es detecta un alt recompte de leucòcits (leucocitosi), un elevat nombre de neutròfils (neutrofilia), també un valor per sobre del normal d'eosinòfils (eosinofília) i de basòfils (basofília). A més, s'observa un augment en el nombre de cèl·lules precursors a la sang, com és el cas dels mielòcits i metamielòcits, els quals en un pacient sa no s'haurien de trobar a la sang perifèrica, sinó que haurien d'estar a la medul·la òssia vermella de l'os; per tant, aquests resultats ens indiquen una patologia o alteració en l'organisme del pacient que podria correspondre a una leucèmia mielòide crònica.

Un cop acabat l'estudi dels valors de l'anàlisi sanguínia, es procedeix a observar una mostra de sang del pacient al microscopi, per detectar possibles anomalies o alteracions pel que fa a la quantitat, forma i mida de les diferents cèl·lules sanguínies, és a dir, es realitza un estudi morfològic.

Per poder visualitzar les cèl·lules sanguínies en un microscopi òptic cal tenyir-les amb la tècnica de May-Grünwald-Giemsa. S'observa el frotis sanguini i es compara la mostra de la sang del pacient amb una altra d'un pacient normal. L'observació confirma la presència d'un gran nombre de leucòcits. Entre ells, també hi ha els seus precursors que, com ja s'ha comentat abans, haurien de restar al moll de l'os. També es posa de manifest un elevat nombre de plaquetes en el camp de visió i, sobretot, crida l'atenció la presència de bastants basòfils. Finalment, observant més detalladament, es detecta un menor gruix en els corpuscles corresponent als eritròcits, la qual cosa ens indica que hi ha menys quantitat d'hemoglobina de l'habitual.

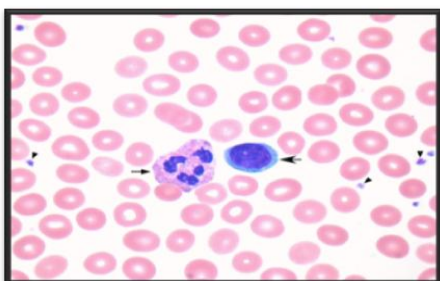


Figura 59. Mostra de sang perifèrica d'un pacient sa, observada al microscopi, en la qual es veuen pocs leucòcits.



Figura 60. Mostra de sang perifèrica d'un pacient amb LMC, on es pot apreciar l'augment de nombre de leucòcits i de cèl·lules precursors. També hi ha un augment de la quantitat de trombòcits en el mateix camp de visió.

Amb els resultats de l'anàlisi i l'estudi de la sang al microscopi, es formula la hipòtesi de treball: **potser la patologia del pacient correspon a un cas de leucèmia mieloide crònica.**

Els estudis citogenètics i moleculars serviran per corroborar o no aquesta hipòtesi.

5.3. PROVES DIAGNÒSTIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

5.3.1. FRACCIONAMENT DE LEUCÒCITS

Abans d'extreure l'ARN, cal separar els leucòcits de la resta de components de la mostra de sang, ja que els eritròcits no tenen nucli i, per tant, tampoc tenen ADN nuclear, només contenen hemoglobina de color vermell que interfereix en el procés d'extracció de l'ARN dels leucòcits, per la qual cosa caldrà eliminar tots els eritròcits de la mostra de sang.

Es pot realitzar un fraccionament cel·lular utilitzant determinades macromolècules, com el dextrà, que fan sedimentar els eritròcits. El sobrenedant que en resulta és la suspensió de leucòcits. En el nostre cas, es va optar per una altre procediment: la lisi dels eritròcits.

Cal realitzar tot el procés utilitzant guants, per evitar possibles contaminacions.

MATERIAL I INSTRUMENTS AUXILIARS

- Agitador magnètic
- Vas de precipitats
- Tubs cònics de plàstic de 10 mL
- Tisores
- Pipetes Pasteur de plàstic

- Centrífuga
- Bidó de plàstic per als residus líquids
- Congelador a -80°C
- Nevera

REACTIUS

- Aigua destil·lada
- Clorur d'amoni NH_4Cl 1'44 M
- PBS x10 (solució tamponada amb fosfats amb el contingut següent: 1,37 M NaCl; 27 Mm KCl; 0,1 Mm Na_2HPO_4 ; i 20 Mm KH_2PO_4).
- Hidrogen carbonat d'amoni NH_4HCO_3 1 M.
- Solució o tampó de lisi: es realitza amb 100 mL de NH_4Cl 1,44 M i 10 mL de NH_4HCO_3 1M, afegint aigua destil·lada fins a 1000 mL. La solució es manté en una ampolla fosca de 1000 mL.

MÈTODE OPERATIU (PROTOCOL DE LISI DELS ERITÒCITS)

1. Es posa la sang en un tub de 50 mL, retolat amb un número identificatiu.
2. S'afegeix el tampó de lisi fins a 50mL, es barreja i es deixa en un agitador durant 10 minuts.
3. Es posa en la centrifuga a 2000 rpm, a temperatura ambient, durant 10 minuts.
4. S'extreu el sobrenedant amb una pipeta Pasteur; s'afegeix 20 mL de tampó de lisi, i es torna a barrejar.
5. Se centrifuga durant 10 minuts a 2000 rpm i a temperatura ambient.
6. Afegim directament el reactiu anomenat TRIZOL al botó cel·lular obtingut .

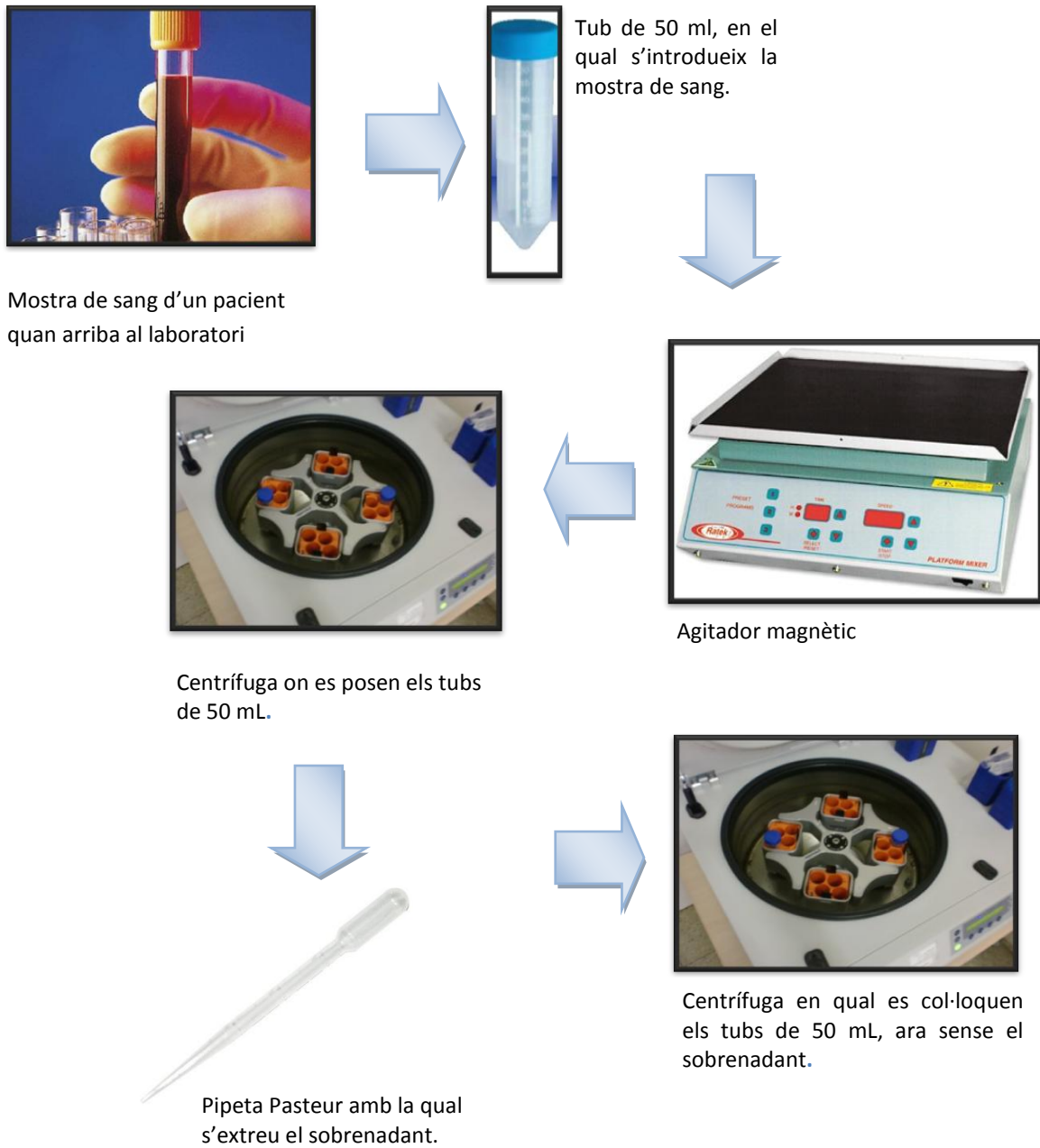


Figura 61. Procés de lisi dels eritròcits i fraccionament dels leucòcits, realitzat a l'Hospital Clínic de Barcelona.

5.3.2. EXTRACCIÓ D'ARN

MATERIAL I INSTRUMENTS AUXILIARS:

- Tubs eppendorf
- Xeringa de 2 mL
- Agulla 20G
- Centrífuga eppendorff refrigerada
- Congelador a -80°C



Figura 62. Reactiu TRIZOL, utilitzat per a l'extracció d'ARN.

REACTIUS:

- Reactiu Trizol (solució monofàsica de fenol i tiocianat de guanidina)
- Cloroform
- Isopropanol
- H_2O amb DEPC (dietiapirocarbonat). El DEPC és un inhibidor dels enzims ARNases.
- Etanol al 75% amb H_2O DEPC (mescla de 37,5 mL d'etanol amb 12,5 mL de H_2O DEPC, conservat a -4°C)

MÈTODE :

1. Afegeix 1 mL de TRIZOL (INVITROGEN) al botó de cèl·lules, d'aproximadament $10\text{-}20 \cdot 10^6$ cèl·lules, o 500 μL de TRIZOL en cas que disposem de menys quantitat de cèl·lules.
2. S'utilitza una xeringa de 2 mL amb una agulla de 20G per resuspendre el botó cel·lular. Es fa passar la solució per la xeringa 15-20 vegades, a fi de desfer completament el botó cel·lular. En cas que la solució sigui molt viscosa, es pot afegir més Trizol. Si s'atura l'experiment en aquest punt, cal mantenir la mostra a -80°C , fins que es torni a reprendre la tasca experimental. No va ser aquest el cas, ja que no es va realitzar cap pausa de treball.
3. S'incuba la mostra 5 minuts a temperatura ambient, per permetre la separació del complex: proteïnes/àcids nucleics. Si s'hagués guardat a -80°C , en reprendre l'estudi, caldria tornar a homogeneïtzar la mostra amb la xeringa amb una agulla de 20G.
4. S'afegeix 0,2 mL de cloroform per cada mil·lilitre de TRIZOL. S'agita amb força, durant 15 segons i es deixa incubar a temperatura ambient durant 5 minuts. Es posa a la centrífuga a 11.400 rpm durant 10 minuts, a 4°C . Passat aquest temps, es pot observar que s'han format les fases següents: la fase inferior, que correspon a la fase orgànica, de color rosa, on queda el TRIZOL sobrant; una interfase, que és semblant a un anell, on hi ha les proteïnes i restes cel·lulars; i la fase superior aquosa corresponent a l'ARN.



Figura 63. Podem veure, al fons del tub, el botó cel·lular que hem conservat de la mostra sanguínia.

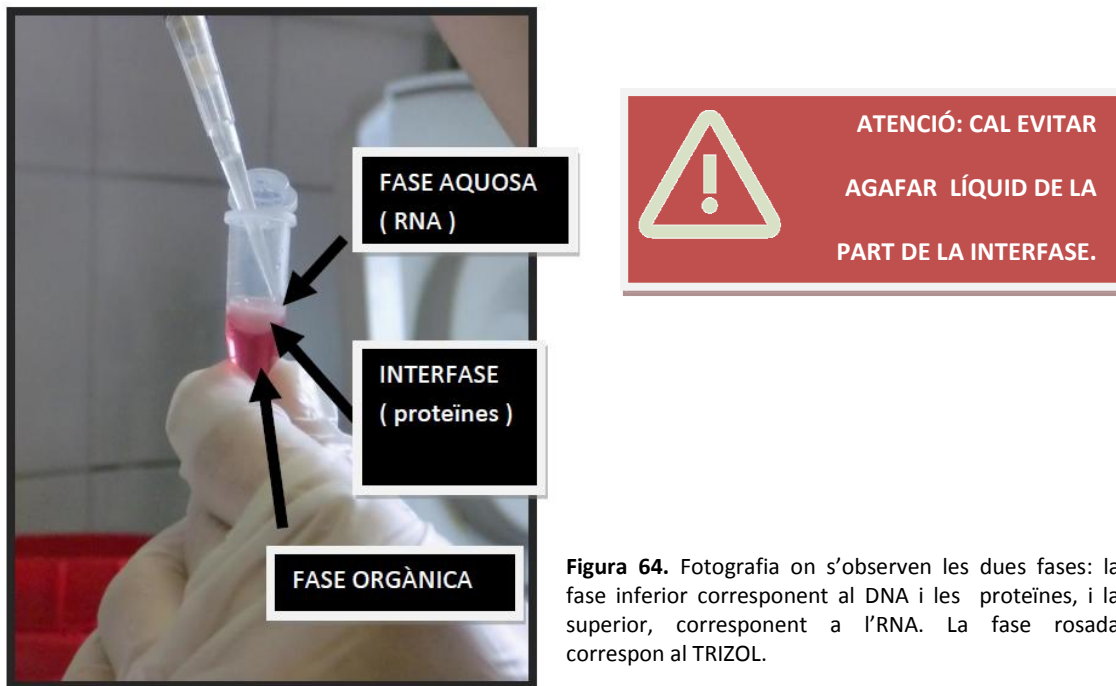


Figura 64. Fotografia on s'observen les dues fases: la fase inferior corresponent al DNA i les proteïnes, i la superior, corresponent a l'RNA. La fase rosada correspon al TRIZOL.

5. Amb una pipeta automàtica amb punta de filtre, es transfereix amb molta cura la fase superior, la fase aquosa, que aproximadament representa el 60% del volum total, a un altre tub eppendorf.
6. S'afegeix el mateix volum d'isopropanol (2-propanol) a la fase aquosa que s'ha recollit, es mescla per inversió i s'incuba a temperatura ambient, durant 10 minuts. L'isopropanol farà que l'ARN precipiti.
7. Se centrifuga a 11.400 rpm durant 10 minuts, a 4°C. Ara, l'ARN formarà un precipitat blanc molt petit al fons del tub. Es treu amb cura el sobrenadant i es llença.
8. Seguidament, es fan dos rentats amb etanol al 75%, prèviament preparat, i se centrifuga a 8.900 rpm durant 5 minuts, a 4°C.

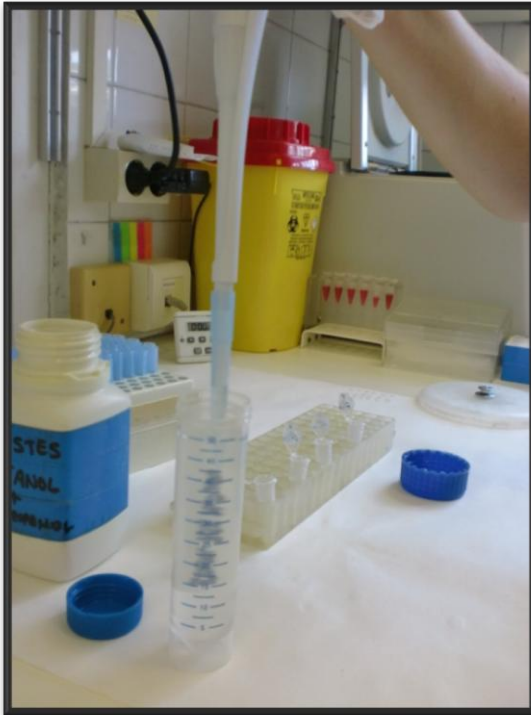


Figura 65. Realització del rentat de l'ARN.

9. Es deixa assecar l'ARN durant uns 30 minuts a temperatura ambient, posant el tub eppendorff que conté l'ARN de cap per avall, sobre un paper absorbent. Es poden assecar les parets del tub vigilant de no tocar l'ARN.

10. Finalment, afegirem H₂O-DEPC al botó cel·lular. La quantitat dependrà de la mida del botó que haguem obtingut. En el nostre cas, hi afegim 25 µL de H₂O-DEPC. Es manté la mostra a 4°C en la nevera durant mitja hora o una hora aproximadament, per tal que es dissolgui correctament.

11. Un cop està dissolt, es determina la concentració d'ARN amb un espectrofotòmetre especial, anomenat NANODROP, que permet llegir les concentracions d'àcids nucleics.

5.3.4. SÍNTESI DE L'ADN COMPLEMENTARI (ADNc)

Com que la tècnica de la PCR només es pot fer a partir de molècules d'ADN, ara cal sintetitzar la cadena d'ADN complementari a l'ARN que s'ha extret anteriorment, per tal de realitzar després la PCR. L'ADNc que s'aconsegueix amb aquest mètode no té introns.

MATERIAL I INSTRUMENTS AUXILIARS:

- Tubs eppendorf de 0,5 mL o 2,2 mL
- Puntetes de pipeta amb filtre de 10, 20, 100, 200 i 1000 µL
- Pipetes automàtiques
- Centrífuga de tubs eppendorf



Figura 66. Tub d'eppendorf de 0'5 mL.

REACTIUS:

- REACTIUS COMERCIALS
 - Transcriptasa inversa del virus de la leucèmia murina de Moloney (M-MLVRT)
 - RNAsin (inhibidor de les RNAses)
 - H₂O-DEPC
 - Dithiothreitol (DTT) 0'1M
 - Tampó comercial (5 X first strand)

- dNTPS 100 mM (mescla de desoxinucleòtids: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Random Hemamers 100µL: grups de 6 a l'atzar de les quatre bases: adenosina (A), citosina (C), guanina (G) i timidina (T)
- REACTIUS A PREPARAR
- Reactiu "cDNA mix" (401 µL DEPC, 428 µL de tampó 5X first stand, 21'5 µL DTT 0'1 M, 85'5 µL dNTPs 25 mM, i 64 µL pd (N) 6). Es congela a -20°C.
- Reactiu dNTPs 25 Mm (50 µL dATP 100 mM , 50 µL dCTP 100 mM , 50 µL dTTP 100 mM, i 50 µL dGTP 100 mM). Es congela a -20°C .

MÈTODE:

Es realitza la síntesi de l'ADN complementari dins d'una campana de flux laminar de classe II, per tal d'evitar contaminacions. Es treballa amb la mostra i els reactius conservats en gel.

Abans de començar, cal preparar la mescla adient per a la retrotranscripció: es barregen 22 µL de cDNA mix amb 1,5 µL de M-MLVRT i 0,75 µL d'ARNsin. Les RNAsin eviten que les RNAses degradin l'ARN.



Figura 67. Campana de flux laminar de l'Hospital Clínic de Barcelona.



Figura 68. Recipient amb gel per conservar les mostres mentre realitzem el procés de preparació previ a la PCR.

Per realitzar la retrotranscripció, se segueixen els passos següents:

1. Es pren 1 µg d'ARN de la mostra en un volum total de 19 µL, que es completa amb H₂O-DEPC.
2. Es col·loca la mostra en el termociclador¹⁷ durant 5 minuts a 65°C, i seguidament es posa en gel.
3. S'afegeix a la mostra 21 µL de la mescla de cDNA mix, M-MLVRT i RNAsin, preparada prèviament.
4. Es posa la mostra al termociclador. Utilitzant el programa cDNA, la mostra romandrà al termociclador 1 hora i 20 minuts a 37°C; 10 minuts a 65°C; i finalment, a 4 °C el temps que calgui. Aquest procés permet que l'enzim transcriptasa



Figura 69. Termociclador

¹⁷ Instrument usat en el biologia molecular que permet realitzar de forma automàtica i programada els cicles de temperatures necessaris per a una reacció en cadena de la polimerasa d'amplificació de DNA o per a reaccions de seqüència amb el mètode de Sanger.

inversa sintetitzi l'ADNc a partir de l'ARN, ja que l'enzim treballa a 37°C. Durant els 10 minuts a 65°C, s'inactiva l'enzim M-MLVRT.

5. En treure la mostra del termociclador, es pot guardar a -20°C o utilitzar-la directament per fer la prova de la PCR.

5.3.4. DETECCIÓ DEL GEN BCR-ABL AMB LA TÈCNICA DE LA PCR

Finalment, per acabar la part de la biologia molecular, es realitza la PCR. La reacció en cadena de la polimerasa (PCR), és una tècnica per amplificar un ADN del nostre interès. En aquest cas, ens interessa estudiar la presència del gen híbrid BCR-ABL, resultant d'una translocació recíproca entre els cromosomes 9(q34) i 22(q11). Aquest pas també es realitza en una campana de flux laminar per evitar contaminacions.

MATERIAL :

- Termociclador
- Pipetes automàtiques de 5, 10, 25, 100, 200 µL

REACTIUS :

- Taq polimerasa
- Desoxinucleòtids (dNTPs 100 mM) (adenina, citosina, timina , guanina)
- Clorur de magnesi: 25 mM MgCl₂
- Tampó x 10 comercial: TBE 10 x (format per tris, edta i àcid bòric).
- Oligonucleòtids, també anomenats primers o encebadors:

BCR-b2-C: 5' CAG ATG CTG ACC AAC TCG TGT 3'

ABL3-a3-D: 5' GGG ACC GGC TTA ATC CAT AG 3'

MÈTODE:

Primer cal anotar en un registre, el nom del pacient, el número de laboratori, la data d'entrada, el tipus de mostra i la prova sol·licitada.

ANÀLISI REORDENAMENT BCR-ABL p210 BIOMED		
Núm.	Núm. MOSTRA	NOM
1	2034/11	PACIENT
2	H ₂ O	CONTROL NEGATIU
3	6315/11	CONTROL POSITIU

Taula 4. Taula de registre per a realitzar la PCR.

1. Es prepara la mescla per la PCR:

	X1 (per una mostra)	X3 (per tres mostres)
BUFFER TAQ GOLD X 10	2,5	7,5
MgCL₂ 25 mM	2	6
dNTP 10 mM	0,5	1,5
BCR-b2-C 10 mM	1	3
ABL-a3-D 10 mM	1	3
H₂O	16	48
Taq Gold	0'2	0'6
TOTAL	23	69'6
23 µL mix + 2 µL cDNA		

Taula 5 . Preparació de la mescla per la PCR.

En aquest cas, es prepara la mescla per fer tres reaccions, ja que cal aplicar el mètode de la PCR en la mostra objecte d'estudi, en una altra mostra estàndard que fa de control positiu perquè sabem a priori que conté el gen BCR-ABL, i en una altra mostra que utilitzem com a control negatiu i que correspon a una mostra d'aigua. Aquest procés es fa així per tal de tenir unes referències, contrastar resultats, i poder comprovar si la mostra sotmesa a estudi dona positiu o negatiu a la reacció.

1. Es posa 23 μL de la mescla preparada anteriorment dins de cada tub, on hi ha el número de mostra corresponent a la llista de treball.
2. En el tub en què ha d'anar la mostra que s'estudia, s'introdueixen 2 μL de la mostra de l'ADNc; en el tub del control negatiu s'introdueixen 2 μL d'aigua; i en un altre tub es posa la mateixa quantitat de la mostra que fa de control positiu.

3. Es col·loquen les mostres en un termociclador. El programa del termociclador per amplificar el gen BCR-ABL mitjançant PCR segueix el protocol següent: 10 minuts a 95°C per separar les cadenes de l'ADNc inicial; seguit de 40 cicles que consten de 3 fases: desnaturalització per garantir



Figura 70. Termociclador per a PCR.

la separació de les dues cadenes de cada molècula motlle d'ADN (30 segons a 94°C), una fase d'hibridació on s'uniran els oligonucleòtids (primers) a la molècula motlle d'ADN (60 segons a 65°C); i una última fase d'elongació, on la Taq polimerasa farà la còpia de l'ADN (60 segons a 72°C). Finalment, després dels 40 cicles, es manté la mostra deu minuts a 72°C , per deixar que la Taq

polimerasa acabi de fer les còpies. El termociclador es programa de manera que, en acabar aquest procés, les mostres es mantenen a 4°C, per tal que es conservin en bon estat.

5. Un cop acabat el procés de la PCR en el termociclador, s'ha de visualitzar el producte amplificat. Normalment, el producte amplificat es visualitza en un gel d'agarosa que es tenyeix amb un colorant que s'uneix a la doble cadena d'ADN, però a l'Hospital Clínic de Barcelona, on he fet pràctiques, es realitza de forma automatitzada, a partir d'un equip d'anàlisi genètic anomenat QIAxcel. D'aquesta manera, el procés és més ràpid i no s'han de manipular tant les mostres. Conseqüentment, només cal introduir-hi les mostres i consultar els resultats a l'ordinador.

RESULTAT:

Un cop acabat l'estudi de biologia molecular, es comprova el resultat que ha donat la reacció en cadena de la polimerasa. S'observa hi han diverses ratlles. Les línies dels exteriors indiquen els calibradors de la màquina. El primer carril correspon a la mostra objecte d'estudi, la del mig el control negatiu, i la tercera el control positiu. S'observa la mateixa imatge en cas del control positiu i la mostra sotmesa a estudi, per tant, la mostra que prové del pacient és positiva, és a dir, es detecta el gen BCR-ABL. Així, doncs, podem corroborar la hipòtesi sobre un suposat cas de LMC: el pacient que va arribar al laboratori amb una analítica amb valors anormals de leucòcits i precursors sanguinis, té el gen BCR-ABL i, per tant, pateix leucèmia mieloide crònica. Per acabar de confirmar els resultats també es faran els estudis citogenètics a fi de detectar la t(9;22).

MOSTRA

CONTROL

CONTROL

NEGATIU

POSITIU

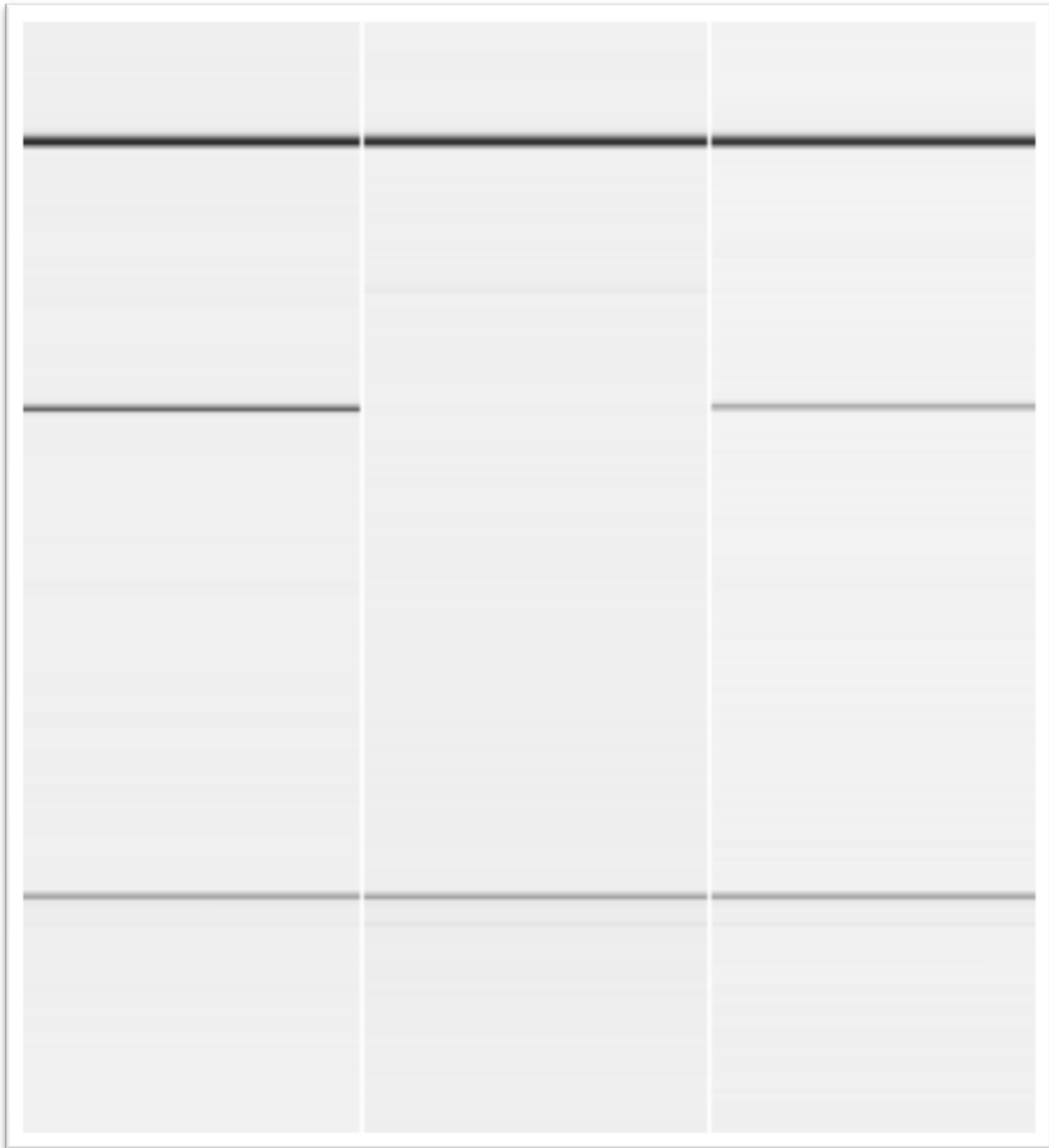


Figura 71. A dalt, resultat de la prova de la PCR per detectar el gen BCR-ABL.

A la l'esquerra, equip d'anàlisi genètic (QIAxcel) per interpretar la PCR.

5.4. PROVES DIAGNÒSTIQUES DE CITOGENÈTICA

Els estudis citogenètics permetran assegurar la veracitat del diagnòstic. Es podrà detectar la translocació $t(9;22)(q34;q11.2)$, i, per tant, quedarà confirmada la hipòtesi que es tracta d'un cas de LMC.

5.4.1. CARIOTIP DE LES CÈL·LULES DE LA MEDUL·LA ÒSSIA

En el cas de la LMC, és necessari realitzar el cariotip a partir d'una mostra de moll d'os i no de sang perifèrica, ja que cal observar moltes mostres de cèl·lules en metafase per detectar el cromosoma Filadèlfia clarament i, precisament, les cèl·lules de la medul·la tenen més capacitat de divisió que les de la sang circulant.

A continuació, es detalla el protocol que es va seguir.

MOSTRA:

Es parteix d'una mostra de medul·la òssia del pacient. La quantitat mínima ha de ser de 0,5 mL recollits en un tub especial amb un medi de cultiu que conté heparina sòdica (anticoagulant) i antibiòtics. És preferible cultivar-lo tan aviat com es pugui. Si no es pot fer d'immediat, cal conservar-lo a la nevera a 2-4°C.

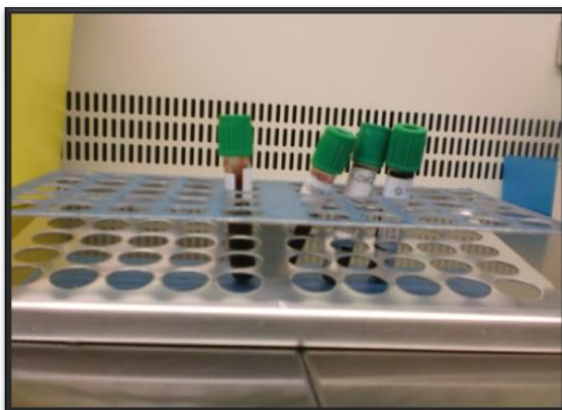


Figura 72. Mostres de medul·la òssia dels pacients.

MATERIAL:

- Pipetes
- Micropipetes
- Puntetes de pipetes
- Flascons
- Tubs cònics
- Tubs de criopreservació
- Portaobjectes
- Cobreobjectes
- Caixes per guardar les preparacions
- Capses de congelació per guardar les mostres
- Nevera
- Centrífuga
- Incubador CO₂
- Estufa de 60°C
- Bany maria a 37°C
- Congelador a -25°C
- Microscopi òptic
- Flux laminar

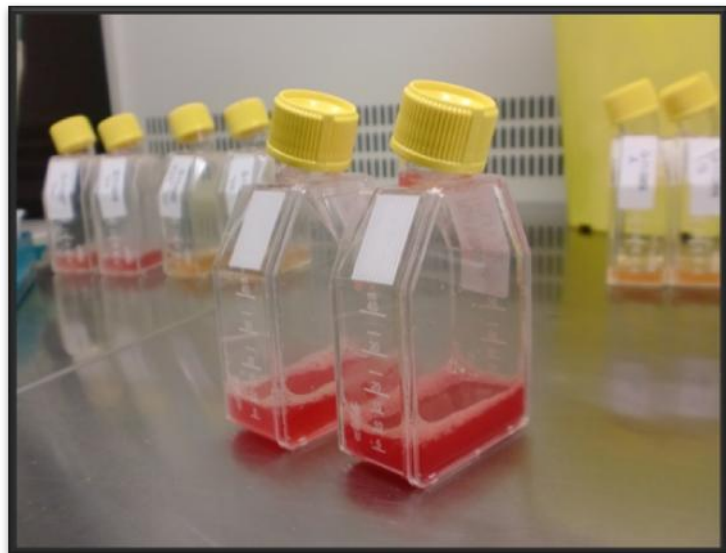


Figura 73. Mostres cultivades, a punt per analitzar.

REACTIUS:

- Medi CHANG
- Heparina sòdica
- Penicil·lina, estreptomina
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)

- Phytohemagglutinin (PHA)
- Colcemid (colquicina)
- Clorur potàssic
- Aigua destil·lada
- Metanol
- Àcid acètic
- Àcid clorhídric
- Etanol absolut
- Xilol
- Tinció de Wright
- Buffer Sörensen

MÈTODE:

1. Es prepara un flascó estèril que conté 8 mL de medi Chang. Aquest medi és utilitzat per al cultiu de cèl·lules de medul·la òssia per obtenir de forma ràpida cèl·lules en mitosi (en divisió).
2. Quan arriba al laboratori la mostra de moll de l'os, se centrifuga a 1800 rpm durant 7 minuts.
3. Amb una pipeta cal travessar el sobrenedant i agafar una mostra de la capa més superficial blanquinosa agafant uns quants leucòcits fins arribar a 0,5 mL si el volum de la capa és escàs, i si és més abundant s'agafen 0,3 mL. En cas que s'observi molta grassa sobre el sobrenadant, és millor treure-la per evitar confondre-la amb la capa de leucòcits.

4. Es barregen els components dins d'una campana de flux laminar i es deixa el flascó una mica obert a l'incubador de CO₂, al 5%, el qual manté la mostra a un pH de 7,3 i a una temperatura de 37°C.
5. Es deixa la mostra a l'incubador unes 22 hores.
6. Al dia següent, s'afegeix 100 µL de colquicina (N-deacetil-N-Metilcolchicina), i es deixa actuar durant 30 minuts. La colquimida atura les cèl·lules que es troben en divisió en l'etapa de la metafase, fase en què els cromosomes són clarament visibles al microscopi.
7. Es passa el cultiu a un tub de plàstic i se centrifuga 1800 rpm durant 5 minuts.
8. Es treu el sobrenedant i s'agita el botó cel·lular utilitzant l'agitador de vòrtex, a la vegada que s'afegeix gota a gota, amb una pipeta, una solució hipotònica¹⁸ (KCl 0,075 M precalentada a 37°C). S'omple el tub fins a dalt.



Figura 74. Introducció de la solució hipotònica.

¹⁸ Una solució hipotònica és aquella que té menor concentració de solut que el medi intern de la cèl·lula.

9. Es col·loca el tub mig tombat de manera que la major quantitat possible del tub quedi coberta per la solució hipotònica. Aquesta solució farà augmentar les cèl·lules de volum i els cromosomes se separaran.

10. S'incuba durant 45 minuts al bany, a 37°C.



Figura 75. Moment en què s'afegeix el fixador.

11. Es treuen els tubs, un per un, del bany i s'hi afegeix 0,5 mL gota a gota de fixador.

12. Es tapa el tub i s'agita dues vegades. Seguidament, es deixa uns 10 minuts a temperatura ambient.

13. Es torna a centrifugar a 1800 rpm durant 5 minuts. Es treu el sobrenedant i amb la l'ajuda de l'agitador de vòrtex s'aconsegueix que el botó cel·lular torni a estar en suspensió, mentre es fica gota a gota el fixador Carnoy. El fixador de Carnoy està compost d'etanol al 60%, cloroform al 30% i àcid acètic al 10%.

14. Es deixa la mostra 30 minuts a la nevera a 4°C.

15. Es treu la mostra de la nevera, i es torna a centrifugar a 1800 rpm durant 5 minuts.

16. Es fan tres rentats amb el fixador de Carnoy fins que el botó cel·lular estigui net.

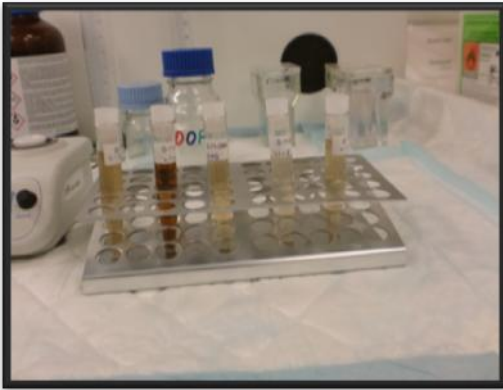


Figura 76. Mostres després de la centrifugació

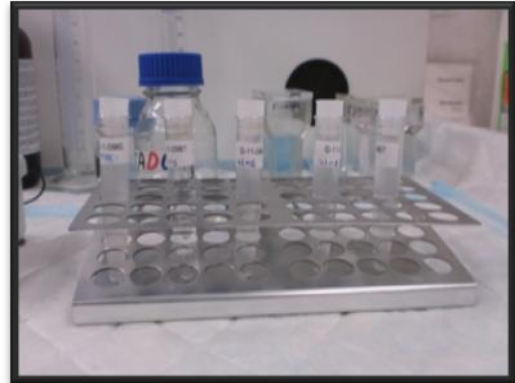


Figura 77. Mostres després del segon rentat.

17. Es netegen primer els portaobjectes, deixant-los en una solució HCl/etanol (5%/95%) i després es passen per etanol. S'eixuguen amb paper de cel·lulosa.
18. S'afegeixen aproximadament uns 0,3 mL de fixador per diluir el botó cel·lular i es posen 3 gotes en els portaobjectes nets i entelats amb l'alè des d'una certa altura. El botó cel·lular que sobra es guarda en tubs de congelació a -25°C .
19. Es deixa envellir la preparació a l'estufa de 60°C tota la nit.
20. Es tenyeix la mostra amb la solució de Wright durant 4-6 minuts.
21. Es passa la preparació per aigua corrent i s'asseca amb paper de filtre.
22. Finalment, es visualitzen els cromosomes en un microscopi òptic. Amb un aparell electrònic de nova generació, és fa el recompte de 20 metafases com a mínim i es realitza el cariotip complet de deu metafases.

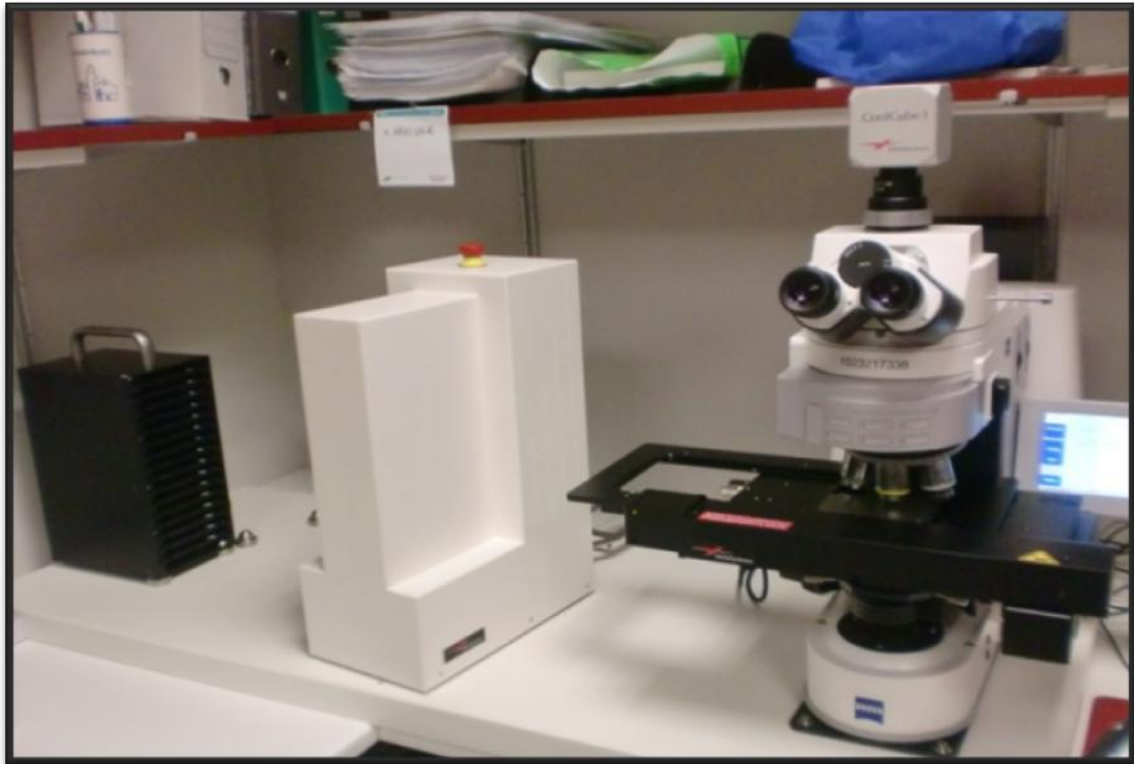


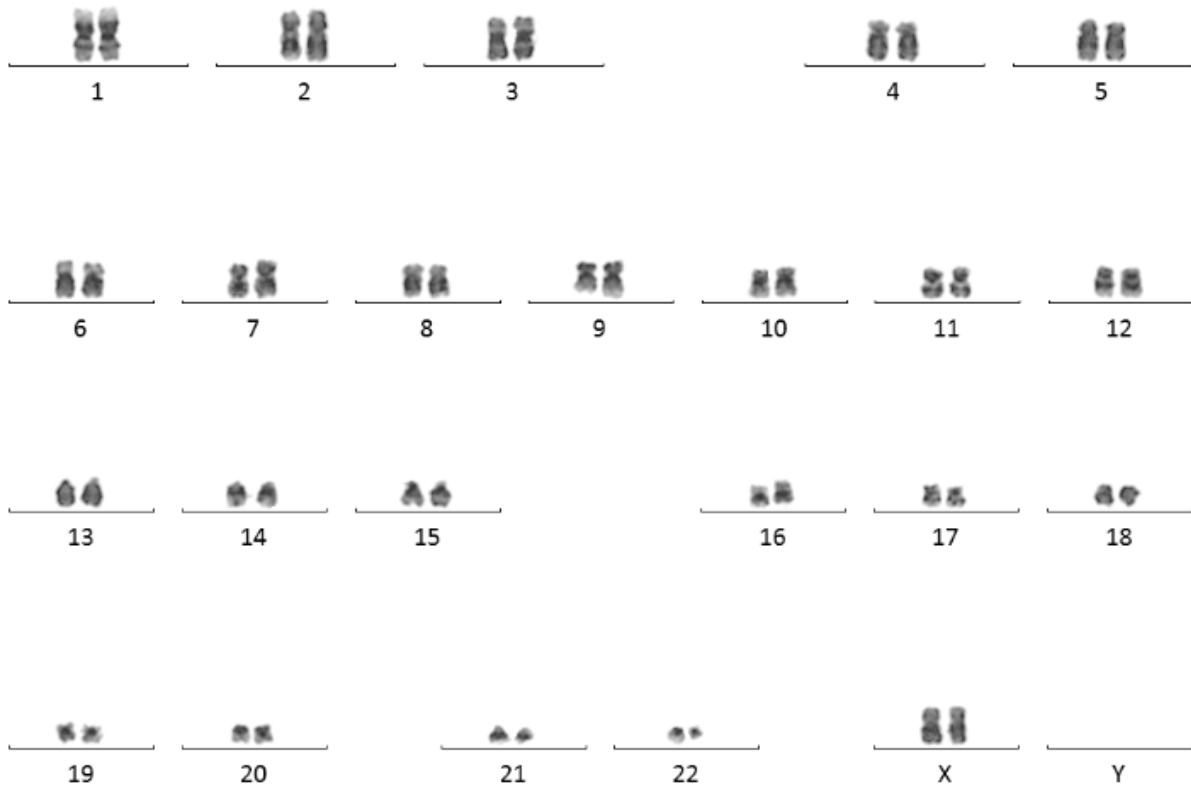
Figura 78. Aparell d'última generació utilitzat per realitzar el recompte de les metafases.

RESULTAT:

Després de realitzar l'estudi citogenètic, el cariotip de les cèl·lules de la medul·la òssia del pacient presenta la translocació entre els cromosomes 9 i 22. S'observa un cromosoma 22 amb el braç llarg més curt del normal (cromosoma Filadèlfia) i un cromosoma 9 que té el braç llarg amb una major longitud. Per tant, les anomalies cromosòmiques observades en el cariotip del pacient confirmen els resultats de l'estudi molecular, i permeten corroborar la hipòtesi pel que fa a la diagnosi de la malaltia: el pacient presenta una LMC.

La imatge, corresponent al cariotip obtingut, és la següent:

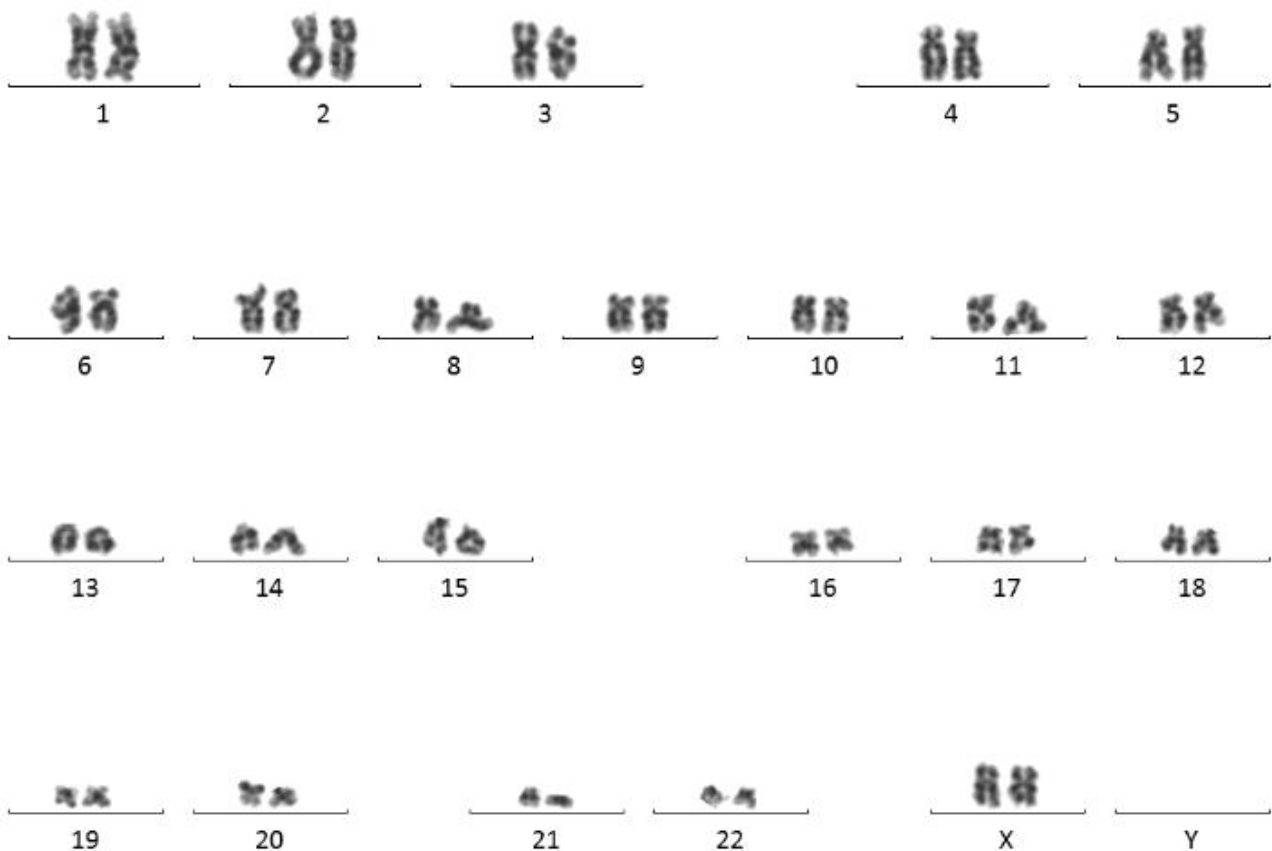
46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)



La fórmula que apareix sobre el cariotip és l'anomenada **46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)**, on el **46** correspon el nombre total de cromosomes; **XX** representen els cromosomes sexuals d'una dona; **t(9;22)(q34;q11.2)** indica que s'ha produït d'una translocació a nivell de la regió q34 del cromosoma 9 i la regió q11.2 del cromosoma 22. La **q** fa referència al braç llarg del cromosoma, situat per sota del centròmer, ja que el braç curt se simbolitza amb una p.

Per acabar amb l'estudi del cariotip del pacient, es compara amb un de normal, per tal de confirmar les diferències pel que fa a la mida en el cas dels cromosomes afectats per la translocació. S'aprecien clarament les diferències entre els cromosomes 9 i 22 normals i els corresponents al cariotip del pacient amb LMC, com s'ha comentat abans.

46,XX



5.4.2. ESTUDI DE LA TRANSLOCACIÓ MITJANÇANT LA TÈCNICA FISH

Finalment, s'utilitza la tècnica de FISH (hibridació in situ fluorescent), per visualitzar la translocació que s'ha detectat al cariotip. En primer lloc, la mostra d'ADN (que prové de cromosomes metafàsics o nuclis en interfase) es desnatura, procés que separa els filaments complementaris de l'estructura en doble hèlix de l'ADN. A la mostra desnaturada se li afegeix, llavors, la sonda fluorescent d'interès que s'associarà a l'ADN de la mostra en el lloc diana (on hi ha l'anomalia), en el procés anomenat **hibridació**, on es torna a formar una doble hèlix. El senyal emès per la sonda híbrida s'observa mitjançant un microscopi de fluorescència i, així, es pot detectar l'anomalia de l'ADN de la mostra. Aquesta tècnica és molt eficaç i es pot fer sense necessitat d'obtenir metafases, però a la vegada és una mica lenta.

MATERIAL:

- Pipetes
- Micropipetes
- Puntetes de pipeta
- Tubs eppendorf
- Flascons
- Tubs cònics
- Portaobjectes
- Llapis diamant
- Cobreobjectes
- Cubetes
- Provetes graduades
- Cabina de flux laminar
- Centrífuga
- Incubador CO₂

- Placa tèrmica
- Micro centrífuga
- Bany maria
- Microscopi de fluorescència
- Thermobrite
- Nevera a 4°C
- Congelador a -25°C
- Analitzador d'imatges (Metasystem, Cytovision) amb software de FISH.

REACTIUS:

- Sonda LSI t(9;22) ABL1 / BCR
- MIX d'hibridació sonda LSI
- Aigua bidestil·lada estèril
- DAPI II
- Medi de cultiu CHANG
- Colcemida
- Clorur potàssic
- Metanol
- Àcid acètic
- Alcohol absolut

MÈTODE:

1. Es parteix de la mostra de medul·la fixada amb el reactiu Carnoy.
2. Es deixa caure una gota el material fixat en mig d'un portaobjectes.
3. Es manté la mostra a 37°C tota la nit.

4. Es col·loca la preparació cromosòmica en una solució 2xSSC (0,3M NaCl; 0'03 M citrat de sodi; pH 7), a 37 °C durant 30 minuts.
5. Es deshidrata amb etanol al 70%/85%/100% a temperatura ambient.
6. Per a la preparació de la sonda, es mesclen 7µL mix del tampó d'hibridació, 1µL de sonda i 2µL d'aigua bidestil·lada, i se sotmet a l'acció de la microcentrífuga.
7. Es col·loquen 10µl de la sonda preparada sobre l'àrea del portaobjectes on s'ha dipositat la gota de la mostra.
8. Es cobreix amb el cobreobjectes.
9. Es desnaturalitza a 76°C durant 4 minuts en un incubador a 76 °C (thermobrite).
10. S'hibriden en la thermobrite a 37°C, un mínim de 18 hores.
11. Es realitza un rentat de la mostra amb diferents reactius, al final s'eixugua a les fosques la mostra i li s'aplica 10 µL de DAPI a l'àrea d'hibridació. El DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) és una substància fluorescent que s'enllaça a l'ADN. El DAPI pot travessar la membrana cel·lular i pot utilitzar-se per tenyir l'ADN, tant de cèl·lules vives com de fixades.
12. Es cobreix i se segella la mostra. Per conservar-la, es posa al congelador.
13. S'observa la mostra al microscopi de fluorescència.

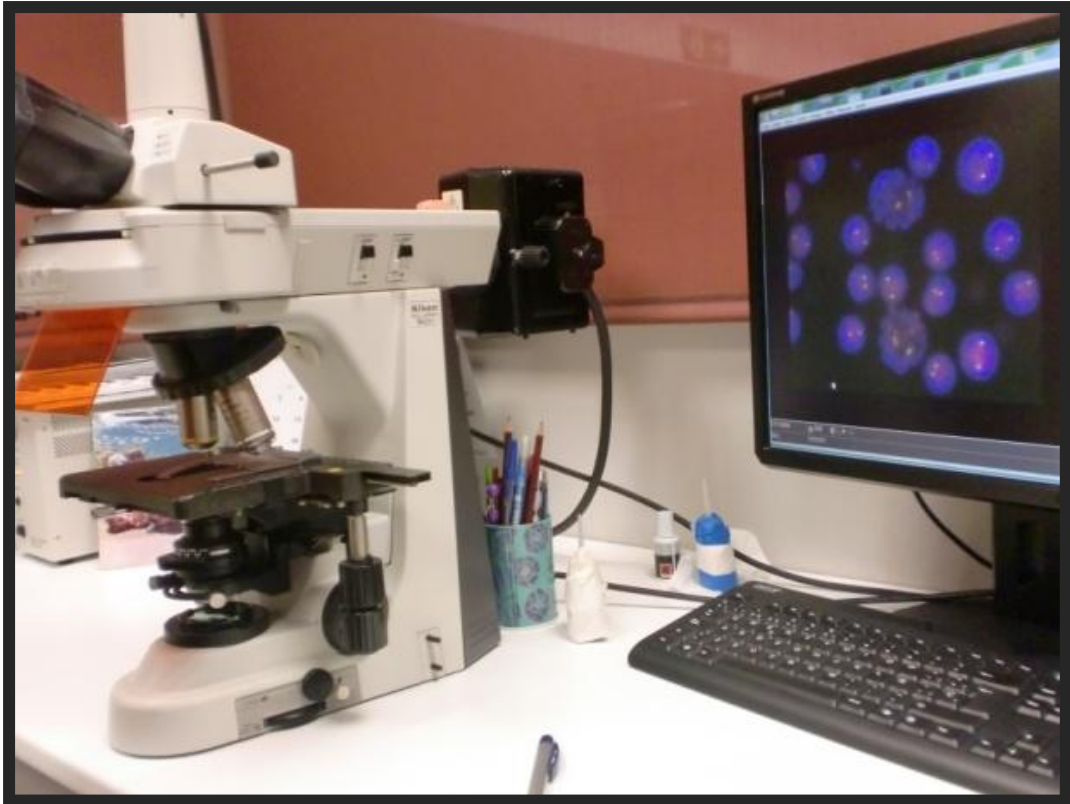


Figura 79. Microscopi i analitzador d'imatges amb software de FISH.

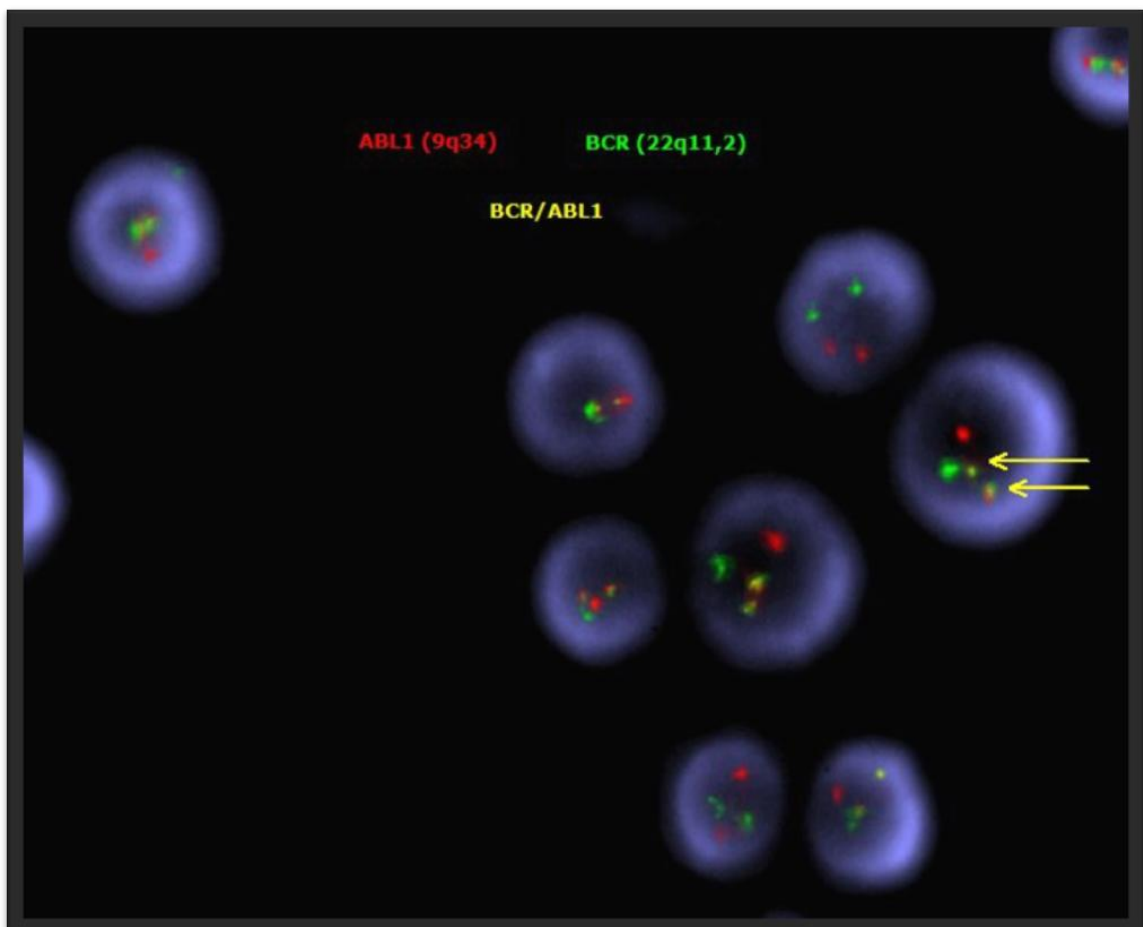


Figura 80. Imatge de la translocació $t(9;22)(q34;q11.2)$ observada amb el microscopi de fluorescència.

RESULTATS:

Es va obtenir la imatge de dalt. S'aprecia clarament que hi ha una translocació, ja que s'observa un senyal verd corresponent al gen BCR (22q11.2), un senyal vermell corresponent al gen ABL (9q34) i finalment dos senyals junts que adquireixen una tonalitat groga, que corresponen als gens híbrids BCR/ABL i ABL/BCR, és a dir, als llocs dels cromosomes 22 i 9 en què el gen BCR i el gen ABL estan junts, com a conseqüència de la translocació recíproca entre aquests cromosomes.

En una persona sana hi haurien d'haver dos senyals verds, corresponents al parell de cromosomes 22 i dos senyals vermells corresponents al parell de cromosomes 9. En canvi, a la pantalla s'observa un senyal verd, un altre de vermell i dos senyals grocs (corresponents al gen híbrid), la qual cosa ens indica que la mostra analitzada correspon a d'un pacient amb leucèmia mieloide crònica. A més a més, en aquesta part de la diagnosi també es poden valorar, si la mostra ho permet, 200 nuclis interfàsics (que no es troben en divisió) i, llavors, es dóna el percentatge de cèl·lules que mostren un patró d'hibridació anòmal. Aproximadament en el 3% dels nuclis hi ha una translocació.

En finalitzar totes les proves diagnòstiques es pot ratificar que la hipòtesi inicial de treball és certa: **efectivament, la patologia que presenta el pacient objecte d'estudi correspon a una leucèmia mieloide crònica.**

6. ENTREVISTES

Una altra part del treball d'investigació que he portat a terme, ha estat la realització d'una sèrie d'entrevistes a pacients de LMC i a un metge hematòleg, especialista en casos de leucèmia.

6.1. ENTREVISTA AL DR. CERVANTES

El Doctor Francisco Cervantes és un hematòleg de l'Hospital Clínic de Barcelona reconegut a nivell mundial. El meu objectiu principal en realitzar aquesta entrevista va ser aprofundir en aquells conceptes d'aquesta malaltia que no m'havien quedat clars i, sobretot, saber quina era la visió d'un metge especialitzat en malalties de la sang. Volia conèixer la seva manera d'actuar davant una leucèmia d'aquestes característiques. El doctor em va confirmar que aquesta malaltia no és hereditària ja que no afecta a les cèl·lules germinals dels òrgans reproductors, precursors dels espermatozoides i òvuls. A més a més, vaig adonar-me que, a diferència de moltes altres malalties, la majoria de pacients de LMC són asimptomàtics en la fase en què se sol detectar aquest tipus de leucèmia, és a dir, molts d'ells no presenten signes de malaltia. Cal destacar d'aquesta entrevista, la importància que el doctor Cervantes va donar al nou tractament farmacològic. És tracta d'un tractament que no cura la malaltia, sinó que la redueix i controla. No obstant, el doctor Cervantes confia en la troballa d'una cura definitiva per a la LMC en un futur no molt llunyà.

6.2. ENTREVISTA A UNA PACIENT AMB LMC

Fa 8 anys que a aquesta pacient li varen diagnosticar la LMC. Com ella diu, va ser un cop dur al principi. Volia conèixer el seu testimoni, saber com va enfrontar la malaltia, quina és la seva resposta als fàrmacs i com conviu, dia a dia, amb aquesta patologia.

A aquesta pacient li van detectar la malaltia durant el període de gestació. Malgrat les dificultats que això podia comportar, va decidir tirar endavant l'embaràs i començar el

tractament després del part. Aquest, és un testimoni de l'eficàcia del nou tractament, l'imatinib. Des del naixement de la seva filla, està sent tractada amb aquest nou fàrmac i afirma que això no li impedeix portar a terme una vida normal. De moment, la malaltia roman sota control. Viu el present i no pensa en el futur; el que ha de venir, ja vindrà, afirma. Sap que en algun moment pot empitjorar, però confia en el tractament i no té por.

6.3. ENTREVISTA A UNA EXPACIENT DE LMC

Finalment, vaig realitzar una entrevista a una expacient de LMC. En aquest cas, el meu interès se centrava en conèixer l'experiència d'una persona que hagués patit la malaltia en un moment en què no es disposava dels fàrmacs actuals que fan remetre la malaltia i la controlen al llarg del temps. Aquesta pacient va haver de recórrer al trasplantament. Com ella afirma, resulta difícil assumir que tens una leucèmia i que això et pot canviar completament la vida. Aquesta entrevista m'ha servit per comparar el tractament actual amb el d'abans. L'expacient explica que van haver de buscar un donant compatible i que sortosament, tres dels seus germans eren compatibles amb ella. El trasplantament era l'única opció per fer front a la malaltia, tot i els riscos que comportava. No obstant, com ella diu, en aquella època no podia triar: o feia el trasplantament o deixava que la malaltia arribés a les fases terminals. En el seu cas, el procés de trasplantament va anar molt bé i va aconseguir eradicar la malaltia. Ara, després de 20 anys, fa vida completament normal i no ha tingut cap recaiguda. Per això, està contenta i satisfeta amb els resultats del seu tractament.

ENTREVISTA A UN METGE HEMATÒLEG

Doctor: Dr. Francisco Cervantes

Especialitat mèdica: Hematologia

Hospital: Hospital Clínic Barcelona

Localitat: Barcelona

Data: 19-11-2011

1. Quins són els principals símptomes de la leucèmia mieloide crònica?

Avui dia, és una malaltia en què no es detecten símptomes en molts casos, ja que aproximadament el 50% dels pacients no presenten signes de malaltia. Això és degut al fet que actualment la gent es fa moltes analítiques, ja sigui per revisions mèdiques rutinàries o per controls laborals, amb les quals s'aprecia un increment molt alt en el nombre de leucòcits. No obstant, a vegades hi ha pacients que presenten alguns símptomes com el dolor abdominal esquerra a causa del creixement de la melsa. Hi ha pacients que també presenten simptomalogia convencional, caracteritzada per febrícula, sudoració nocturna, pèrdua de pes i en alguns casos anèmia.

2. El/la pacient detecta alguns símptomes en les primes fases d'aquesta malaltia?

Depèn del pacient, però com ja hem comentat abans, més de la meitat dels pacients no detecten cap símptoma en les primeres fases de la malaltia.

3. Quina és la incidència de la leucèmia mieloide crònica en la població? A quina franja d'edat se sol manifestar amb més freqüència?

A Espanya no hi ha dades fiables sobre la incidència de la LMC en la població. No obstant, en altres països occidentals, com ara Suècia, els estudis realitzats indiquen que es detecten entre 1 i 1,5 casos nous de LMC per cada 100 000

habitants, a l'any. Però, actualment, l'eficàcia del nou tractament fa que aquesta freqüència no hagi augmentat, tot i que si ha augmentat la prevalença, és a dir el nombre de pacients vius amb LMC.

El rang d'edat en què es manifesta la malaltia se situa, principalment, entre els 55 i 60 anys aproximadament. No obstant això, es pot manifestar en qualsevol edat.

4. Aquest tipus de leucèmia es manifesta per igual en homes i dones?

Se sol manifestar més en homes que en dones, aproximadament entre un 40-60% més.

5. Aquesta leucèmia se sol detectar en les primeres fases?

Sí, el 95% dels casos es detecta en la primera fase, anomenada fase crònica.

6. Quins són els possibles tractaments a seguir en el cas d'una leucèmia mieloide crònica?

Actualment hi ha els inhibidors tirosina quinasa (TKI) com l'imatinib, el qual és eficaç en la majoria dels casos. No obstant, hi ha uns nous fàrmacs, els que anomenem de segona generació, que són el Nilotinib i el Dasatinib, bàsicament. Aquests nous fàrmacs, en un principi, eren subministrats en els casos en què hi havia intolerància a l'imatinib o bé no resultava eficaç. Però, avui en dia, hi ha pacients en els quals ja es comença el tractament amb un d'aquests dos nous fàrmacs, Nilotinib o Dasatinib, ja que s'està veient que són una mica més superiors a l'imatinib.

7. Avui en dia, quin és el tractament més utilitzat en la LMC?

Per suposat, els inhibidors de tirosina quinasa, com l'imatinib.

8. L'imatinib és un nou fàrmac capaç de controlar una leucèmia mieloide crònica. Com funciona? Resulta eficaç? Té efectes secundaris? En quins casos s'administra?

L'imatinib bloqueja la proteïna BCR-ABL, codificada pel gen BCR-ABL, el qual produeix una proteïna BCR-ABL tirosina quinasa que regula el creixement cel·lular. L'imatinib inactiva aquesta proteïna per tal que les cèl·lules no creixin i no proliferin. Té efectes secundaris com rampes musculars, edemes oculars, diarrea, etc., però en general és ben tolerat.

9. En quin percentatge de pacients s'aconsegueix un control de la malaltia amb aquest tipus de medicaments? Els resultats del tractament se solen mantenir de per vida?

És un tractament que, en la majoria dels casos, permet aconseguir un control de la malaltia. Però cal mantenir aquest tractament al llarg dels anys, ja que si s'interromp en algun moment pot haver-hi recaigudes.

10. El trasplantament, un altre camí, és utilitzat en la LMC? En quin cas?

Avui dia, gairebé no es realitzen trasplantaments en el cas d'una LMC. Només es realitza en els casos en què el pacient no respon bé a cap inhibidor tirosina quinasa, o bé perquè ja està en fases més avançades de la malaltia.

11. Quin percentatge de curació permet el trasplantament en el cas de la LMC?

Normalment el 60-65% dels pacients es cura a llarg termini.

12. Cal realitzar la quimioteràpia abans del trasplantament?

Actualment, no es fa quimioteràpia en aquesta malaltia, sinó que se subministra l'imatinib o bé un altre fàrmac inhibidor tirosina quinasa. Això es necessari perquè abans de realitzar el trasplantament cal tenir la malaltia mínimament controlada, evitant que les cèl·lules proliferin de manera incontrolada; en cas contrari, el trasplantament resultaria massa arriscat.

13. Cal subministrar l'imatinib abans i després del trasplantament ?

Sí, es fa això seguint el protocol estàndard que hi ha establert actualment, però encara no se sap què és el millor, ja que se suposa que es si fa un

trasplantament és degut al fet que el pacient no ha respòs bé a l'imatinib i, per tant, no resulta gaire lògic que li tornem a subministrar aquest fàrmac, al qual era intolerant o resistent. Per això, ara s'està valorant si després del trasplantament és millor donar un altre fàrmac inhibidor de tirosina quinasa.

14. Quan cal un trasplantament, com es pot trobar un donant que sigui compatible?

Primer es comprova si els germans són o no compatibles amb el pacient. Però si no són compatibles cal mirar al registre de donació d'Espanya, la fundació Josep Carreres.

De totes maneres, com ja hem comentat, actualment el trasplant és molt poc freqüent en aquest tipus de leucèmia.

15. En el cas de la LMC, es poden utilitzar les cèl·lules mare del cordó umbilical o de sang perifèrica per a un trasplantament?

Sí.

16. En el cas de les dones en edat fèrtil que segueixen un tractament amb imatinib, poden quedar-se embarassades?

Una dona no es pot quedar embarassada quan segueix el tractament amb l'imatinib, ja que això podria produir malformacions en el fetus. Hi ha casos en què els resultats del tractament són molt bons i, si la dona vol quedar-se embarassada, se suspèn el tractament per tal que pugui tenir un fill, però se li fa un seguiment molt controlat a fi de saber si avança la malaltia o no. En el cas que avanci, cal subministrar uns fàrmacs menys eficients que l'imatinib mentre està embarassada, però amb menys efectes secundaris. En canvi, els homes poden ser pares durant el tractament.

17. Quant de temps sol trigar una persona amb LMC a curar-se? Poden produir-se rebrots de la malaltia o bé la curació sol ser definitiva?

Bé, una persona amb el tractament farmacològic actual no es cura, sinó que es controla la malaltia. La única opció factible per curar definitivament la LMC és el trasplantament, però com que és un tractament que comporta molts riscos, amb una mortalitat del 35 %, en la majoria de casos se subministra l'imatinib o un altre medicament similar, excepte en els pacients que no responguin bé a aquest tipus de fàrmac; en els quals es realitza un trasplantament, sempre que sigui possible.

18. Quin tipus de controls ha de seguir un pacient en tractament?

Es fan controls clínics per tal de comprovar si ha disminuït la mida de la melsa; hematològics, per observar si hi ha hagut una disminució de leucòcits; citogenètics, per esbrinar si encara s'observa el cromosoma Filadèlfia; i moleculars, per veure si va disminuint el RNA missatger que sintetitza la proteïna BCR-ABL. En el moment en què ja no es pot veure el cromosoma Filadèlfia, l'única manera de controlar l'evolució de la malaltia és mitjançant tècniques de biologia molecular, ja que ens permeten detectar una cèl·lula portadora del gen BCR-ABL entre un milió.

Al principi, aquests controls s'han de realitzar molt sovint perquè no se sap com respondrà el pacient, però quan la malaltia ja s'ha estabilitzat, aquests controls es poden anar allargant i es realitzen cada 3 o 4 mesos.

19. Com s'actua davant de les recaigudes?

En cas que l'imatinib no funcioni bé, se subministra un dels altres dos fàrmacs, Dasatinib o Nilotinib. Si el pacient és molt jove es pot considerar el trasplantament, ja que normalment té més èxit en persones joves. Però, en tots els casos, sempre se subministra algun inhibidor de tirosina quinasa. En el cas dels trasplantaments també es prescriu aquest tipus de fàrmacs perquè primer cal fer remetre la malaltia, és a dir, eliminar tantes cèl·lules canceroses

com sigui possible. En el cas dels trasplantaments, als 5 primers anys hi ha una taxa de recaiguda.

20. En la LMC intervé algun factor hereditari?

No.

21. Com es comunica una malaltia d'aquest tipus al pacient i al seu entorn familiar?

Abans resultava més difícil perquè l'únic tractament que es podia oferir al pacient era la quimioteràpia i el trasplantament. Avui en dia és més fàcil comunicar-ho, ja que es transmet al pacient un missatge molt positiu centrat en l'eficàcia dels nous tractaments que permeten fer vida normal. No obstant, el pacient sempre experimenta un cert xoc emocional quan li diagnostiquen una leucèmia perquè no sap a quina situació s'enfronta i cal explicar-li amb detall el tractament i el pronòstic de l'evolució de la malaltia.

22. Des del moment de la diagnosi i/o durant el tractament, el/la pacient rep suport per part del servei de psico-oncologia?

Bé, en el cas de la LMC no cal un servei psicològic perquè és una malaltia que té un tractament molt eficaç que no suposa cap canvi radical en la vida d'una persona. En canvi, en els casos de les leucèmies agudes és necessari el servei psicològic per ajudar al pacient a fer front a la malaltia.

En el cas de la LMC, simplement cal fer entendre al pacient que hi ha un tractaments molt eficaç que li permetrà conviure sense problema amb la malaltia, reduïda a la mínima expressió.

23. Pel que fa la LMC, quins tipus de recerques científiques es duen a terme actualment?

Com que sabem que, de moment, no hi ha una curació definitiva, actualment s'estan buscant nous fàrmacs capaços d'eradicar totalment la malaltia, ja que actualment no podem eliminar les cèl·lules mare leucèmiques.

24. Creu que en els propers anys podem trobar la curació definitiva de la leucèmia mieloide crònica?

Jo crec que sí. De fet, fa uns anys no es pensava que es pogués trobar un tractament tan eficaç com l'imatinib. Crec que dintre de 10 anys podríem trobar una cura definitiva per aquesta malaltia.

ENTREVISTA A PACIENT AMB TRACTAMENT PER A LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÒNICA**Edat: 35 anys****Sexe: Dona****Població: Guadalajara****Data: 15 de novembre de 2011****1. Quin tipus de leucèmia pateix?****Leucèmia Mieloide Crònica (LMC)****2. Quan i com li van diagnosticar la malaltia?**

Em van diagnosticar la malaltia als mesos de maig i juny de 2003. Em vaig fer una analítica rutinària de sang perquè havia acabat de quedar-me embarassada, i el nombre de plaquetes era molt elevat (superior a 1.000.000/mm³)

3. Quines proves li van fer per tal del confirmar el diagnòstic de LMC?

A part de repetir-me l'analítica per confirmar els valors obtinguts, em van realitzar una aspiració de medul·la òssia i una biòpsia del moll de l'os, a partir de punxions en l'os de la cresta il·líaca.

4. Coneixia aquesta malaltia?

No massa. Havia sentit a parlar d'ella, però només en tenia un concepte molt bàsic.

5. Com va enfrontar la malaltia?

El dia que em van confirmar el diagnòstic va ser dur, no sabia fins a quin punt canviaria la meua vida, ni com afectaria a l'embaràs, però, sortosament, vaig caure a les mans d'un excel·lent metge que em va ajudar molt a fer front a la malaltia. En pocs dies vaig assumir que la meua vida havia canviat, però que havia de continuar endavant.

6. Li van diagnosticar la leucèmia quan estava embarassada. En quin moment de l'embaràs li van detectar? Va seguir algun tipus de tractament abans de tenir la el seu fill o filla? Quin ? Per què?

Estava embarassada de 7 setmanes. Vaig decidir seguir amb l'embaràs malgrat els riscos a què estàvem sotmeses tant jo, com la meua filla. Totes les setmanes em feia una analítica per valorar l'avenç de la malaltia i comprovar si era necessari o no iniciar un tractament, tenint en compte el moment de gestació en el qual em trobava i els riscos que comportava l'administració de fàrmacs. Finalment, no em va fer falta cap tractament. No obstant, si que va ser necessari avançar 7 setmanes el naixement de la meua filla.

7. Per tant, no va rebre cap tractament durant l'embaràs. Aquest fet va suposar l'acceleració de l'evolució de la malaltia ?

Crec que el fet de no seguir cap tractament al llarg de l'embaràs no va accelerar la malaltia. Va seguir el seu curs, al seu ritme. Les analítiques variaven, algunes setmanes estaven millor i d'altres pitjor, però, dintre d'aquestes irregularitats, seguien una evolució lògica.

8. Quins tractaments ha seguit des del moment de la diagnosi de la malaltia?

Vaig començar el tractament després d'uns dies d'haver donat a llum, perquè primer m'havia de recuperar una mica. Llavors vaig començar a prendre l'imatinib. Primer, 200mg/dia, i després vaig anar augmentant la quantitat a poc a poc en funció de la tolerància, fins a arribar als 800mg/dia.

9. En algun moment ha tingut l'opció de triar o canviar el tractament?

Vaig estar a punt de canviar-lo un parell de vegades en què els resultats de les proves no eren bons, però quan les repetia al cap d'un temps, els resultats tornaven a la normalitat, així que, finalment, no va ser necessari canviar el tractament.

10. Ha estat informada en tot moment dels possibles efectes secundaris del tractament?

Em van indicar que els efectes secundaris més habituals són retenció de líquids, problemes cutanis, etc., però en general és un medicament amb pocs efectes secundaris, i els que pot tenir, no són gaire greus.

11. En quins centres sanitaris va seguir els tractaments?

Vaig començar a tractar-me a l'Hospital de La Paz (Madrid), i actualment segueixo les meves revisions a l'Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

12. En alguna fase de la malaltia ha hagut de sotmetre's a sessions de quimioteràpia?

No, mai m'he hagut de sotmetre a sessions de quimioteràpia. No obstant, em vaig informar dels seus possibles efectes secundaris, com ara la pèrdua de fertilitat i la menopausa precoç.

13. Quins efectes secundaris ha experimentat amb els diferents tractaments?

Retenció de líquids sobretot al matí (ulls i dits inflats) i despigmentació tant de la pell com del cabell. Al principi, quan vaig començar el tractament, se m'inflaven els turmells, però amb el temps ha desaparegut la inflamació.

14. Està satisfeta amb els resultats obtinguts amb el tractament?

Fins el dia d'avui, sí.

15. Li han parlat del trasplantament de medul·la òssia com a possible tractament per a una curació definitiva de la LMC? Sap en què consisteix?

Sí, conec aquesta possibilitat i a trets generals sé en què consisteix, però també sé que hi ha risc de rebuig.

16. Sap que algunes persones poden curar-se mitjançant un trasplantament de cèl·lules mare d'un cordó umbilical compatible? Li han plantejat aquesta possibilitat?

Tinc la sang del cordó umbilical de la meva filla guardada, però, generalment es treu tan poca quantitat de la sang del cordó que, de moment, només s'utilitza per la curació de nens, no és vàlid per a adults.

17. Coneix els nous medicaments de nova generació per a la LMC?

Si, jo em tracto amb l'imatinib, però, des de fa un temps, hi ha dos altres fàrmacs per tractar els pacients resistents a l'imatinib. Aquests fàrmacs són més potents, però també tenen més efectes secundaris i són més mal tolerats.

18. Des del primer moment, s'ha sentit recolzada per part dels seus familiars i amics?

Si, sempre.

19. El tracte rebut per part dels metges, infermeres i altre personal sanitari ha estat satisfactori en tot moment?

Si.

20. A partir de la diagnosi de la malaltia, ha rebut algun tipus de tractament psicològic?

No.

21. L'hospital on fa el tractament, té servei de psico-oncologia? En cas afirmatiu, li han proporcionat aquest servei a l'hospital?

Suposo que si que en té, però no l'he utilitzat.

22. Un cop diagnosticada la malaltia, li van donar recomanacions pel que fa a l'estil de vida que havia de portar (alimentació, activitat física, treball, hores de repòs, etc.)?

No, he seguit fent vida normal.

23. Quina ha estat l'evolució de la seva malaltia? Per quines fases de la leucèmia ha passat?

Sempre s'ha mantingut en fase crònica. Mai he entrat en fase d'acceleració i , per suposat , molt menys en crisis blàstica.

24. Al llarg de la malaltia, quin ha estat el moment més difícil?

Els primers dies, fins que vaig assumir el diagnòstic.

25. Ha experimentat recaigudes?

No.

26. Com se sent ara?

A trets generals, bé. Puc fer una vida normal.

27. Com és el dia a dia amb aquesta malaltia?

La veritat és que és quelcom en què no penso. Només penso en la malaltia quan tinc revisions de control. Em prenc la medicació de manera mecànica, sense pensar-hi. Sé que la meva malaltia hi és, en estat latent, que algun dia puc empitjorar, però de moment em sento bé, i això és el que més importa, el dia a dia. El que hagi de ser, serà; però no em preocupo per això en aquests moments. Visc el present i no penso en el futur.

28. Quines expectatives de futur té? Confia en la curació definitiva de la malaltia?

Suposo que les mateixes que qualsevol altra dona de la meva edat. Almenys en un futur relativament proper. Sé que puc optar per un trasplant de medul·la òssia per curar la malaltia de manera definitiva, però també sé que comporta molt de risc. Com deia el metge que em va tractar durant uns anys, la remissió completa, s'assembla molt a la curació.

29. Donaria algun tipus de consell o recomanació a les persones que pateixen aquesta malaltia?

És molt difícil donar consells. Cadascú es pren les coses d'una manera diferent, però sempre s'ha de ser positiu. S'ha d'aprendre a viure, gaudint del dia a dia, perquè mai saps quan pot canviar el rumb de la teva vida. En el meu cas, no em puc queixar, perquè en ser una malaltia de tipus crònic, la seva evolució és més lenta i, a més a més, els tractaments que hi ha actualment són molt eficaços ja que aconseguen frenar el desenvolupament de la malaltia. Estic contenta perquè puc fer una vida completament normal.

ENTREVISTA A EXPACIENT DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÒNICA**Edat: 51 anys****Sexe: Dona****Població: Avia****Data: 23/11/2011****1. Quin tipus de leucèmia va patir?**

Leucèmia mieloide crònica amb Cromosoma Filadèlfia positiu.

2. Quan i com li van diagnosticar la malaltia?

Al juliol de 1991 vaig tenir una filla i vaig quedar tan dèbil que a mitjans d'agost em van fer una analítica que va confirmar que estava anèmica (només em van controlar això), em van receptar ferro per prendre durant 3 mesos i el 21/10/1991 en tornar a fer una analítica de control, em van trobar que tenia 30.300 leucòcits/mm³. Em van repetir dues vegades l'analítica durant aquella setmana i vaig obtenir el mateix resultat. El divendres, dia 25, el metge de capçalera em va fer els papers per anar a l'Hospital Clínic de Barcelona el dilluns, dia 28, a primera hora.

3. Quines proves li van fer per tal del confirmar el diagnòstic de LMC?

El primer dia només una analítica, al cap d'una setmana un mielograma i finalment una biòpsia de medul·la òssia.

4. Coneixia aquesta malaltia?

Per desgràcia coneixia els casos de dos amics meus que havien mort d'aquesta malaltia no feia gaire temps. Vaig pensar que jo seria la propera.

5. Com va enfrontar la malaltia?

Al principi molt malament, tenia dues nenes massa petites per deixar-les sense mare, la gran només tenia 2 anys i la petita 3 mesos, o sigui que va ser "un gerro d'aigua freda molt gran". Sortosament, aviat vaig canviar el "xip" i si al principi pensava "per què m'ha tocat a mi?", ho vaig canviar per "i per què no m'havia de tocar a mi i a un altre si?".

6. Quina ha estat l'evolució de la seva malaltia? Per quines fases de la leucèmia ha passat?

Es pot dir que només he passat per dues fases: una, al principi, quan em van diagnosticar la malaltia i, l'altra, quan em van dir que m'havien de fer un trasplantament. En el moment de la diagnosi tenia 30.300 leucòcits/mm³ i fins el 24/02/1992 no em van augmentar fins als 43.000 i, a partir d'aquí, ja no em van augmentar gaire més fins a la data del trasplantament; per sort, l'evolució era lenta.

7. Quins tractaments va seguir des del moment de la diagnosi de la malaltia?

Quan em van diagnosticar la malaltia, no em van receptar cap tipus de tractament, fins que els leucòcits van assolir valors de 43.000/mm³. Aleshores, em van receptar unes pastilles de quimioteràpia, amb les quals pràcticament no vaig notar cap efecte.

8. En algun moment va tenir l'opció de triar o canviar el tractament?

No va caldre. A part de les pastilles, no vaig prendre res més.

9. En quina fase de la malaltia li van proposar el trasplantament de medul·la òssia?

Va ser el 4/12/1991. Fins aleshores el metge em deia que aquesta era una possibilitat a llarg termini, per si calia algun dia. Quan m'ho va proposar, era conscient que no hi havia cap altra opció, però em vaig espantar molt. Sempre agrairé les paraules d'una doctora que hi havia al poble a la qual vaig acudir per explicar-li les meves pors i desfogar-me una mica. Ella em va explicar que era fantàstic el fet m'haguessin proposat el trasplantament, ja que era un tractament que proporcionava la curació definitiva de la malaltia. Quan vaig sortir del seu despatx, era una altre persona, em sentia molt més animada i disposada a fer el que calgués. Vaig tornar a treballar després del permís de maternitat, i no vaig agafar la baixa laboral fins dues setmanes abans del trasplantament. Hi havia dies en què veia el futur amb esperança i d'altres en què tot ho veia negre, però llavors mirava les meves nenes i ja tornava a carregar piles.

10. Des del moment en què li van plantejar la necessitat d'un trasplantament, a quins tractaments, proves o intervencions li van fer?

Primerament, vam buscar el donant entre tots els meus germans, quatre nois i tres noies. Vam anar un dia a l'Hospital Clínic tots plegats i ens van fer les proves de compatibilitat. Per mi va ser molt emocionant, perquè tots em deien "tant de bo sigui jo".

11. Quant de temps van trigar a trobar un donant compatible?

Va ser al cap de pocs dies de fer les proves que em van trucar i em van dir que tenia 3 possibles donants, i una curiositat és que dels 8 germans, 4 érem A+ i 3

B+, i els compatibles van ser els 3 B+ (ara estem empatats). Es tractava de la meva germana petita, que van descartar perquè havia sigut mare feia poc, i dos germans, dels quals van escollir el més jove. Sortosament no el vaig haver d'escollir jo!

12. Quines etapes del procés li van resultar més dures o difícils?

Per a mi totes van ser dures, des del dia que vaig marxar de casa per ingressar a l'hospital, el 25/03/1993, i que va suposar haver-me d'acomiar de les meves filles, que no entenien res, sobretot la petita, fins al moment en què em van haver de posar el catèter, ja que els va costar molt (no trobaven la vena). També els vòmits provocats per la quimioteràpia (vaig estar vomitant 4 o 5 vegades cada dia durant 5 mesos, dies més, dies menys, però cada dia!), la immobilitat que va suposar estar 1 hora estirada de costat (½ hora per cada banda) en una sala per fer la radioteràpia al llarg de 4 dies, el problema del menjar, jo el trobava salat i li deia al meu marit que el provés i ell em deia que estava bo i jo no ho podia entendre. No va ser fins al cap de molts dies que em van dir que era per la quimioteràpia, ja que se m'havia alterat el gust. Tenia úlceres a la boca i al coll, etc. Quan vaig ingressar a l'Hospital per al trasplantament vaig posar-me malament de debò. Alguns dels medicaments em feien pujar la febre, fins a passar dels 40 °C. Una vegada, se'm va infectar el catèter i me'l van haver de canviar. Al principi, la caiguda del cabell va ser mínima, però va anar augmentant ràpidament. Un matí, quan vaig veure que els cabells em queien molt fàcilment, vaig passar els dits de la mans entre ells i ja no me'n va quedar ni un. Després del trasplantament, el problema més greu va ser que la medul·la era una mica "gandula" (així ho deien les metgesses que em visitaven) i vaig trigar una mica a fabricar defenses. No vaig tolerar el medicament contra el rebuig i me'l van haver de retirar abans d'hora.

13. Va trigar molt a recuperar-se?

Un any i mig. En aquest temps vaig haver d'ingressar dues vegades per pneumònies i una varicel·la.

14. Quins efectes secundaris va experimentar amb els diferents tractaments?

Els efectes secundaris van ser a partir del trasplantament: a part dels vòmits, la menopausa, rampes molt doloroses a les extremitats inferiors que encara ara no han marxat (els metges no saben perquè passa això i com combatre-les) i tinc cataractes degut a la radioteràpia.

15. Està satisfeta amb els resultats obtinguts amb els tractaments?

Tenint en compte que han passat més de 18 anys, estic més que satisfeta amb el resultat.

16. Avui en dia, hi ha uns fàrmacs com l'imatinib que ajuden a controlar aquesta malaltia. Ha sentit a parlar d'aquests tractaments ? Què en pensa?

No n'he sentit a parlar. A mi em van fer un tractament amb Interlukina 2, era experimental i em van dir que servia per prevenir una recaiguda. Es tractava d'unes injeccions amb unes dosis que anava augmentant fins el màxim que pogués resistir el meu cos. Encara ara tinc com uns clots a la pell en els llocs de les injeccions (cuixes i braços). Sigui pel tractament o no, jo fins ara no he tingut cap recaiguda. A mi, el fet de provar aquest tractament, em va fer sentir conillet d'índies, però si es tracta d'ajudar a la investigació, benvinguts siguin aquests medicaments experimentals.

17. Des del primer moment, s'ha sentit recolzada per part dels seus familiars i amics?

Del tot. La meua família és molt gran, en tots els sentits, hem viscut moments molt feliços però també moments difícils, però sempre hem fet pinya i la veritat és que jo no em vaig sentir mai sola. Durant els tres mesos que vaig estar ingressada, el meu marit venia cada dia a fer-me companyia, va ser un puntal molt fort. Pel que fa als amics, puc dir que vaig descobrir quins eren els veritables amics, els que es van preocupar per mi abans, durant i després de la malaltia. També vaig comprovar que a l'hora de donar ànims a un malalt, no en sabem massa. No obstant, no culpo a ningú, però el fet de dir-te "això no serà res" resulta massa frívol en el cas d'una malaltia d'aquest tipus.

18. El tracte rebut per part dels metges, infermeres i altre personal sanitari ha estat satisfactori en tot moment?

Del tracte de l'equip de metges i de la majoria d'infermeres, del personal auxiliar i de neteja, n'estic molt contenta. Però va haver-hi algunes infermeres del torn de nit que segurament eren molt bones professionals, però molt poc sensibles amb el tracte personal.

19. A partir de la diagnosi de la malaltia, ha rebut algun tipus de tractament psicològic?

No em va caldre, el fet de poder-ne parlar ja em va servir de teràpia.

20. L'hospital on va fer el tractament, té servei de psico-oncologia? En cas afirmatiu, li van proporcionar aquest servei a l'hospital?

No sé si en tenien, suposo que sí, perquè a mi em va venir a veure una psicòloga al principi d'estar ingressada i em va fer unes quantes preguntes; quan jo li vaig

dir que el que em preocupava més era el tema del menjar, va marxar i no va tornar més.

21. Un cop diagnosticada la malaltia, li van donar recomanacions pel que fa a l'estil de vida que havia de portar (alimentació, activitat física, treball, hores de repòs, etc.)?

Només em van dir que no podia quedar-me embarassada, però que podia fer vida normal i així ho vaig fer.

22. Durant tot el procés de trasplantament va canviar molt el seu estil de vida?

Evidentment. Jo no vaig tornar a casa meva fins al mes d'octubre del 1993, perquè no estava bé per poder cuidar les nenes. Tot i així, vaig haver de necessitar ajuda durant força temps perquè, de tant en tant, agafava algun virus.

23. Ha experimentat recaigudes?

Fins ara no.

24. Com se sent ara?

Molt feliç, però els dolors que tinc a les articulacions, les rampes nocturnes, el problema de la visió, la osteopènia, etc., fan que no en pugui ser més.

25. El trasplantament ha permès la curació definitiva de la leucèmia?

No sé si atrevir-me a dir que sí, però em sembla que després de 18 anys m'ho vull creure.

26. Li fan controls periòdicament a fi d'evitar possibles rebrots de la malaltia?

Cada any vaig a l'Hospital Clínic per fer-me una analítica i em visita la hematòloga que ja em va tractar durant el trasplantament.

27. Donaria algun tipus de consell o recomanació a les persones que pateixen aquesta malaltia?

Jo sempre vaig optar per parlar obertament de la malaltia. Per això, a vegades em costa veure gent que prefereix callar-s'ho. Jo, personalment, recomano parlar-ne, sobretot amb persones de confiança i que et donin el suport necessari. Si en parles et descarregues una mica del pes psicològic que suposa el diagnòstic. Finalment, és important no sentir-se sol o sola al llarg de tot el procés i, sobretot, ser molt optimista; per això, es necessita tenir un objectiu que t'ajudi a lluitar. En el meu cas, van ser les meves nenes.

7. CONCLUSIONS

Un cop finalitzat el treball, a partir de la recerca bibliogràfica realitzada i dels resultants obtinguts en l'experiència de diagnosi al laboratori clínic, podem arribar a una sèrie de conclusions que permetran corroborar o no cadascuna de les hipòtesis plantejades en iniciar el treball.

- ***Hipòtesi 1: la LMC és una malaltia hereditària.***

La investigació realitzada demostra clarament que aquesta hipòtesi és falsa, ja que la LMC està directament relacionada amb una anomalia genètica adquirida en vida, que consisteix en una translocació entre els cromosomes 9 i 22 que es produeix en una cèl·lula mare hemapoètica de la línia mieloide de la medul·la òssia i, consegüentment, en les cèl·lules sanguínies que origina aquesta cèl·lula mare anòmala del moll d'os. En cap cas, l'anomalia genètica afecta a les cèl·lules d'altres òrgans. Per tant, no és una malaltia hereditària. En aquest cas, la translocació no es dona en les cèl·lules germinals responsables de la producció dels espermatozoides o òvuls, no afecta a les cèl·lules reproductores, per això un pacient amb LMC no pot transmetre la malaltia als seus fills. El resultat de la translocació entre els cromosomes 9 i 22 és el gen híbrid BCR-ABL que queda situat al cromosoma 22 (cromosoma Filadèlfia) d'una cèl·lula mare mieloide de la medul·la òssia. Aquest gen mutant promou la proliferació de les cèl·lules sanguínies de la línia mieloide, sobretot dels leucòcits, que provenen de la cèl·lula mare afectada de la medul·la òssia.

- ***Hipòtesi 2: es coneix la causa de la malaltia.***

En aquest cas, no es pot corroborar totalment la hipòtesi, ja que es coneix l'origen de la malaltia, una anomalia genètica adquirida en vida, però no la causa de la

mutació. Cal, doncs, cercar l'origen de la LMC en una translocació entre el cromosoma 9 i 22, que ocasiona la formació del gen mutant BCR-ABL que codifica per a la proteïna BCR-ABL tirosina quinasa, la qual promou el creixement i la proliferació descontrolada de les cèl·lules mieloides, sobretot dels leucòcits granulòcits, com abans hem indicat. No obstant això, no se sap de ciència certa quines són les causes de l'anomalia genètica, tot i que es considera que les persones que hagin estat sotmeses a altes quantitats de radiacions ionitzants o bé a determinades substàncies químiques com el benzè, són més propenses a patir la mutació que origina la malaltia. Tot i així, no hi ha estudis suficientment contrastats que permetin establir amb exactitud la causa que provoca la translocació entre els cromosomes 9 i 22.

- ***Hipòtesi 3: la LMC no es pot diagnosticar només amb una anàlisi de sang.***

A partir dels resultats del treball experimental realitzat a l'Hospital Clínic de Barcelona, es pot concloure que aquesta hipòtesi és certa, atès que la LMC és una malaltia que no es pot diagnosticar només amb una anàlisi de sang, ja que els resultats obtinguts en la analítica poden correspondre a diferents malalties hematològiques. No obstant això, la interpretació de l'anàlisi de sang ens pot fer sospitar que la patologia correspon a una LMC i, a partir d'aquí, es poden emprar mètodes de diagnosi més segurs, com ara les proves de biologia molecular i citogenètica. Per tant, determinades desviacions dels valors normals de l'anàlisi de sang, com ara l'increment en el nombre de leucòcits, l'augment de cèl·lules precursors a la sang perifèrica, un elevat nombre de plaquetes i la disminució de l'hemoglobina, ens poden fer pensar en una LMC, però en cap cas permeten confirmar la diagnosi d'aquesta malaltia.

- ***Hipòtesi 4: aquesta malaltia es pot diagnosticar només amb proves citogenètiques.***

En arribar a l'Hospital Clínic de Barcelona, per dur a terme el treball experimental, pensava que no calia fer totes les proves de diagnosi en cada pacient. Així, per exemple, creia que la prova citogenètica, és a dir, l'estudi dels cromosomes mitjançant un cariotip, seria suficient per confirmar un cas de LMC. La metodologia emprada al laboratori clínic em va permetre comprovar que aquesta hipòtesi no té validesa, ja que la prova citogenètica no és totalment fiable a l'hora de diagnosticar la LMC i, conseqüentment, cal fer altres proves addicionals, com ara la detecció del gen BCR-ABL mitjançant tècniques de Biologia Molecular. Les proves de citogenètica serveixen per identificar el cromosoma Filadèlfia, però no ens podem refiar només d'aquesta prova perquè en molts pacients en tractament es produeix una remissió important de la malaltia; aleshores, la quantitat del cromosoma Filadèlfia també es redueix, ja que queden poques cèl·lules canceroses a l'organisme, i a l'hora de fer el cariotip del pacient és possible que en les metafases observades al microscopi no es visualitzi el cromosoma Filadèlfia, la qual cosa no vol dir que no sigui present en cap altra cèl·lula del pacient. Cal tenir en compte, doncs, que durant remissió de la malaltia hi ha una petita quantitat de cèl·lules leucèmiques Ph⁺ (portadores del cromosoma Filadèlfia) que generalment no s'identifiquen en un estudi cromosòmic mitjançant microscopia òptica, llavors es parla de malaltia mínima residual. En aquesta etapa de la malaltia és necessari emprar tècniques que permetin detectar la presència del gen BCR-ABL. És per això que les proves diagnòstiques de citogenètica convencional sempre s'acompanyen d'una prova més sensible de citogenètica molecular, com la prova FISH, o bé d'una prova de Biologia Molecular, com la prova RT-PCR. Aquesta prova és molt sensible i, segons la tècnica que s'utilitzi, pot arribar a detectar una cèl·lula leucèmica entre un milió de cèl·lules normals, aproximadament.

- ***Hipòtesi 5: és una malaltia que evoluciona lentament en la majoria de casos.***

Aquesta hipòtesi es pot corroborar, ja que tots els estudis mèdics consultats, així com els testimonis dels pacients entrevistats, confirmen que la LMC és una malaltia de desenvolupament lent, que sol romandre molt de temps en la fase inicial estable, anomenada fase crònica. De fet, quan el pacient respon satisfactòriament al tractament, la malaltia no sol progressar cap a les fases avançades (fase accelerada i crisi blàstica). Tot i així, hi ha casos excepcionals en què la malaltia evoluciona cap a les fases terminals, generalment a causa d'una intolerància o resistència als fàrmacs utilitzats actualment per aconseguir la remissió i el control de la LMC. En aquests casos, si cap medicament de segona generació aconsegueix frenar la malaltia, cal recórrer a un trasplantament de medul·la òssia. També es pot donar el cas que la LMC romanguí asimptomàtica durant la primera fase i sigui diagnosticada en les fases avançades, tot i que no és el cas més freqüent perquè la majoria de les persones se sotmeten a analítiques de sang rutinàries, en les quals es pot detectar fàcilment un increment anormal de leucòcits, alertant així d'una possible leucèmia.

- ***Hipòtesi 6: un pacient de LMC es pot curar definitivament , per tant hi ha algun tractament eficaç que permet el guariment complet de la malaltia.***

Pel que fa a aquesta hipòtesi, cal dir que l'únic tractament que pot curar la leucèmia mieloide crònica de forma definitiva és un trasplantament de medul·la òssia, però actualment no se sol recórrer a aquest procediment, ja que el tractament farmacològic a base d'inhibidors de la tirosina quinasa, com ara l'imatinib, sol ser prou eficient en la majoria dels casos. Per tant, avui dia, s'aconsegueix la recessió de la malaltia, estabilitzant-la en fase crònica. Abans, aquesta malaltia podia resultar mortal, ja que sense un trasplantament reeixit, el pacient tenia una esperança de vida d'uns 5 anys. Ara, amb la incorporació d'aquest tractament revolucionari,

l'esperança de vida és aproximadament de 20 anys, amb una qualitat de vida molt bona. Tenint en compte que, en la majoria dels casos, la malaltia es diagnostica en persones de 50-65 anys, l'esperança de vida d'un pacient amb resposta òptima al tractament no difereix gaire de la d'una persona sana. Cal dir, però, que els fàrmacs de segona generació, d'alta eficàcia, com el nilotinib i el dasatinib, encara són relativament nous i no hi ha suficients dades estadístiques pel que fa a la supervivència dels pacients que reben un diagnòstic de LMC i segueixen un tractament amb aquests nous medicaments. El trasplantament de medul·la òssia comporta molts riscos i complicacions, per la qual cosa es reserva per als pacients que presenten una clara intolerància o resistència a l'imanitib i als fàrmacs de segona generació. Aquests medicaments presenten alguns inconvenients, com ara els efectes secundaris que produeixen, generalment lleus, i el fet d'haver de seguir el tractament sense interrupcions, ja que, en cas contrari, la malaltia experimenta rebrots.

El descobriment d'aquests nous fàrmacs, ha obert noves línies d'investigació pel que fa a la recerca de tractaments per als diferents tipus de leucèmies. Prenent el cas de la LMC com a model, s'ha vist que una vegada identificada l'anomalia genètica, origen de la malaltia, cal dissenyar el compost químic específic que permeti inhibir la proteïna fabricada pel gen anòmal, és a dir, cal anul·lar l'expressió del gen mutant. D'aquesta manera, es poden obtenir fàrmacs que transformin una malaltia agressiva i de mal pronòstic en una malaltia crònica.

D'altra banda, amb les entrevistes realitzades, he pogut comprovar com ha evolucionat el tractament emprat en pacients de LMC al llarg del temps. Així, m'ha estat possible comparar el tractament que seguia una pacient fa 18 anys, basat en un trasplantament de medul·la òssia, amb el tractament actual a partir de fàrmacs de nova generació. M'ha impressionat el testimoni de la pacient que es va sotmetre a radioteràpia, quimioteràpia i trasplantament, com a única solució possible per fer front a la malaltia, ja que abans no existia un tractament farmacològic eficaç. Els patiments i les

complicacions que va experimentar posen de manifest l'agressivitat i els riscos associats al trasplantament. En canvi, la pacient que segueix el tractament amb imanitib fa vida normal i manté controlada la malaltia en fase crònica, amb bon pronòstic de futur. Això m'ha permès adonar-me de la importància que té la investigació biomèdica i farmacològica a l'hora de trobar l'origen dels diferents tipus de leucèmia i el tractament més eficaç en cada cas.

L'entrevista que vaig realitzar al Doctor Francisco Cervantes em va servir també per apropar-me a la malaltia des del punt de vista mèdic. Aquest hematòleg ratifica que el descobriment de l'imanitib i els altres fàrmacs de nova generació representen un gran avenç en el tractament de la leucèmia mieloide crònica. A més el Dr. Cervantes confia en la cura definitiva de la LMC en un futur no molt llunyà; per tant, la seva opinió transmet confiança i esperança a les persones que pateixen la malaltia.

D'altra banda, el treball experimental realitzat a l'Hospital Clínic de Barcelona, m'ha permès comprovar que la diagnosi de la LMC requereix una sèrie de proves complexes que cal realitzar amb tota exactitud, seguint els protocols establerts. Cal extremar les mesures higièniques al laboratori per evitar contaminacions i, per consegüent, resultats erronis. També és important utilitzar repliques d'una mateixa mostra i realitzar l'experiment varies vegades, per contrastar els resultats i descartar errors derivats d'un mal procediment. Remarco també la necessitat d'establir mostres de control, de composició coneguda, les quals ajuden a interpretar amb precisió el resultat de les proves realitzades. La comparació amb la mostra de control és l'única forma de comprovar que els canvis produïts en la mostra biològica sotmesa al procés de diagnosi han succeït realment com a resultat de sotmetre-la a les condicions experimentals i no han estat causats per altres factors ambientals no controlats; d'aquesta manera s'eviten resultats enganyosos i conclusions errònies. L'experiència personal em va demostrar que cal una bona preparació científica i tècnica a l'hora de fer una diagnosi encertada. Una persona que no estigui acostumada a treballar en un laboratori clínic pot cometre errors fàcilment. En el meu cas, vaig haver de repetir la

prova de la PCR, ja que els primers resultats obtinguts no es corresponien amb els esperats. L'origen de l'error radicava en una font de contaminació en els reactius que vaig utilitzar, ja que, en un moment determinat, vaig oblidar canviar la pipeta amb la qual havia manipulat un component químic, i vaig utilitzar el mateix instrument per manipular un altre producte. Sortosament, gràcies a la paciència i col·laboració del personal del laboratori, vaig poder realitzar el procés de diagnosi correctament en el segon intent.

Tot i que he gaudit molt amb la realització d'aquesta investigació, cal dir també que he trobat dificultats al llarg del camí. En un treball d'aquestes dimensions i centrat en l'àmbit de la Medicina i la Biologia, no resulta fàcil familiaritzar-se amb tots els conceptes mèdics, genètics i bioquímics que van apareixent al llarg de l'estudi, per la qual cosa vaig haver de llegir molts articles sobre la leucèmia mieloide crònica, a fi de comprendre tots els aspectes relacionats amb aquesta malaltia. Val a dir també que va resultar complicat trobar persones que pateixin o hagin patit aquesta malaltia per poder realitzar les entrevistes, ja que els professionals mèdics tenen l'obligació de garantir la confidencialitat de les dades del pacient. Malgrat tots els entrebancs, estic molt satisfeta d'haver tingut l'oportunitat de portar a terme aquesta recerca experimental.

Amb la realització d'aquest treball he assolit tots els objectius plantejats inicialment, ja que m'ha permès adquirir molts coneixements sobre l'origen, la diagnosi i el tractament de la leucèmia mieloide crònica. Gràcies a l'experiència pràctica portada a terme a l'Hospital Clínic de Barcelona, he desenvolupat noves habilitats, i amb les entrevistes realitzades he pogut conèixer la visió que tenen de la malaltia els metges i pacients.

Finalment, m'agradaria comentar la importància que ha tingut aquest treball de recerca a nivell personal. Tot plegat ha estat una gran experiència, que m'ha permès

compartir moments especials i inoblidables amb persones meravelloses. M'ha sorprès la fortalesa de les persones que han patit una LMC i han superat la malaltia amb un trasplantament, així com la serenitat i l'esperança amb què afronten la malaltia els pacients que han de seguir, de per vida, el tractament farmacològic actual. Són persones valentes i admirables, amb capacitat de lluita i, sobretot, amb moltes ganes de viure.

El treball m'ha permès endinsant-me una mica en el món de la Medicina i la recerca científica, i m'ha fet veure que cal potenciar els programes d'investigació, a fi d'aconseguir nous avenços que millorin la vida dels malalts.

He après també que la vida de les persones pot canviar en qualsevol moment, per això cal viure el dia a dia, valorant el que és realment important, fent coses de profit i lluitant per intentar que l'endemà sigui una mica millor.

8. GLOSSARI

Alvèols pulmonars: són estructures de forma esfèrica envoltades per capil·lars i agrupades en sacs alveolars. Als alvèols, l'oxigen provinent de l'aire pulmonar és cedit a la sang i el diòxid de carboni és lliurat igualment als alvèols perquè pugui ser expulsat a l'exterior durant l'expiració.

Anèmia: malaltia de la sang on hi ha una disminució de la concentració d'hemoglobina. Hi ha un descens de la concentració d'hematies.

Anhídrid Carbònic: diòxid de carboni.

Antígen: substància estranya pel cos, que desencadena la producció d'anticossos i la resposta immunitària.

Apoptosi: forma de mort cel·lular regulada genèticament.

Diapedesis: és el procés en què els elements formes de la sang passen als capil·lars per dirigir-se al focus de la infecció sense produir cap lesió estructural.

Embriogènesi: procés que condueix a la formació d'un organisme pluricel·lular a partir del zigot.

Escoliosi: desviació o curvatura anormal de la columna vertebral, la qual es pot donar en sentit lateral o longitudinal, gairebé sempre també implica una rotació vertebral.

Estèrnum: és un os del tòrax, pla, imparell, central i simètric, compost per diverses peces soldades. Es troba en la part mitja i anterior del tòrax, s'articula per dalt amb les clavícules i en les seves vores laterals s'articulen les costelles.

Estroma: és un teixit connectiu reticular dels òrgans.

Eubacteris: també denominats bacteris, són un grup de microorganismes cel·lulars.

Fagocitosi: procés on algunes cèl·lules (neutròfils i macròfags) envolten un antígen amb la seva membrana citoplasmàtica i l'introdueixen a l'interior de la cèl·lula. Això es produeix gràcies a la emissió de pseudòpodes al voltant de la partícula o

microorganisme fins envoltar-la completament i formar al voltant d'ell una vesícula, anomenada fagosoma, la qual fusionen posteriorment amb el lisosoma per degradar l'antigen fagocitat.

Gen híbrid: gen format per la recombinació in vitro de dos o més fragments d'ADN.

Genoma: és tot el material genètic contingut en els cromosomes d'un organisme en particular. El genoma de l'ésser humà conté 3000 milions de nucleòtids. El genoma es refereix només a l'ADN nuclear.

Glicoproteïna: biomolècula formada per una proteïna i un carbohidrat.

Glúcid: biomolècula orgànica formada per carboni, hidrogen i oxigen.

Haplotip: constitució al·lèlica dels locus per a un mateix cromosoma.

H.b.: hemoglobina.

Hemostàsia: capacitat de l'organisme per retenir la sang als vasos sanguínies evitant hemorràgies.

Hipertermòfil: és un organisme que prospera en ambients extremadament calents de 60°C cap amunt.

Hipospàdia: anomalia congènita en què el penis no es desenvolupa de manera normal. El resultat d'aquesta anomalia és que l'obertura del penis (meat urinari) es localitza en algun lloc en la part inferior del tronc d'aquest òrgan.

Hormona: és principalment una proteïna que en els éssers vius pluricel·lulars regula i coordina l'activitat conjunta de les cèl·lules. Són missatgers bioquímics produïts per glàndules endocrines o de secreció interna ja que vessen les hormones al medi intern (sang o saba). Únicament actuen sobre un òrgan determinat anomenat òrgan blanc o òrgan diana les cèl·lules del qual són les úniques que tenen a la membrana plasmàtica receptors hormonals específics per a aquelles hormones que poden influir en l'activitat de l'òrgan.

LMC: Leucèmia Mieloide Crònica.

Meninges: són un teixit conjuntiu molt especialitzat que recobreix l'encèfal i el tub neural, que tenen una funció de protecció, com impedir lesions i infeccions cerebrals.

Metabolisme: conjunt de reaccions químiques que tenen lloc dins un organisme per mantenir-lo en vida. Aquests processos permeten als organismes créixer i reproduir-se, mantenir les seves estructures, i respondre al seu medi. El metabolisme se sol subdividir en dues categories. El catabolisme descompon matèria orgànica, com per exemple per extreure energia en la respiració cel·lular. L'anabolisme, d'altra banda, utilitza energia per construir components de les cèl·lules com ara proteïnes i àcids nucleics.

Metafase: és l'etapa de la divisió cel·lular en què els cromosomes s'alineen en l'equador de les cèl·lules, és a dir, al centre de la cèl·lula. En aquesta etapa, els cromosomes s'anomenen metafàsics i estan altament condensats.

Neoplàsia: procés de proliferació anormal de cèl·lules en un òrgan o teixit que desemboca a la formació d'un tumor benigne o maligne.

Proteïnes globulars: són un dels tres tipus principals de la classificació de les proteïnes (globulars, fibroses i mixtes), i es diferencien fonamentalment de les fibroses per ser més o menys solubles en dissolucions aquoses (on formen suspensions col·loïdals), sent les fibroses pràcticament insolubles.

Sistema HLA: el sistema HLA (Antígens Leucocitaris Humans) correspon a les molècules que es troben en els leucòcits de la sang i en la superfície de gairebé totes les cèl·lules dels teixits d'un individu. La seva funció és reconèixer el què és propi per a l'organisme i el què és estrany, per tant asseguren la resposta immunitària, la qual defensa l'organisme dels antígens que generen les infeccions. És important que aquest sistema en el transplantament ja que permet una millor compressió en el rebuig donant contra receptor i permet una millor compatibilitat.

Solució hipotònica: és aquella que té menor concentració de solut que el medi intern de la cèl·lula en què es troba.

Substàncies mitògenes: substàncies que indueixen a la proliferació de limfòcits o altres cèl·lules.

Teixit adipós: és una classe de teixit connectiu propi dels animals vertebrats. En ell s'emmagatzema l'excedent energètic per al seu ús posterior, en situacions amb requeriments més elevats o durant etapes de dejuni. També actua d'aïllant tèrmic i de suport mecànic d'òrgans interns els quals embolcalla, i com a òrgan endocrí. És a dir, secretor de diversos factors, entre els quals hi ha hormones.

Termociclador: instrument usat en la biologia molecular que permet realitzar de forma automàtica i programada els cicles de temperatures necessaris per a una reacció en cadena de la polimerasa d'amplificació de DNA o per a reaccions de seqüència amb el mètode de Sanger.

Trombocitopènia: disminució de la quantitat de plaquetes circulants pel torrent sanguini.

Vasos sanguinis: són part del sistema circulatori i transporten la sang pel cos. Els vasos més importants són els capil·lars, que permeten l'intercanvi d'aigua i substàncies entre la sang i els teixits, mentre que les venes i artèries duen la sang del cor fins als capil·lars, i de tornada al cor, respectivament.

Vitamina: compost orgànic que l'organisme necessita com a nutrient en petites quantitats.

9. AGRAÏMENTS

Aquest treball no hagués estat possible sense l'ajut de moltes persones que desinteressadament m'han ajudat al llarg de tot el procés de recerca.

Primerament, vull expressar el meu agraïment a la doctora Dolors Colomer per haver-me orientat al llarg de tot el treball i ensenyar-me tant, en tan poc temps, sobre la leucèmia i mieloide crònica i els mètodes de diagnòstic clínic.

Faig arribar el meu agraïment a la meva tutora, M. Isabel Fernández, per ajudar-me a organitzar i encaminar el treball. Sense els seus suggeriments, comentaris i observacions tampoc hagués estat possible aquesta recerca.

També dono les gràcies a Pilar Carrera, per introduir-me en el camp de la investigació de la leucèmia. Moltes gràcies Pilar.

Gràcies, també, a les Sandres, al Josep Maria, a l'Anna Carrió, al Doctor Francisco Cervantes, i a tot l'equip de l'Hospital Clínic de Barcelona, per la seva col·laboració i dedicar hores de feina al meu treball.

Tota la meva gratitud a la Paola, l'Araceli i la Montse Comellas, per voler compartir amb mi les seves experiències personals.

M'agradaria regraciar a la meva família el seu suport, la seva paciència, i l'encoratjament que m'han donat en tot moment. Sempre m'han fet costat, i en moments de dificultat m'han empès a seguir a endavant sense perdre la il·lusió. Gràcies de tot cor.

Finalment, la meva gratitud també per a totes aquelles persones que no he esmentat, però que, d'una manera o altra, m'han ajudat generosament a dur a bon port el present treball.

10. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

LLIBRES

- Antonio Jiménez Velasco, M. T. (2011). *Estudio molecular del reordenamiento BCR-ABL1: Manual de procedimientos*. Badalona: Novartis Farmacéutica i Ediciones Médicas.
- Gary A. Thibodeau, K. T. (1995). *Anatomía y Fisiología*. Madrid: Mosby/Doyma Libros.
- P. Farreras Valentí, C. R. (1997). *Medicina Interna (Volum II)*. Madrid: Harcourt Brace.
- S.C. Smeltzer, B. B. (1998). *Enfermería medicoquirúrgica (Volum I)*. Delegación Cuauhtémoc, Mèxic: McGraw-Hill Interamericana.
- S.C. Smeltzer, B. B. (1998). *Enfermería medicoquirúrgica (Volum II)*. Delegación Cuauhtémoc, Mèxic: McGraw-Hill Interamericana.

ADRECES ELECTRÒNIQUES

- *AMERICAN CANCER SOCIETY*. (s.f.). 6 de JUNY de 2011, de <http://www.cancer.org/Espanol/cancer/Leucemiamieloidemielogenacronica/Guiadetallada/leucemia-mieloide-mielogena-cronica-what-is-what-is-c-m-l>
- *FERATO*. (s.f.). 20 d' AGOST de 2011, de <http://www.ferato.com/wiki/index.php/Sangre>
- *FUNDACIÓ JOSEP CARRERAS CONTRA LA LEUCÈMIA*. (s.f.). 6 de JUNY de 2011, de http://www.fcarreras.org/es/leucemia-mieloide-cr%C3%B3nica-lmc-_24141

- *MEDLINE PLUS*. (s.f.). Recuperado el 11 de JUNY de 2011, de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000570.htm>
- *TEMAS DE ONCOLOGÍA*. (s.f.). 14 d' AGOST de 2011, de <http://www.temasdeoncologia.com/serie3/cap18/default.htm>
- *WIKIPEDIA*. (s.f.). Recuperado el 15 de AGOST de 2011, de http://es.wikipedia.org/wiki/Leucemia_mieloide_cr%C3%B3nica

ALTRES RECURSOS

A continuació es detallen diverses revistes científiques i articles mèdics consultats, així com alguns apunts, publicacions i memòries de conferències de la doctora Dolors Colomer que han estat utilitzats com a font d'informació.

- Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. **Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia**. *Blood*. 1984;63:789-99.
- Hasford J, Pffirrmann M, Hehlmann R, et al. **A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa**. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:850-8.
- Simonsson B. **Beneficial effects of cytogenetic and molecular response on long-term outcome in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib (IM)**. The IRIS Study [abstract]. *Blood*. 2005;106:11.
- Huntly BJ, Reid AG, Bench AJ, et al. **Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful**

and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. Blood. 2001;98:1732-8.

- Huntly BJ, Guilhot F, Reid AG, et al. **Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of patients with CML with derivative chromosome 9 deletions.** Blood.2003;102:2205-12.
- Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Talpaz M, et al. **Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia.** Blood. 2005; 105:2281-6.

IL·LUSTRACIONS I FOTOGRAFIES

Figura 1. Font: Proyecto Biosfera.

(http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/3ESO/aparato_circulatorio/Dibujos/Circul5-1-1.jpg)

Figura 2. Font: Modificat a partir de

(http://sydney.edu.au/science/biology/learning/blood_composition/)

Figura 3. Font:

(<http://vocabularisanitari.wikispaces.com/file/view/GI%C3%B2bul%20vermells.jpg/34519959/GI%C3%B2>)

Figura 4. Font: EcoGenesis

(<http://www.ecogenesis.com.ar/index.php?sec=articulo.php&Codigo=108>)

Figura 5. Font: Vida y Salud (<http://www.vidaysalud.com/daily/cancer/aprendiendo-un-poco-sobre-la-leucemia-un-cancer-de-la-sangre/>)

Figura 6. Font: OncoLink

(<http://es.oncolink.org/coping/article.cfm?c=7&s=22&ss=167&id=968>)

Figura 7. Font: Atlas de Hematologia Online

(http://www.forobioguimico.com.ar/a_h_leucos.html)

Figura 8. Font: f SéNeCa Microciencia

(<http://www.f-seneca.org/microciencia/demuestran-el-papel-clave-de-las-celulas-inmunitarias-en-el-lupus-nefritico/>)

Figura 9. Font: Clínica Dam.

(<http://www.clinicadam.es/temas-de-salud/imagenes/9355.html>)

Figura 10. Font:

(http://www.xtec.cat/~mbarrio/talassemia/interficies_tala/coneixements_previs_san_g.htm)

Figura 11. Font: Curs d'introducció a la immunologia

(<http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca022.htm>)

Figura 12. Font:

(http://www.xtec.cat/~mbarrio/talassemia/interficies_tala/coneixements_previs_san_g.htm)

Figura 13. Font: Farmacias Hausmann

(<http://farmaciashausmann.blogspot.com/2011/01/plaquetopenia.html>)

Figura 14. Font: *Histología*. Ross. Kate. Pawlina. Editorial Mèdica Panamericana, 2005.

Figura 15. Font: *Anatomia Fisiològica*. Thibodeau, Patton. Elsevier Mosby, 2007.

Figura 16. Font:

(<http://www.biologycorner.com/anatomy/blood/images/bloodtypes.jpg>)

Figura 17. Font:

(<http://www.lallar.org/Noticias%202010/El%20sistema%20inmunitari.htm>)

Figura 18. Font:

(http://es.123rf.com/photo_9108605_leucemia-frente-normal-de-la-sangre-eps8.html)

Figura 19. Adaptat de :

(<http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR553603-571.jpg>)

Figura 20. Font:

(<http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Mutacion/mutacion.htm>)

Figura 21. Font:

(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hypolobated_small_megakaryocyte.jpg)

Figura 22. Font:

(http://img.webmd.com/dtmcms/live/webmd/consumer_assets/site_images/articles/health_tools/cml_treatment)

Figura 23. Font:

(<http://biologia-lacienciadelavida.blogspot.com/2010/08/ciclo-celular-de-una-celula-eucariota-4.html>)

Figura 24. Font:

(<http://www.ucl.ac.uk/~ucbhjow/b200/images/female.jpg>)

Figura 25. Font: *Importance of molecular monitoring in CML treatment* de Dolors Colomer, de la Unitat d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona

Figura 26. Font:

(<http://biomodel.uah.es/citogene/horwitz/ph1chrom.jpg>)

Figura 27. Adaptada de: *Importance of molecular monitoring in CML treatment* de Dolors Colomer, de la Unitat d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Figura 28. Font: elaboració pròpia.

Figura 29. Font:

(http://www.medscape.com/viewarticle/580426_2)

Figura 30. Font : (<http://www.ferato.com/wiki/index.php/Esplenomegalia>)

Figura 31 . Font:

(<http://belleza-estetica.com/wp-content/uploads/2010/12/contusion.jpg>)

Figura 32. Font: Revista médica de Chile.

(http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872002000400015)

Figura 33. Font:

(http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-02892007000100008&script=sci_arttext)

Figura 34. Font: Temas de Oncología Capítulo 18

(<http://www.temasdeoncologia.com/serie3/cap18/default.htm>)

Figura 35. Font:

(http://www.butler.org/healthGate/images/bone_biopsy_pevis.jpg)

Figura 36. Font: *Biología 1.* Guntiñas. E i altres.

Figura 37. Font: Tema 9. Genètica molecular.

(<http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema19.pdf>)

Figura 38. Font: *Biologia 1*. Guntiñas. E i altres.

Figura 39. Adaptada de:

(http://www.absoluteastronomy.com/topics/Protein_biosynthesis)

Figura 40. Font : *Biologia Conceptes Bàsics*. Costa, M. i altres.

Figura 41. Adaptada de: “*Control Molecular de la LMC*” de Dolors Colomer.

Figura 42. Font: *Técnicas basadas en PCR y su utilidad (I): PCR, nested-PCR* de Dolors Colomer.

Figura 43. Font: *Técnicas basadas en PCR y su utilidad (I): PCR, nested-PCR* de Dolors Colomer

Figura 44. Font: *Técnicas basadas en PCR y su utilidad (I): PCR, nested-PCR* de Dolors Colomer

Figura 45. Adaptada de :

(<http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/images/mol43.gif>)

Figura 46. Font:

(http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa)

Figura 47. Adaptada de : (<http://tle.westone.wa.gov.au>)

Figura 48. Adaptada de : “*Control Molecular de la LMC*” de Dolors Colomer.

Figura 49. Font adaptada de:

(<http://cueflash.com/cardimages/questions/thumbnails/6/1/5316308.jpg>)

Figura 50. Font: (<http://www.scielo.cl/fbpe/img/rmc/v127n9/img26.gif>)

Figura 51. Font: Fotografia obtinguda a l’Hospital Clínic de Barcelona, en la unitat de Citogenètica Convencional.

Figura 52. Font :

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/88/Glivec_400mg.jpg)

Figura 53. Font: Wikipedia

(<http://es.wikipedia.org/wiki/Imatinib>)

Figura 54. Font: (<http://membres.multimania.fr/iverdeny/proteines/enzims.htm>)

Figura 55. Adaptada de:

(<http://www.cancerquest.org/index.cfm?lang=spanish&page=405>)

Figura 56. Font: (<http://www.hai-bin.net/CMLinfomation.htm#CML7>)

Figura 57. Font: Cecoten

(<http://www.cecoten.com/cecoten/index.php?id=46>)

Figura 58. Font:

(http://www.divulgauned.es/local/cache-vignettes/L300xH197/300px-Bone_marrow_biopsy-b5a10.jpg)

Figura 59. Font: Medline Plus

Figura 60. Font: Medline Plus

Figura 61. Font: elaboració pròpia i Medline Plus.

Figura 62. Font: Reed Colleague

(http://academic.reed.edu/biology/professors/srenn/pages/research/2010_students/kavita/KK_thesis.html)

Figura 63. Font:

(<http://genmolecular.wordpress.com/tecnicas-de-biologia-molecular/>)

Figura 64. Font: elaboració pròpia

Figura 65. Font: elaboració pròpia.

Figura 66. Font:

(<http://www.anthouse.es/tubos-de-ensayo/57-eppendorf.html>)

Figura 67. Font: elaboració pròpia.

Figura 68. Font: elaboració pròpia.

Figura 69. Font: elaboració pròpia.

Figura 70. Font: elaboració pròpia.

Figura 71. Font: elaboració pròpia.

Figura 72. Font: elaboració pròpia.

Figura 73. Font: elaboració pròpia.

Figura 74. Font: elaboració pròpia.

Figura 75. Font: elaboració pròpia.

Figura 76. Font: elaboració pròpia.

Figura 77. Font: elaboració pròpia.

Figura 78. Font: elaboració pròpia.

Figura 79. Font: elaboració pròpia.

Figura 80. Font: elaboració pròpia.

TAULES

Taula 1. Font: Fundació Josep Carreras
(http://www.fcarreras.org/ca/tipus-de-leuc%C3%A8mia_1785)

Taula 2. Font: adaptada de *Clase de leucemias* del Dr. Hector Longoni. Facultat de medicina. Universidad de Buenos Aires.

Taula 3. Font: elaboració pròpia a partir de les dades de l'analítica del pacient.

Taula 4. Font: elaboració pròpia a partir de les dades del full de registre de l'Hospital Clínic de Barcelona, adjuntat a Annexos.

Taula 5. Font: elaboració pròpia seguint el model del full de registre de l'Hospital Clínic de Barcelona.



ANNEX I

ANALÍTICA DE SANG

DEL PACIENT

ESTUDIAT

Bertrams Vilaró, Berta
Tutora: Fernández, Isabel
IES Castell del Quer
2n BATXILLERAT
Curs 2011-2012

N. Sol·licitud Lab.: 112973691

N. Sol·licitud SAP: 6505853

Data sol·licitud: 25/03/2011, 14:20

Data recepció mostra: 30/03/2011, 09:03

Data últim resultat: 08/04/2011, 17:06

Estat: Definitiu

Sol·licitant: TOVAR GOMIS, NATALIA

N. Episodi: 1003045415

U.O.Sol·licitant: HEM - HEMATOLOGIA

U.O.Enf./Tract. sol.: HEMCE - CEX HEMATOL.

Observacions:

Prestació	Resultat	Unitat	Interv.de ref.
BIOQUÍMICA GENERAL			
Proteïna C reactiva (PCR)	0.59	mg/dL	(< 1.00)
Glucosa	114/A	mg/dL	(65 - 110)
Creatinina	2.54/A	mg/dL	(0.30 - 1.30)
Filtrat glomerular calculat [MDRD]	27.66	ml/min	
Acid úric	8.0/A	mg/dL	(1.9 - 7.4)
Colesterol total	165	mg/dL	(148 - 247)
Triglicèrids	134	mg/dL	(50 - 150)
Aspartat aminotransferasa (ASAT)	29	U/L	(5 - 40)
Alanin aminotransferasa (ALAT)	18	U/L	(5 - 40)
Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)	38	UI/L	(5 - 40)
Bilirrubina total	0.5	mg/dL	(0.2 - 1.2)
Bilirrubina directa	0.2	mg/dL	(< 0.6)
Bilirrubina indirecta	0.3	mg/dL	(< 0.6)
Fosfatasa alcalina	145	U/L	(80 - 240)
Lactat deshidrogenasa (LDH)	1052/A	U/L	(250 - 450)
Proteïnes totals	81/A	g/L	(63 - 80)
Sodi	141	mEq/L	(135 - 145)
Potasi	4.9	mEq/L	(3.5 - 5.5)
Ferro	26/B	µg/dL	(65 - 175)
PROTEÏNES			
Ferritina	29	ng/mL	(20 - 400)
Receptor soluble de la transferrina, sèru	2.31/A	mg/L	(0.83 - 1.76)
Suggestiu de dèficit funcional de ferro. Recomanem valorar idoneïtat d'un suplement.			
AMINOÀCIDS, VITAMINES I NUCLEÒTIDS			
Acid fòlic sèric	4.5	ng/mL	(3.0 - 17.0)
Vitamina B12	1676/A	pg/mL	(250 - 1050)
HEMATIMETRIA			
Recòmpte de leucòcits	37.56/A	10 ⁹ /L	(4.00 - 11.00)
Recòmpte d'hematies	4.55	10 ¹² /L	(3.90 - 5.50)
Concentració d'hemoglobina	113/B	g/L	(120 - 170)
Hematòcrit	0.370	L/L	(0.360 - 0.510)
VCM (Vol. corpusc. mitjana eritròcits)	81.6	fl	(80.0 - 100.0)
HCM (Hb corpusc. mitjana)	24.9/B	pg	(26.7 - 33.3)
CCMH (Concentr. corpusc. mitja Hb)	305/B	g/L	(310 - 350)
RDW (Reed Distribut. Width)	16.3	%	(10.5 - 17.2)
HDW (Hb Distribut. Width)	28.1	g/L	(22.7 - 28.1)
Hematies hipocromes [%]	14.6/A	%	(0.1 - 2.8)
Recòmpte plaquetes	814/A	10 ⁹ /L	(130 - 400)
VPM (Volum Plaquetari Mitjà)	10.0	fl	(6.2 - 11.0)
Neutròfils segm. % (man.)	59	%	(45 - 75)
Neutròfils no segm. % (man.)	13/A	%	(0 - 6)
Eosinòfils % (man.)	2	%	(0 - 5)
Basòfils % (man.)	3/A	%	(0 - 2)
Linfòcits % (man.)	7/B	%	(17 - 55)
Monòcits % (man.)	4	%	(2 - 10)
Metamielòcits % (man.)	6/A	%	(0)
Mielòcits % (man.)	4/A	%	(0)

N. Sol·licitud Lab.: 112973691
 Data sol·licitud: 25/03/2011, 14:20
 Data recepció mostra: 30/03/2011, 09:03
 Data últim resultat: 08/04/2011, 17:06
 Sol·licitant: TOVAR GOMIS, NATALIA
 U.O.Sol·licitant: HEM - HEMATOLOGIA
 Observacions:

N. Sol·licitud SAP: 6505853
 Estat: Definitiu
 N. Episodi: 1003045415
 U.O.Enf./Tract. sol.: HEMCE - CEX HEMATOL.

Prestació	Resultat	Unitat	Interv.de ref.
HEMATIMETRIA			
Promielòcits % (man.)	2/A	%	(0)
Neutròfils manuals absoluts	27.04/A	10 ⁹ /L	(2.50 - 7.00)
Eosinòfils manuals absoluts	0.75/A	10 ⁹ /L	(0.00 - 0.50)
Basòfils manuals absoluts	1.13/A	10 ⁹ /L	(0.00 - 0.20)
Limfòcits manuals absoluts	2.63	10 ⁹ /L	(0.90 - 5.00)
Monòcits manuals absoluts	1.50/A	10 ⁹ /L	(0.10 - 1.00)
Neutròfils % (analit.)	85.7/A	%	(45.0 - 75.0)
Limfòcits % (analit.)	5.3/B	%	(17.0 - 55.0)
Monòcits % (analit.)	2.3	%	(2.0 - 10.0)
Eosinòfils % (analit.)	1.0	%	(0.0 - 5.0)
Basòfils % (analit.)	4.0/A	%	(0.0 - 2.0)
LUC % (analit.)	1.7	%	(0.0 - 4.0)
Neutròfils abs. (analit.)	32.2/A	10 ⁹ /L	(2.5 - 7.0)
Limfòcits abs. (analit.)	2.0	10 ⁹ /L	(0.9 - 4.5)
Monòcits abs. (analit.)	0.9	10 ⁹ /L	(0.1 - 1.0)
Eosinòfils abs. (analit.)	0.4	10 ⁹ /L	(0.0 - 0.5)
Basòfils abs. (analit.)	1.5/A	10 ⁹ /L	(0.0 - 0.2)
LUC abs. (analit.)	0.6	10 ⁹ /L	(< 4.0)
Reticulòcits % (man.)	2.3/A	%	(0.5 - 2.0)
Reticulòcits abs. (man.)	103.7/A	10 ⁹ /L	(25.0 - 90.0)
Reticulòcits baixa fluor. %	69.3/B	%	(83.0 - 94.0)
Reticulòcits mitjana fluor. %	16.0	%	(4.0 - 18.0)
Reticulòcits alta fluor. %	14.8/A	%	(0.2 - 7.0)
Concentració Hemoglobina Reticulocitària	28.2/B	pg	(28.9 - 33.9)
VSG (Vel. sedimentació globular)	9	mm/h	(1 - 20)
HEMOSTÀSIA GENERAL			
Temps de protrombina (%)	81.0	%	(80.0 - 100.0)
Temps de protrombina (seg)	14.2/A	seg	(11.8 - 13.9)
Temps de protrombina, rati	1.11		(0.85 - 1.15)
Temps de tromboplastina parcial	31.0	seg	(25.0 - 33.0)
Fibrinogen	3.7	g/L	(1.5 - 4.5)
INR	1.15		
VIROLOGIA			
Antigen superfície v.hepatitis B	Negatiu		
IgG v.hepatitis C	Negatiu		
Ac v.immunodeficiencia humana 1/2	Negatiu		200.00 - 1100.00
HORMONES VASOACTIVES I RENALS			
Eritropoetina, sang total	8.5	U/L	(4.0 - 20.0)



ANNEX II

FULL DE REGISTRE DE LA PCR

Bertrams Vilaró, Berta
Tutora: Fernández, Isabel
IES Castell del Quer
2n BATXILLERAT
Curs 2011-2012

ANÀLISI REORDENAMENT BCR-ABL p210 BIOMED

IMP-?? rev.: 01

Pàgina 1 de 1

Programa: BCRBIOMED 10' 95 °C 40 cicles : 30'' 94 °C 60'' 65 °C 60'' 72 °C 10' 72 °C	Oligos: BCR-b2-C 5'- CAgATgCTgACCAACTCgTgT-3' ABL-a3-D 5'- ggg acc ggc tta atc cat ag -3'
--	--

	x1	x6
Buffer Taq Gold x 10	2.5	15
MgCl ₂ 25 mM	2	12
dNTP 10mM	0.5	3
BCR-b2-C 10 mM	1	6
ABL-a3-D 10 mM	1	6
H ₂ O	16	96
Taq Gold	0.2	1.2
Total	23	

23 µL mix + 2 µL cDNA

Nº	Nº MOSTRA	NOM	RESULTAT
1	2034/11	Mostra del pacient	(-)
2	H ₂ O	Control negatiu	(-)
3	6315/11	Control positiu	(+)

Gel agarosa 2%: mida banda p210 b3a2: 360 pb; p210 b2a2: 285 pb; p210 b3a3: 186 pb; p210 b2a3: 111 pb

Bibliografia: Van Dongen et al, Leukemia 1999;13:1901-28.

