L'EFECTE DE L'ARANJA SOBRE LES CÈL·LULES MAMÀRIES CANCERÍGENES

Assignatura: *Biologia*

Nom de la tutora:
Teresa Barnadas

Número de paraules:
4300

RESUM

Aquest experiment avalua l'efecte citotòxic de la flavanona naringenina en diferents tipus de cèl·lules de càncer de mama triple negatius. (CMTN) La pregunta d'aquesta recerca és: **L'aranja té un efecte inhibitori en cèl·lules tumorals del CMTN?**

El CMTN representa el 20% dels càncers de mama diagnosticats i es caracteritza per la manca d'expressió d'hormones receptores (estrogen i progesterona) i el factor epidèrmic humà (HER2). Aquests pacients tenen un pronòstic pobre, ja que actualment no hi ha gaires teràpies que ho enfoquin. En un percentatge molt elevat de casos, la reaparició tumoral i la progressió de la malaltia sorgeix abans dels cinc anys. No obstant això, és extremament important i necessari cercar nous tractaments assequibles. Les aranges tenen fama d'aportar molts beneficis saludables. Molts flavonoides impedeixen el creixement de tumors o tenen un efecte inductor en l'apoptosi cel·lular. Així, aquest assaig investiga si la naringenina, la forma aglicona del naringin, que es troba en les aranges, causa apoptosi cel·lular en CMTN.

Aquest estudi segueix el protocol de l'assaig MTT, per tal de determinar el nombre de cèl·lules mitjançant lectors d'absorbància de microplaques. (vegeu Annex B)

Les cèl·lules (MDA-MB-468, MDA-MB-231 i MDA-MB-231DXR) van ser tractades en triplicades ocasions amb diferents concentracions de naringenina i incubades durant 48h. L'Absorbància es podia llegir després de 2h d'incubació cel·lular amb la solució MTT. La CI_{30} i la CI_{50} de cada tipus de cèl·lula es determinava utilitzant els percentatges d'inhibició de la proliferació representats en una gràfica.

Es va concloure que la naringenina és una flavanona potencial amb un efecte citotòxic en cèl·lules CMTN. Els pous amb una major concentració de naringenina tenien cèl·lules menys viables que les tractades amb baixes concentracions o que les cèl·lules control. Els experiments *in vivo* serien el proper pas per descobrir si aquest compost natural té aquest efecte inhibitori en pacients amb càncer i per investigar si podria ser un complement útil per a la prevenció de càncer de mama.

Índex de continguts I
Índex de figures II
Índex de taules III

1. Introducció 1
2. Continguts generals 2
2.1. Naringenina 2
2.1.1. Síntesi de la naringenina 2
2.2. Càncer 2
2.2.1. El càncer de mama i la seva classificació 3
2.2.2. Anatomia de la mama 4
2.2.3. Càncer de Mama Triple-Negatiu (CMTN) 4
2.2.4. Estrògens i Progesterona 5
2.2.5. Receptor 2 del Factor de Creixement Epidèrmic Humà (HER_2) 5
3. Material i Mètodes 6
3.1. Substàncies i reactius 6
3.2. Instruments i aparells 6
3.3. Cultiu cel·lular 8
3.4. Efecte inhibitori de la naringenina en cèl·lules de CMTN 8
3.4.1. Preparació dels medis i les solucions 8
3.4.2. Pretractament de les cèl·lules 9
3.4.3. Tractament de les cèl·lules seguint el protocol de MTT 10
3.5. Determinació de l'absorbància a partir de l'espectrofotometria 12
3.5.1. Determinació de la CI_{30} i la CI_{50} 12
4. Resultats i discussió 13
5. Conclusió 21
6. Bibliografia 22

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Flor *Citrus paradisi* 1

Figura 2. Estructura de la naringenina 2

Figura 3. Síntesi de la naringenina 2

Figura 4. Factors que influencien una massa de cèl·lules 3

Figura 5. Anatomia de la mama 4

Figura 6. Compost de naringenina 6

Figura 7. Solució de MTT 6

Figura 8. Pipetes d'únic canal 7

Figura 9. Cèl·lules sense tractament 8

Figura 10. Preparació de la pipeta per l'aspiració del medi 9

Figura 11. Procés d'aspiració del medi de cada pou 11

Figura 12. Microplaca amb cèl·lules MDA-MB-468 després de 2H d'incubació amb MTT 11

Figura 13. Microplaca amb cèl·lules MDA-MB-231 després de 2H d'incubació amb MTT 11

Figura 14. Cèl·lules MDA-MB-468 després de 48H d'incubació 16

Figura 15. Cèl·lules MDA-MB-231 després de 48H d'incubació 18

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Classificació del càncer de mama des d'un punt de vista terapèutic 3

Taula 2. Absorbàncies del pous amb tractament i els pous control..... 13

Taula 3. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la primera rèplica 13

Taula 4. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la segona rèplica 14

Taula 5. CI_{30} i CI_{50} de la primera i la segona rèplica 14

Taula 6. Absorbàncies del pous amb tractament i els pous control..... 14

Taula 7. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la primera rèplica 15

Taula 8. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la segona rèplica 15

Taula 9. CI_{30} i CI_{50} de la primera i la segona rèplica..... 15

Taula 10. Absorbàncies del pous amb tractament i els pous control..... 16

Taula 11. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la primera rèplica 16

Taula 12. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la segona rèplica 17

Taula 13. CI_{30} i CI_{50} de la primera i la segona rèplica 17

Taula 14. Absorbàncies del pous amb tractament i els pous control..... 17

Taula 15. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la primera rèplica 17

Taula 16. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la segona rèplica 18

Taula 17. CI_{30} i CI_{50} de la primera i la segona rèplica 18

Taula 18. Absorbàncies del pous amb tractament i els pous control..... 19

Taula 19. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la primera rèplica 20

Taula 20. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i inhibició de la proliferació dels resultats de la segona rèplica 20

Taula 21. CI_{30} i CI_{50} de la primera i la segona rèplica 20

1. INTRODUCCIÓ

Un dels problemes més preocupants i seriosos de la població actual és conèixer la manera de curar o fins i tot evitar qualsevol tipus de càncer. L'ideal seria trobar un tractament natural sense medicaments ni cap altra substància nociva pel nostre cos. A molts aliments i plantes ja se'ls associa amb un efecte anticancerigen. Tanmateix, aquests efectes són tan aleatoris i escassos que la gent acaba desconfiant d'ells. L'objectiu que personalment em vaig proposar va ser el de demostrar científicament com un compost natural que es troba en les aranges pot afectar aquestes cèl·lules carcinògenes. Concretament, la hipòtesi de la recerca seria: *La naringenina, la forma aglicona de la naringina, té un efecte inhibidor en cèl·lules tumorals resistents i no resistents de càncers de mama triple negatius?* (CMTN)

Figura 1. Flor *Citrus paradisi* [1]

Vaig decidir fer una petita recerca sobre aquesta planta perquè des de sempre m'havien dit que tenia efectes beneficiosos. Posteriorment vaig sol·licitar una beca als laboratoris de la Universitat de Girona la qual oferia tutors especialitzats per orientar-te en l'elaboració del treball i me la van concedir. Inicialment tenia previst d'investigar la reacció nociva que podia tenir aquesta fruita a l'hora de prendre-la al mateix temps que certs medicament. Allà, però, em van proposar de buscar-ne un efecte positiu i avantatjós. Em van oferir de tractar *in vitro* cèl·lules de CMTN amb la naringenina, ja que d'aquesta podria extreure conclusions sobre la fruita. Mai abans havia sentit a parlar ni d'aquest compost ni del tipus de cèl·lules de càncer de mama que tractaríem. D'aquesta manera, vaig buscar informació sobre el tema en diaris, ressenyes, articles i llibres científics[2].

L'aranja (*Citrus paradisi*), de mida mitjana, és una fruita cítrica originària del Carib, com un híbrid entre el pomelo (*C. maxima*) i la taronja dolça (*C. sinesis*). És una font excel·lent de nutrients que contribueixen a una dieta saludable. Diferents estudis han demostrat que és un bon antioxidant i un regulador del colesterol i de la tumorogènesi . Altres han demostrat que la naringina, el principal flavonoide que es troba en aquesta fruita, és capaç d'inhibir la proliferació del càncer de mama. Tot i això, el que investigaré jo és si la naringenina, una flavanona glicosídica i la forma aglicona de la naringina, també té aquest efecte inhibidor en cèl·lules de CMTN.

El CMTN es caracteritza per la manca d'expressió dels receptors d'estrogen i progesterona i del receptor 2 del Factor de Creixement Epidèrmic Humà (HER_2). Conseqüentment, els pacients sí que responen a la quimioteràpia però normalment recauen en els següents 5 anys. No existeix cap teràpia diana que pugui curar-lo definitivament de manera que hi ha una alta probabilitat i tendència a la metàstasi.

---

[1] **Figura 1.** Flor *Citrus paradisi*. Font: http://www.herboristerie-moderne.fr/tisanes-infusions/plantes-simples/o/oranger-fleurs-tisane-en-vrac.html

[2] Els articles, revistes, llibres científics, pàgines web i tesis doctorals són citats al final del treball, a la Bibliografia. En el text, s'indiquen amb un número entre parèntesis. Les referències de les imatges són citades als peus de pàgina.

S'analitzarà, doncs, si la naringenina pot inhibir la proliferació de cèl·lules del CMTN i retardar la tumorogènesi mamària.

2. CONTINGUTS GENERALS

2.1 Naringenina

La naringenina, (5.7-dihidròxid-2-(4-hidroxifenil)cromona-4-un) és una flavanona glicosídica, un tipus específic de flavonoide que es troba principalment en les aranges (*Citrus paradisi*). La seva formula química és $C_{15}H_{12}O_5$ i el seu pes molecular és de 272.252 [g/mol]. En humans, la flavanona naringina es metabolitza en naringenina [1].

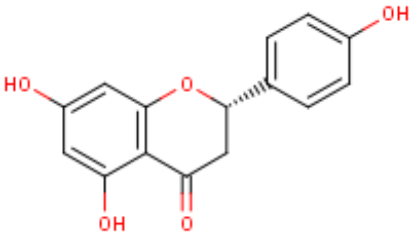


Figura 2. Estructura de la naringenina[3].

2.1.1. Síntesi de la naringenina

El naringin és un altre flavonoide que es troba a les aranges amb una concentració de 7,3-41,9 per 100 mG. La seva forma aglicona, la naringenina, és el resultat del metabolisme del naringin en humans.

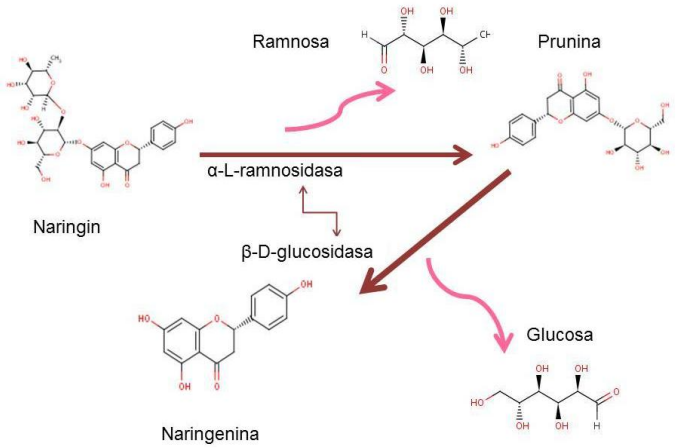


Figura 3. Síntesi de la naringenina.

2.2. Càncer

El càncer és un grup de malalties caracteritzades pel creixement descontrolat de les cèl·lules que porta a una invasió dels teixits circumdants (metàstasi) i fa que aquests s'escampin a altres parts del cos. Encara que n'existeixen múltiples causes, les característiques de cada estil de vida, com ara el sol, el tabac, o la nutrició són les principals influències.

[3] **Figura 2.** Estructura de la naringenina.
Font: http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:50201

Les cèl·lules sanes són subjectes als senyals inhibitoris interns i externs, els quals, fins a cert punt, es perden durant la carcinogènesi. A fi d'entendre com pot afectar l'ambient extracel·lular al funcionament de les cèl·lules, com una cèl·lula cancerígena pot influenciar aquest ambient i què determina el comportament general d'un grup de cèl·lules és molt important identificar aquests senyals normatius.

Per generar-lo, es requereixen diferents canvis cel·lulars i després de la formació del tumor, els canvis es continuen desenvolupant. Encara que totes les cèl·lules són susceptibles a un creixement descontrolat, les cèl·lules epitelials són les més propenses a canviar. Les mutacions en oncogens o gens supressors són una clara causa del desenvolupament del càncer. El fet que distingeix el càncer d'un tumor benigne és la possibilitat d'envair un altre teixit [2].

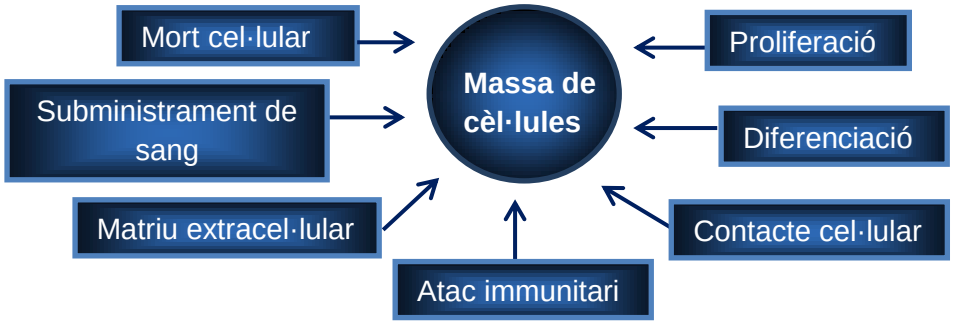


Figura 4. Factors que influeixen una massa de cèl·lules.

2.2.1. El càncer de mama i la seva classificació

El càncer de mama és un tumor maligne que neix al teixit de la glàndula mamària i té la funció d'envair els altres teixits i arribar fins als òrgans perifèrics en els quals es desenvoluparan.

Segons el *National Cancer Institute* (NCI, US National Institutes of Health) el carcinoma ductal és un dels tipus de càncer de mama més freqüent, el qual comença en els conductes de llet, tubs encarregats de transportar la llet dels lòbuls de la mama fins al mugró. Un altre tipus de càncer de mama és el carcinoma lobular, el qual comença en els lòbuls de la mama. La metàstasi ocorre quan el càncer s'expandeix des d'on s'ha originat fins a un teixit del voltant. Les dones són més propenses a ser diagnosticades d'aquest tipus de càncer que els homes, en els quals és molt poc freqüent [3].

Taula 1: CLASSIFICACIÓ DEL CÀNCER DE MAMA DES D'UN PUNT DE VISTA CLÍNIC I TERAPÈUTIC [5].		
Receptor hormones positiu	**HER_2-positiu**	**Càncer de mama triple negatiu**
Tractada amb teràpies dirigides als receptors d' hormona, a la supressió ovàrica o a la leuprolida amb o sense quimioteràpia	Tractada amb teràpies com ara trastuzumab amb o sense quimioteràpia	Resistent a la PGR i a teràpies HER_2 a causa de la pèrdua de receptors específics. La quimioteràpia sembla ser l'única modalitat de tractament disponible.

Exceptuant els càncers de pell, el càncer de mama és la malaltia més maligne en dones, constant gairebé 1 de cada 3 càncers diagnosticats en dones als Estats Units, i el segon càncer que provoca més morts en dones arreu del món [4].

2.2.2. Anatomia de la mama

Un conjunt de quinze a vint lòbuls mamaris conformen la mama o glàndula mamària, cadascun amb el seu propi sistema excretor, que s'obre al mugró a través d'un conducte galactòfor. Els lòbuls mamaris estan compostos de petites estructures anomenades lobulats, enllaçats per un teixit connectiu, pels vasos sanguinis i pels conductes lactífers.

Els lòbuls i els conductes mamaris estan immersos en el teixit adipós i en els teixits connectius que juntament amb el teixit limfàtic constitueixen la mama. Els conductes i els lòbuls estan recoberts per dos tipus de cèl·lules: les cèl·lules mioepitelials contràctils amb una xarxa de miofilaments a la membrana basal, que ajuden a l'excreció de la llet durant la lactància i proporcionar suport estructural als lobulets, i les cèl·lules epitelials luminals que se superposen a les cèl·lules mioepitelials [6].

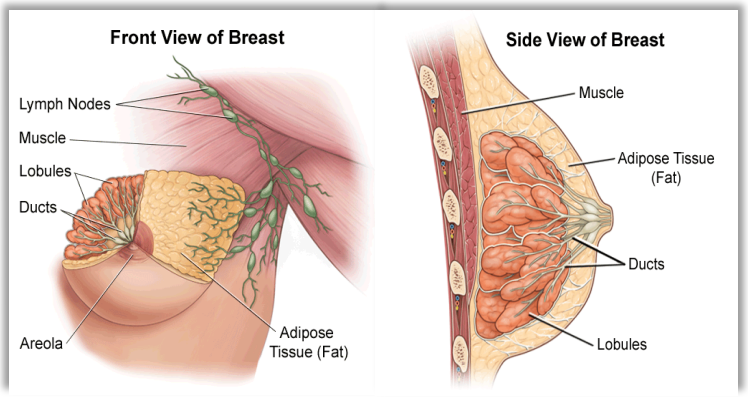


Figura 5. Anatomia de la mama[4].

2.2.3. Càncer de mama triple negatiu (CMTN)

El càncer de mama triple negatiu és una malaltia heterogènia que afecta tan a nivell patològic i clínic com a nivell molecular [7].

Les cèl·lules mamàries sanes tenen hormones específiques associades a uns receptors que determinen un bon creixement i funcionament de les cèl·lules. Dos de cada tres dones que pateixen càncer de mama són positives per a aquests receptors hormonals. El CMTN es defineix en particular per la falta del receptor d'estrogen (ER), receptors de progesterona (PR) i el receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà (HER_2) [8].

[4] **Figura 5.** Anatomia de la mama.Font: http://medicalcenter.osu.edu/patientcare/healthcare_services/breast_health/anatomy_of_the_breasts/Pages/index.aspx

En conseqüència, aquest tipus de càncer és improbable que respongui a les teràpies hormonals i als medicaments que es dirigeixen a HER_2. És tan agressiu que és molt probable que s'estengui més enllà de la mama i és més propens a reaparèixer després del tractament [9].

Entre els subtipus, els tumors triple negatiu s'identifiquen mitjançant procediments de tinció específics per als marcadors basals com la citoqueratina 5 i 6 [5] [10].

2.2.4. L'Estrogen i la Progesterona

El càncer de mama depèn de les hormones ovàriques, els estrògens i la progesterona. Els estrògens són responsables de l'elongació i ramificació dels conductes mamaris. La progesterona és important per al desenvolupament i la diferenciació dels lòbuls. Les dues hormones actuen en els teixits blancs a través de receptors específics i s'ha vist que han alterat l'expressió del càncer de mama [11].

2.2.5. Receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà (HER_2)

L'HER_2 és el receptor del factor de creixement epidèrmic humà 2, una proteïna de membrana que participa en el creixement de les cèl·lules. Aquest receptor es pot trobar en les cèl·lules sanes i en moltes cèl·lules tumorals. Alguns tipus de càncer de mama tenen més receptors del normal, el que implica un augment de l'agressivitat i el desenvolupament dels càncers de mama HER_2-positiu [12] [6].

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Substàncies i reactius

Blau de tripà 0,4%, Gibco®-BRL by Life Technologies Corporation, Rockville MD, EUA.

Dimetil Sulfoxid (DMSO), ReagentPlus ®, puresa ≥99.5% , D5879-100ML, Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), ref 41965-039, Gibco®-BRL de Life Technologies Corporation, Rockville MD, EUA.

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), ref 14190-094, Gibco®-BRL de Life Technologies Corporation, Rockville MD, EUA.

Fetal Bovine Serum (FBS), número de catàleg SV30160.03, HyClone de Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Formazan, ref. M2003, Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA.

Naringenina, puresa 98%, ref. W530098 Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA.

Tripsina-EDTA (10X) 0.5%, no Vermell de Fenol, número de catàleg 15400-054, Gibco®-BRL de Life Technologies Corporation, Rockville MD, EUA.

Figura 6. Compost de naringenina.

Figura 7. Solució MTT.

3.2. Instruments i aparells

Agulles 30g x 0,5" x 100, SKDU number ND304, Becton Dickinson Microlance, Heidelberg, Alemanya.

Bàscula analítica ED224S, capacitat 220g, llegibilitat 0.0001g, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Alemanya.

Cámara de Neubauer, 0,0025 mm^2, ref. 0640510, Marienfeld superior , Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Alemanya.

Campana extractora, NU-126-300, NuAire, Plymouth, EUA

Centrifugadora Universal 320R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Alemanya.

Eppendorf, ref. PCRP-015-500, Labbox Labware SL, Mataró, Espanya.

Espectrofotòmetre, Benchmark plus, ref. 4100172, Bio-Rad Laboratoris, Hercules. EUA

Flasc 75cm^2, ref. 430641, Corning Incorporated Life Sciences, Acton, MA, EUA.

HTS Transwell®-96 Reservoir Plate, ref. 3383, Costar®-Corning Incorporated Life Sciences, Acton, MA, EUA.

Incubadora, 37ºC, 5% CO_2, NuAire, Plymouth, EUA

Microscopi invertit, T5100, Nikon Eclipse, Nikon Inc, Melville, NY, EUA.

Pipeta multicanals, 20 to 200 µL 12-Pettes**,** ref 4880, Costar®-Corning Incorporated Life Sciences, Acton, MA, EUA

Pipeta serològica 10 mL, ref. 13-678-11E , Fisher Scientific by Thermo Scientific, Pittsburgh, EUA.Pasteur Pipette, ref. PIPN-150-250, Labbox Labware SL, Mataró, Espanya.

Pipetes d'un canal, 0,5-10 µL, 10-100 µL, and 100-1000 µL, Fisher Scientific, Thermo Scientific, Pittsburgh, EUA.

Pipetes estèrils 100 - 1000 µL, ref. TIPD-1K0-096, Labbox Labware SL, Mataró, Espanya.

Reagent reservoir 50ml, ref. CLS4870, Costar®-Corning Incorporated Life Sciences, Acton, MA, EUA.

Tubs cònics de centrifugació de Falcon™ 15 mL, ref. 14-959-49D, Fisher Scientific de Thermo Scientific, Pittsburgh, EUA.

Vortex - RX3, ref. F202A0171, Velp Scientifica, Scharlab SL, Sentmenat - Barcelona, Espanya.

3.3. Cultiu cel·lular

Les cèl·lules MDA-MB-231 i MDA-MB-468 es van obtenir de l' *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD). Les MDA-MB-231DXR, les quals són resistents a la doxorubicina a 70 nM, es van obtenir en el mateix laboratori després de tractar cèl·lules MDA-MB-231 amb dosis elevades de doxorubicina. Totes les línies cel·lulars varen ser cultivades amb *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementat amb un 10% de FBS i es van incubar en una atmosfera amb un 5% de CO_2 a 37ºC. Els experiments es van realitzar utilitzant cèl·lules en creixement exponencial. Després de 24 H de cultivar-les, les cèl·lules varen ser tractades amb un medi contenint diferents concentracions de naringenina.

A. **B.**

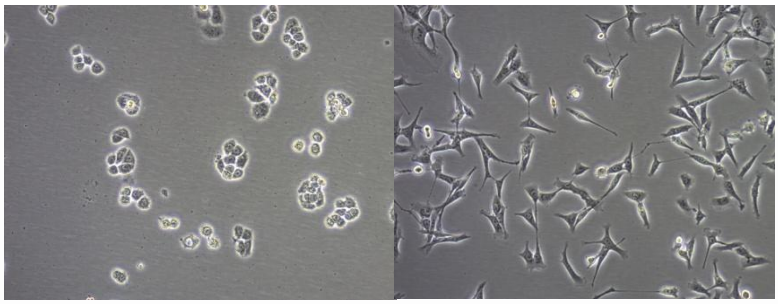


Figura 9. Cèl·lules sense tractament. (A) Cèl·lules MDA-MB-468 sense tractament. (B) Cèl·lules MDA-MB-231 sense tractament.

3.4. Efecte inhibitori de la naringenina en cèl·lules de CMTN

En un laboratori del Parc Tecnològic de la Universitat de Girona (UdG) es va dur a terme l' experiment en el qual es varen tractar *in vitro* cèl·lules de CMTN amb la naringenina durant 48 H.

Aquest estudi es va realitzar seguint el protocol de l'assaig MTT (vegeu l'annex B), que proporciona un mètode senzill per a la determinació del nombre de cèl·lules utilitzant lectors d'absorbància de microplaques estàndard.

3.4.1. Preparació dels medis i les solucions

a) **DMEM i FBS**
En una solució de 450 mL de DMEM, es va afegir un 10% de FBS (50 mL), un factor de creixement. Després, amb una pipeta serològica, es varen introduir 5% de penicil·lina i 5% de estreptomicina, dos antibiòtics, per tal d'inhibir el creixement d'altres microorganismes o d'eliminar-los.

b) **Solució MTT**
La solució de MTT es va dissoldre amb PBS a una concentració de 5 mG / mL. S'emmagatzemà, a continuació, a 4 º C, protegit de la llum.

3.4.2. Pre-tractament de les cèl·lules de CMTN

Es van afegir 9 ml d'DMEM en tres flascs que contenien cèl·lules MDA-MB-468, MDA-MB-231 i MDA-MB-231DXR i després es van deixar a la incubadora durant algunes hores. El DMEM és un mitjà basal per donar suport al creixement de moltes cèl·lules de mamífer diferents i conté principalment 4,5 g/L de D-glucosa, L-glutamina i piruvat.

Tripsinització

Dins la campana de flux laminar, el medi amb DMEM es va eliminar dels tres flascons amb una pipeta Pasteur. Es van afegir 3 mL de PBS, una solució isotònica, en cada flascó per tal de netejar-los completament i per eliminar els ions de magnesi i calci, que podrien inhibir la funció de la tripsina. Posteriorment, el PBS va ser aspirat.

Tot seguit es varen introduir 3 mL de tripsina en cada flascó i els tres es van deixar 5 minuts a la incubadora de manera que l'enzim podria actuar en la seva temperatura òptima (37 º C). Les cèl · lules adherents van ser alliberades del seu substrat.

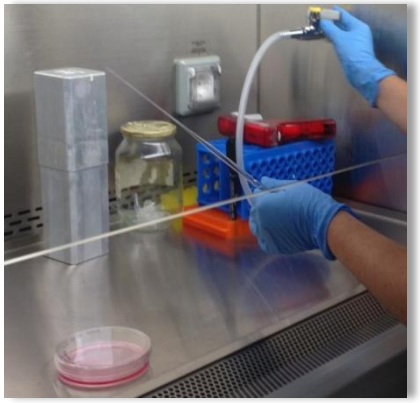


Figura 10. Preparació de la pipeta per aspirar el medi

Es van afegir 7 mL de DMEM en cada flascó per aturar l'acció de la tripsina. Les solucions es van introduir en dos tubs de Falcon diferents de 15 mL. Aquests es van inserir en una centrífuga per tal de separar la tripsina de les cèl·lules. Es va aspirar tot el medi deixant només les cèl·lules. Aquestes es van mesclar totalment amb 1 mL de DMEM.

Recompte cel·lular

10 µL de cada solució del tub de Falcon es van introduir en un Eppendorf amb 40 µL de blau de tripà (dilució 1/5), un colorant vital que acolora les cèl·lules mortes en blau i deixa les vives intactes. 10 µL de cadascuna d'aquestes noves solucions es van posar en una càmera de Neubauer marcant el tipus de cèl·lula que es trobava en cada rectangle semi-reflectant, i després varen ser introduïts en l'objectiu 10x del microscopi .

La càmera de Neubauer està dissenyada de manera que el nombre de cèl·lules en un conjunt de 16 quadrats de les cantonades és equivalent al nombre de cèl·lules x 10^4 / mL .

El nombre de cèl·lules comptades en un quadrat es va multiplicar per 5 per ajustar la dilució 1:5 en blau tripá . Llavors, el valor es multiplicà per 10^4 resultant en 1,85 milions de cèl·lules / mL de la línia cel·lular MDA-MB-468 i 1,325 milions de cèl·lules / mL de la MDA-MB-231 i la línia cel·lular MDA-MB-231DXR .
El producte de la multiplicació de 80 pouets per 4000 cèl·lules és 320.000 cèl·lules , en total, en cada placa de 96 pouets . Només s'utilitzaren els 60 pus del centre ja que els altres estaven més en contacte amb l'exterior i podien tenir resultats d'absorbància erronis. No obstant això, el càlcul es va fer com si treballéssim amb 80 pous , per tenir solució en excés .

Càlculs

Cèl·lules MDA-MB-468:

$$320.000 \text{ cèl·lules} \cdot \frac{1 \text{ mL solució}}{1{,}85 \cdot 10^6 \text{ cèl·lules}} = 0{,}173 \text{ mL} = 173 \text{ µL solució resuspesa}$$

Cèl·lules MDA-MB-231:

$$320.000 \text{ cèl·lules} \cdot \frac{1 \text{ mL solució}}{1{,}325 \cdot 10^6 \text{ cèl·lules}} = 0{,}\ 2415 \text{ mL} = 241{,}\ 5 \text{ µL solució resuspesa}$$

En un recipient estèril pels reactius es varen introduir 8 mL de DMEM juntament amb 173 µL de la solució amb cèl·lules MDA-MB-468 i en un altre dipòsit de reactiu, 8 ml de medi DMEM amb 241, 5 µL de la solució amb cèl·lules MDA-MB-231. Aquest pas es realitza perquè a l'hora de prendre d'ara endavant 100 µL de la solució de cada dipòsit de reactiu, per introduir-los en cada pou de la microplaca corresponent, el resultat que s'obté és de 4.000 cèl·lules / pou. Posteriorment, les dues plaques de 96 pous es varen deixar a la incubadora a 37 º C durant 24 hores per tal que les cèl·lules s'unissin una altra vegada.

$$\frac{320000 \text{ cèl·lules}}{8000 \text{ µL DMEM}} = 40 \text{ cèl. / µL} \qquad \frac{40 \text{ cèl·lules}}{1 \text{ µL medi}} \cdot \frac{100 \text{ µL medi}}{1 \text{ pou}} = 4000 \text{ cèl·lules / pou}$$

En el segon experiment, es va reduir a 2000 cèl·lules / pou degut a la dificultat de veure resultats considerables.

3.4.3. Tractament de les cèl·lules seguint el protocol de l'assaig MTT

Les cèl·lules viables tenen un metabolisme i participen en moltes reaccions químiques. Això fa que la solució de MTT precipiti en cristalls de formazan. Els cristalls es varen dissoldre en aquest cas amb DMSO i l'absorbància es va llegir a 570 nM.

En primer lloc, es van pesar 12,80 mG de naringenina en una balança i es van posar dins d'un Eppendorf juntament amb 482 µL de DMSO a una concentració de 97302,00 µM. Es va realitzar un vòrtex per obtenir una dissolució més ben mesclada. Es va introduir l' Eppendorf en un congelador a -20 º C, cobert amb paper d'alumini, ja que la

naringenina és un compost fotosensible. Es realitzaren alíquotes per prevenir el dany en l'activitat del compost després de treure'l i tornar-lo a posar al congelador tantes vegades. Després de 24 H d'incubació, es varen aspirar els 100 µL de medi de l'interior de cada pou i s'hi van afegir 50 µL de nou medi a cada un.

Es varen escollir vuit concentracions de naringenina per tractar les cèl·lules[5]. Es van afegir els mil·lilitres necessaris de naringenina per obtenir aquestes concentracions en vuit Eppendorfs diferents. Per facilitar la preparació de les solucions, es va afegir naringenina en tres més Eppendorfs a tres concentracions diferents de dilució (1/10, 1/100, 1/1000). En el segon experiment, es van utilitzar concentracions de naringenina més altes a causa dels resultats considerables insuficients.

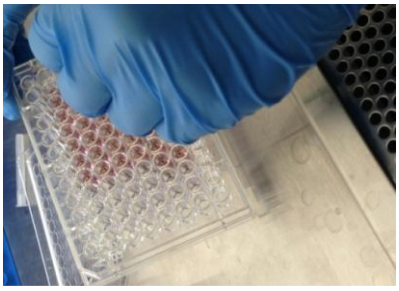


Figura 11. Procés d'aspiració del medi de cada pou.

50 µL de medi juntament amb 50 µL de tractament van ser introduïts en cada pou[6]. De cada concentració es van realitzar triplicats. Aquest pas es va repetir dues vegades per a una segona línia cel·lular.

Després de 48 H d'incubació, es va retirar el medi amb tractament de cada pouet. 100 µL de DMEM juntament amb 10 µL de MTT varen ser afegits a cada un. Després de 2 hores més a la incubadora, s'aspirà el medi i es van afegir 100 µL de DMSO a cada pou amb la finalitat de dissoldre els cristalls de MTT-formazan. Llavors, es varen col·locar les microplaques en un espectrofotòmetre per llegir els seus resultats d'absorbància.

Amb les cèl·lules MDA-MB-231DXR es va realitzar el mateix procés, amb les mateixes concentracions que les MDA-MB-231.

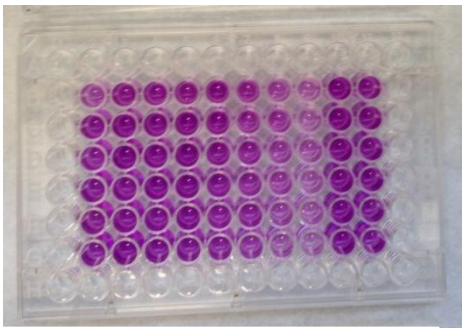


Figura 12. Microplaca amb cèl·lules MDA-MB-468 després de 2 H d'incubació amb la solució de MTT.

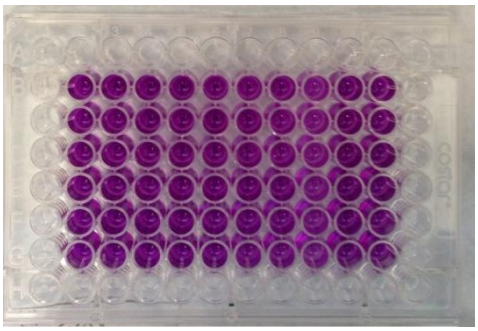


Figure 13. Microplaca amb cèl·lules MDA-MB-231 després de 2 H d'incubació amb la solució de MTT.

[5] En el primer experiment, les concentracions de naringenina eren: 0,97 µM; 9,70 µM; 24,30 µM; 48,70 µM; 97,30 µM; 194,60 µM; 291,90 µM i 486,50 µM. Van ser escollides segons l'assaig de la proliferació cel·lular amb MTT.

[6] Per tal de compensar la dilució resultant d'afegir 50 µL de medi, es van utilitzar el doble de concentracions de naringenina.

3.5. Determinació de l'absorbància a partir de l'espectrofotometria.

Els cinc components bàsics d'un espectrofotòmetre són el seu dispositiu de lectura, el fotodíode, filtres d'interferència impulsats per un motor i una font d'il·luminació. Aquest instrument mesura la intensitat com a funció de la longitud d'ona de la font de llum. La quantitat de llum absorbida per un medi, d'acord amb la llei de Beer, és proporcional a la concentració del solut absorbent present en la cubeta. L'espectrofotòmetre permet a la selecció de la longitud d'ona desitjada passar a través de la solució.

El fotodetector converteix la quantitat de llum que rep en un corrent que s'envia després al processador del senyal. Aquest converteix el corrent senzill en valors d'absorbància, transmitància i concentració que s'envien a continuació a la pantalla. L'absorbància de la solució resultant va ser presa a 570 nM.

3.5.1. Determinació de la CI_{30} i la CI_{50}

La CI_{30} i la CI_{50} són les concentracions de naringenina que inhibeixen el creixement de les cèl·lules en un 30% i 50% respectivament. En altres paraules, les concentracions en què el 30% i el 50% de les cèl·lules estan mortes. Cada valor representa la mitjana aritmètica ($\bar{x}$) ± desviació estàndard (S) per a dos experiments diferents realitzats en triplicats.

Per a determinar-los, la $\bar{x}$ i la S. es van calcular a partir dels resultats d'absorbància de cada concentració de naringenina. Amb aquests valors, es va obtenir el percentatge d'inhibició de la proliferació.

Mitjana aritmètica: $\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i$ Desviació estàndard: $s = \sqrt{\frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{N}(x_i - \bar{x})^2}$

Percentatge d'inhibició de la proliferació (%) : $100 - \left(\frac{\text{Mitjana de tractament dels triplicats}}{\text{Mitjana dels controls}} \cdot 100\right)$

La viabilitat cel·lular per a cada tractament va ser representada en un gràfic, amb les respectives línies de tendència. A partir d'aquest gràfic, es van obtenir les concentracions inhibitòries (CI_{30} i CI_{50}) del compost, amb les seves respectives desviacions estàndard

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els resultats d'absorbància suggereixen que la naringenina indueix la mort de les cèl·lules de CMTN. La solució dels pous que contenien una concentració més alta del flavonoide s'ha acolorit d'un porpra més clar que el de la solució dels pous que contenien concentracions més baixes. Les cèl·lules viables produïren més formazan que les cèl·lules mortes, fet que va permetre'ns la mesura de la seva activació, fins i tot en absència de proliferació, i conseqüentment, el medi va esdevenir més fosc.

L'absorbància és directament proporcional al nombre de cèl·lules i per tant, com més concentració de naringenina més cèl·lules mortes. Aquest efecte inhibidor ha estat present en cada línia cel·lular però en diferents graus.

Cèl·lules MDA-MB-468:

Primer experiment

Taula 2. Absorbàncies dels pous que contenien tractament i els pous control.

Naringenina (µM)	**0,97**	**9,7**	**24,3**	**48,7**	**97,3**	**194,6**	**291,9**	**486,5**	**Control**	**Control**
Rèplica 1	0,457	0,706	0,687	0,685	0,807	0,609	0,428	0,336	0,843	0,730
	0,730	0,777	0,760	0,849	0,777	0,554	0,508	0,303	0,897	0,841
Absorbància	0,636	0,867	0,732	0,811	0,658	0,565	0,423	0,362	0,805	0,805
	0,734	0,690	0,794	0,806	0,662	0,541	0,459	0,318	0,802	0,861
Rèplica2	0,725	0,712	0,673	0,733	0,593	0,578	0,397	0,305	0,744	0,689
	0,777	0,839	0,749	0,710	0,643	0,502	0,379	0,287	0,803	0,688

Els valors en vermell són considerats erronis i per tant, es van ometre en els càlculs.

Taula 3. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la primera rèplica.

Mitjana aritmètica*	0,683	0,783	0,746	0,782	0,747	0,576	0,453	0,334
Desviació estàndard**	0,066	0,081	0,037	0,086	0,079	0,029	0,048	0,030
Inhibició de la proliferació (%)***	**13,79**	**1,13**	**5,84**	**1,34**	**5,67**	**27,30**	**42,82**	**57,88**

Exemple dels càlculs:

* $\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i$ x_i = valor mesurat N = número de valors observats

(0, 730+0,636+0,734+0,725+0,777) / 5 = 0,683

** $SD = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{N-1}}$ x=valor mesurat $\bar{x}$ = mitjana aritmètica

N= número de valors observats

**$(\sqrt{[(1/4)((0,73-0,683)^2+(0,636-0,683)^2+(0,734-0,683)^2+(0,725-0,683)^2+(0,777-0,683)^2]}$ = 0,066

*** La mitjana dels controls és 0,799; el qual representa el 100% de cèl·lules vives.

$$100 - \left(\frac{\text{Mitjana de tractament dels triplicats}}{\text{Mitjana dels controls}} \cdot 100\right)$$

$$100 - \left(\frac{0,683}{0,799} \cdot 100\right) = 13,79\%$$

Taula 4. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la segona rèplica.								
Mitjana aritmètica	0,745	0,747	0,739	0,750	0,633	0,540	0,412	0,303
Desviació estàndard	0,028	0,080	0,061	0,050	0,036	0,038	0,042	0,016
Inhibició de la proliferació (%)	**5,93**	**5,72**	**6,77**	**5,38**	**20,15**	**31,80**	**48,04**	**61,71**

Taula 5. CI_{30} i CI_{50} de la primera i segona rèplica.		
	CI_{30} (µM)	**CI_{50} (µM)**
Primera rèplica	200	350
Segona rèplica	170	300
Mitjana	370	325

Les CI_{30} i les CI_{50} es van determinar a partir de la *Gràfica 1*, sota els resultats del primer experiment.

Segon experiment

Taula 6. Absorbàncies dels pous que contenien tractament i els pous control.										
Naringenina (µM)	**50**	**100**	**150**	**200**	**250**	**300**	**400**	**800**	**Control**	**Control**
Rèplica 1	0,374	0,400	0,339	0,316	0,248	0,275	0,188	0,121	0,538	0,498
	0,446	0,402	0,384	0,309	0,286	0,269	0,199	0,135	0,574	0,550
Absorbància	0,462	0,397	0,385	0,290	0,283	0,294	0,207	0,121	0,540	0,499
	0,460	0,424	0,383	0,322	0,326	0,29	0,409	0,137	0,580	0,524
Rèplica 2	0,493	0,449	0,438	0,32	0,345	0,289	0,214	0,147	0,603	0,564
	0,492	0,452	0,403	0,355	0,336	0,254	0,230	0,144	0,618	0,543

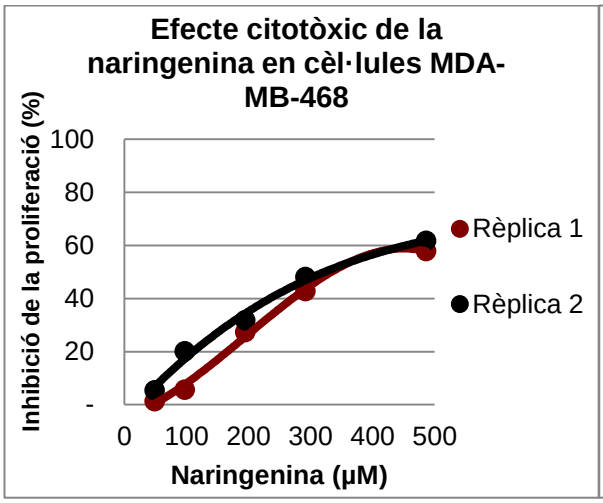
Taula 7. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la primera rèplica.								
Mitjana aritmètica	0,454	0,400	0,369	0,305	0,272	0,279	0,198	0,126
Desviació estàndard	0,047	0,003	0,026	0,013	0,021	0,013	0,010	0,008
Inhibició de la proliferació (%)	**17,80**	**27,70**	**33,20**	**44,80**	**50,70**	**49,40**	**64,20**	**77,30**

Taula 8. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la segona rèplica.								
Mitjana aritmètica	0,482	0,442	0,408	0,332	0,336	0,278	0,222	0,143
Desviació estàndard	0,019	0,015	0,028	0,020	0,010	0,021	0,108	0,005
Inhibició de la proliferació (%)	**12,80**	**20,10**	**26,20**	**39,90**	**39,30**	**49,80**	**59,80**	**74,20**

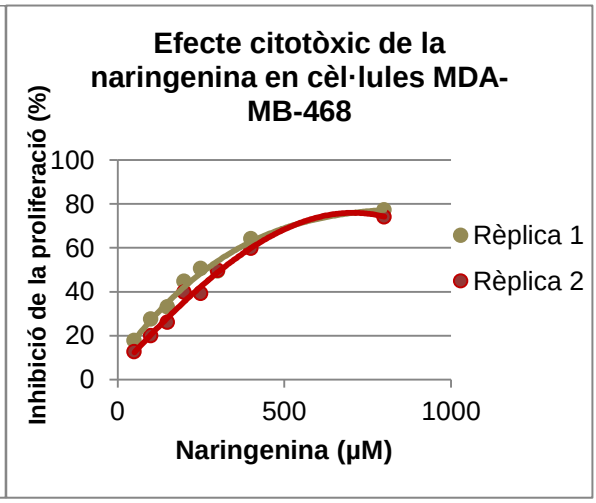
Taula 9. CI_{30} i CI_{50} de la primera i segona rèplica.		
	CI_{30} (µM)	**CI_{50} (µM)**
Primera rèplica	160	230
Segona rèplica	190	260
Mitjana	175	245

Les CI_{30} i les CI_{50} es van determinar a partir de la *Gràfica 2*, just a sota.

Gràfica 1: Inhibició de la proliferació en el primer experiment amb baixes concentracions de naringenina.



Gràfica 2: Inhibició de la proliferació en el primer experiment amb altes concentracions de naringenina.



A. B. C.

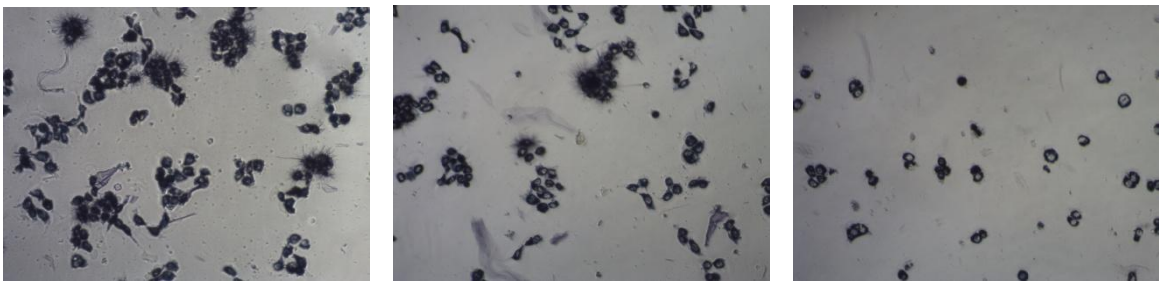


Figura 14. Cèl·lules MDA-MB-468 després de 48 H d'incubació. (A) Cèl·lules control MDA-MB-468 sense tractament. (B) Cèl·lules MDA-MB-468 tractades amb 100 µM de naringenina. (C) Cèl·lules MDA-MB-468 tractades amb 500 µM de naringenina.

En cèl·lules MDA-MB-468, en el primer experiment, la naringenina va tenir un efecte molt escàs a baixes concentracions ja que les dosis eren insuficients. El número de cèl·lules en els pous control i en els tractats amb concentracions baixes era gairebé igual. Altrament, en el segon, es van utilitzar concentracions més altes i es varen trobar més cèl·lules mortes. Els pous control tenien més cèl·lules viables que els pous tractats. La mitjana CI_{30} és 180 ±18 µM i la CI_{50} és 255 ± 62 µM, valors considerablement poc elevats.

Cèl·lules MDA-MB-231:

Primer experiment

Taula 10. Absorbàncies dels pous que contenien tractament i els pous control.

Naringenina (µM)	0,97	9,70	24,30	48,70	97,30	194,60	291,90	486,50	Control	Control
Rèplica 1	1,421	1,509	1,373	1,319	1,142	1,017	1,076	0,696	1,227	1,275
	1,448	1,328	1,369	1,219	1,328	1,146	0,933	0,723	1,277	1,232
Absorbància	1,441	1,282	1,237	1,203	1,046	0,954	0,867	0,665	1,173	1,238
	1,459	1,287	1,242	1,253	1,143	1,144	1,029	0,705	1,215	1,221
Rèplica 2	1,450	1,401	1,248	1,188	1,007	1,000	0,913	0,680	1,090	1,106
	1,392	1,334	1,291	1,295	1,192	1,028	0,941	0,726	1,192	1,170

Taula 11. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la primera rèplica.

Mitjana aritmètica	1,437	1,373	1,303	1,247	1,172	1,039	0,959	0,695
Desviació estàndard	0,014	0,120	0,077	0,063	0,143	0,098	0,107	0,029
Inhibició de la proliferació (%)	**- 19,58**	**- 14,29**	**- 8,46**	**- 3,80**	**2,44**	**13,51**	**20,20**	**42,17**

Taula 12. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la segona rèplica.								
Mitjana aritmètica	1,434	1,341	1,260	1,245	1,114	1,057	0,961	0,704
Desviació estàndard	0,036	0,057	0,027	0,054	0,096	0,076	0,061	0,023
Inhibició de la proliferació (%)	**- 19,34**	**- 11,59**	**- 4,91**	**- 3,66**	**7,27**	**11,98**	**20,01**	**41,42**

Taula 13. CI_{30} i CI_{50} de la primera i la segona rèplica		
	CI_{30} (µM)	**CI_{50} (µM)**
Primer rèplica	400	-
Segon rèplica	420	-
Mitjana	410	-

La CI_{30} i la CI_{50} han estat determinades a partir de la *Gràfica 3*, sota els resultats del segon experiments.

Segon experiment

Taula 14. Absorbàncies dels pous que contenien tractament i els pous control.										
Naringenina (µM)	**50**	**100**	**150**	**200**	**250**	**300**	**400**	**800**	**Control**	**Control**
Rèplica 1	0,308	0,477	0,449	0,403	0,366	0,380	0,351	0,144	0,547	0,561
	0,448	0,464	0,435	0,380	0,355	0,356	0,321	0,152	0,542	0,553
Absorbància	0,475	0,426	0,319	0,370	0,270	0,356	0,286	0,145	0,491	0,507
	0,468	0,455	0,382	0,354	0,340	0,328	0,412	0,138	0,528	0,531
Rèplica 2	0,458	0,459	0,402	0,404	0,378	0,353	0,305	0,159	0,510	0,517
	0,516	0,489	0,526	0,462	0,410	0,371	0,299	0,150	0,519	0,581

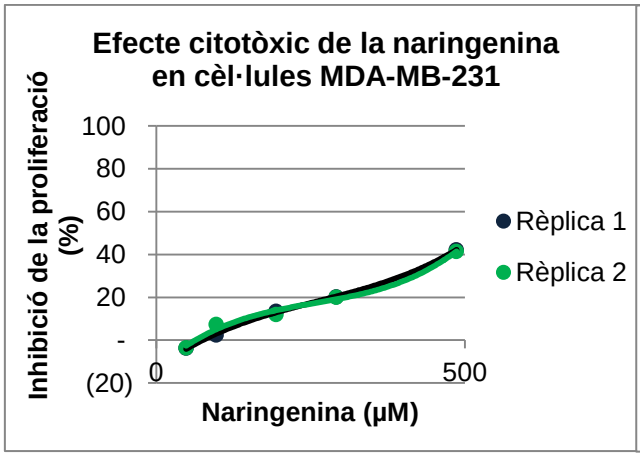
Taula 15. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la primera rèplica.								
Mitjana aritmètica	0,462	0,456	0,401	0,384	0,330	0,364	0,319	0,147
Desviació estàndard	0,019	0,027	0,071	0,017	0,053	0,014	0,033	0,004
Inhibició de la proliferació (%)	**13,30**	**14,40**	**24,70**	**27,80**	**37,90**	**31,60**	**40,00**	**72,40**

Taula 16. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la segona rèplica.								
Mitjana aritmètica	0,481	0,468	0,437	0,407	0,359	0,351	0,339	0,149
Desviació estàndard	0,031	0,019	0,078	0,054	0,035	0,022	0,064	0,011
Inhibició de la proliferació (%)	**9,70**	**12,10**	**18,00**	**23,60**	**32,60**	**34,10**	**36,40**	**72,00**

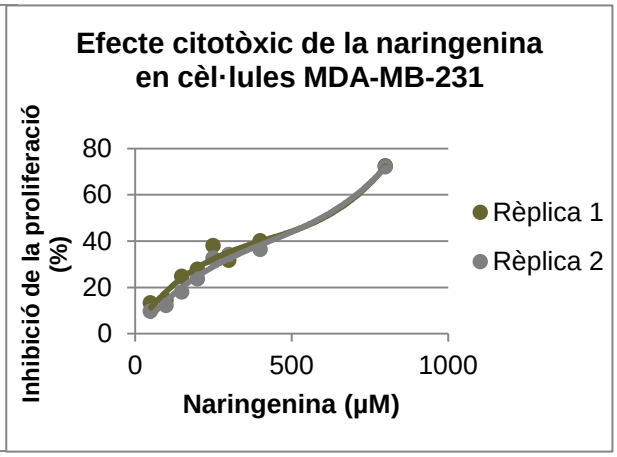
Taula 17. CI_{30} i CI_{50} de la primera i segona rèplica.		
	CI_{30} (µM)	**CI_{50} (µM)**
Primera rèplica	230	550
Segona rèplica	250	546
Mitjana	240	548

Les CI_{30} i les CI_{50} s'han determinat a partir de la *Gràfica 4*.

Gràfica 3: Inhibició de la proliferació en el primer experiment amb baixes concentracions de naringenina.



Gràfica 4: Inhibició de la proliferació en el primer experiment amb altes concentracions de naringenina.



A. **B.** **C.**

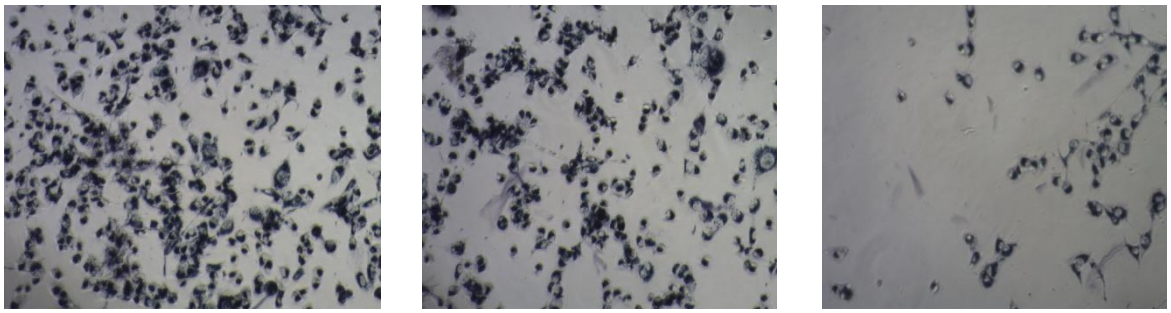


Figura 15. Cèl·lules MDA-MB-231 després de 48h d'incubació. (A) Cèl·lules MDA-MB-231 controls, sense tractament. (B) Cèl·lules MDA-MB-231 tractades amb 100 µM de naringenina. (C) Cèl·lules MDA-MB-231 tractades amb 500 µM de naringenina.

En cèl·lules MDA-MB-231, els resultats de l'absorbància varen sortir massa alts en el primer experiment i la CI_{50} no es va assolir. Possiblement, les dosis utilitzades en el primer experiment eren insuficients i el número de cèl·lules per pou era massa alt. En el segon experiment, es van utilitzar concentracions més altes de naringenina per tal d'assolir la CI_{50}. La meitat de cèl·lules es va introduir a cada pou per poder obtenir resultats d'absorbàncies menys elevats i per tant, més correctes. Els triplicats no tenien exactament les mateixes absorbàncies. La causa d'això pot ser un ús de les pipetes poc acurat o bé de qualsevol altre pas del procés en el qual no es va ser prou precís. Tanmateix, aquestes variacions eren mínimes.

Alguns resultats d'absorbàncies eren més alts en concentracions baixes de naringenina que en les concentracions del control. Això pot ser degut o bé a algun error comès durant el procés del mètode MTT o bé al simple fet de què les concentracions de naringenina eren tan baixes que poques cèl·lules podien morir i conseqüentment, totes les altres continuaven proliferant.

La CI_{30} mitjana és 325 ± 98 µM i la de la CI_{50}, 548 ± 3 µM. Aquestes concentracions són més elevades que les de les cèl·lules MDA-MB-468 cells, fet que suposa que la naringenina és menys efectiva en cèl·lules MDA-MB-231.

Kanno Syu-ichi *et al*. (2004) [13] determina en l'experiment que la concentració inhibitòria de naringenina en cèl·lules MDA-MB-231 és de 267 ± 59 µM. També varen realitzar experiments *in vitro* a partir dels quals suggereixen que l'efecte inductor-inhibitori de la naringenina en el creixement de línies cel·lulars cancerígenes és independent del p53. El p53 és un gen relacionat amb la supressió de tumors i la conservació de l'estabilitat mitjançant la prevenció la mutació genòmica. Tanmateix, molts estudis han conclòs que aquest gen té un rol important en l'efecte citotòxic de molts compostos naturals.

Cèl·lules MDA-MB-231DXR:

Taula 18. Absorbàncies dels pous que contenien tractament i els pous control.

Naringenina (µM)	**50**	**100**	**150**	**200**	**250**	**300**	**400**	**800**	**Control**	**Control**
Rèplica 1	0,238	0,315	0,316	0,273	0,253	0,245	0,213	0,122	0,388	0,336
	0,341	0,325	0,298	0,275	0,219	0,232	0,202	0,119	0,396	0,399
Absorbància	0,327	0,298	0,328	0,275	0,271	0,220	0,191	0,126	0,345	0,368
	0,371	0,308	0,312	0,286	0,242	0,260	0,210	0,120	0,391	0,398
Rèplica 2	0,359	0,329	0,341	0,287	0,268	0,286	0,205	0,129	0,382	0,367
	0,335	0,308	0,315	0,295	0,266	0,256	0,240	0,114	0,423	0,358

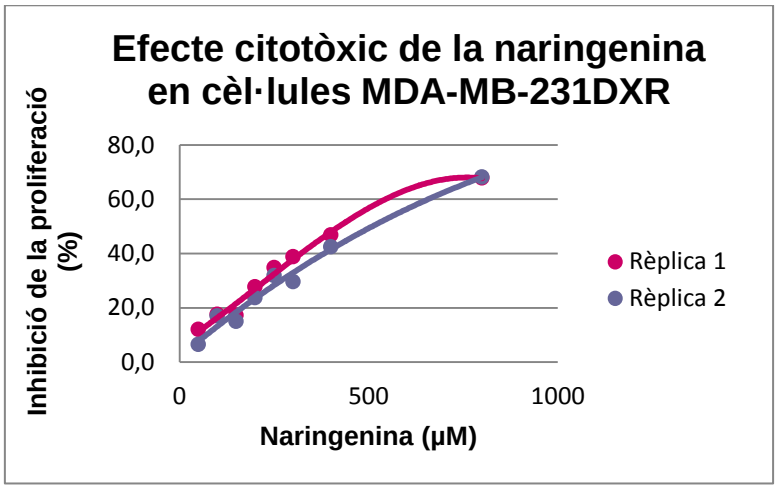
Taula 19. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la primera rèplica.								
Mitjana aritmètica	0,334	0,313	0,314	0,274	0,248	0,232	0,202	0,122
Desviació estàndard	0,010	0,014	0,015	0,001	0,026	0,013	0,011	0,004
Inhibició de la proliferació (%)	**11,90**	**17,60**	**17,20**	**27,70**	**34,70**	**38,70**	**46,70**	**67,70**

Taula 20. Mitjana aritmètica, desviació estàndard i percentatge d'inhibició de la segona rèplica.								
Mitjana aritmètica	0,355	0,315	0,323	0,289	0,259	0,267	0,218	0,121
Desviació estàndard	0,018	0,012	0,016	0,005	0,014	0,016	0,019	0,008
Inhibició de la proliferació (%)	**6,40**	**16,90**	**14,90**	**23,70**	**31,80**	**29,50**	**42,40**	**68,10**

Taula 21. CI_{30} i CI_{50} de la primera i la segona rèplica		
	CI_{30} (µM)	**CI_{50} (µM)**
Primera rèplica	230	430
Segon rèplica	270	510
Mitjana	250	470

La CI_{30} i la CI_{50} han estat determinades a partir de la *Gràfica 5*.

Gràfica 5: Inhibició de la proliferació en cèl·lules resistents a la doxorubicina.



Es va realitzar el mateix experiment amb un tipus diferent de cèl·lules MDA-MB-231, les MDA-MB-231DXR, per tal de comparar els resultats i arribar a extreure millors

conclusions. Aquest tipus de cèl·lules són resistents a la doxorubicina, un fàrmac utilitzat àmpliament a la quimioteràpia. Les CI_{30} i CI_{50} varen ser similars en els dos tipus de cèl·lules així que l'experiment pot dir-se que va ser eficient i els resultats, coherents.

Experiments *in vivo* serien el pròxim pas per determinar si aquest compost natural present en l'aranja té un efecte inhibitori en pacients amb càncer i si seria un útil suplement per la prevenció del càncer de mama.

El flavonoide més present en l'aranja ha demostrat tenir un efecte anticancerigen induint l'apoptosi de les cèl·lules de càncer de mama triple negatiu. Això significa, per tant, que aquest fruit proporciona potents beneficis per el cos humà i que, probablement, podria evitar fins a un cert punt, el creixement del tumor o fins i tot, prevenir-ne la seva formació.

CONCLUSIÓ

El CMTN, el qual representa un 20% dels càncers de mama diagnosticats, es caracteritza per la manca de l'expressió dels receptors d'hormona d'estrogen i progesterona o pel receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà (HER_2). Els pacients tenen actualment un pronòstic molt pobre ja que no disposen de teràpies diana. Tot i que sí responen a la quimioteràpia, solen recaure-hi en els següents cinc anys. Així doncs, es necessiten trobar urgentment nous tractaments adquiribles.

Les cèl·lules MDA-MB-231DXR, les quals varen ser obtingudes en el mateix laboratori són resistents a la doxorubicina. Aquest fàrmac s'utilitza en la quimioteràpia i és subministrat als pacients per injecció o per perfusió. La naringenina ha resultat tenir un efecte citotòxic també en aquesta línia cel·lular, fet que indica ser un inhibidor molts potent del creixement tumoral ja que fins i tot fàrmacs utilitzats en quimioteràpia no tingueren tal efecte.

En conclusió, els resultats suggereixen que la naringenina té un efecte citotòxic en cèl·lules de CMTN. El mecanisme d'aquest efecte inhibidor de la proliferació tumoral mitjançant la naringenina encara no està ben aclarit. Es garanteixen futures investigacions més a fons per tal de dilucidar la causa i el procés involucrat.

BIBLIOGRAFIA.CITES I REFERÈNCIES

[1] National Center for Biotechnology Information. Pubmed: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=932&loc=ec_rcs#itabs-2d [Citat 2013 Juny 16]

[2] King Roger JB., Robins Mike W.; *Cancer Biology*, Third edition. London: Pearson, 2006. ISBN: 0-113-129454-7. (Page 1 to 6).

[3] National Cancer Institute (NCI): http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast [Citat 2013 Jul 23]

[4] DeSantis, C. Siegel, R., Bandi, P., Jemal, A., "Breast cancer statistics." *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* American Cancer Society. 2011 61, 409-418.

[5] Reddy, KB. PhD. "Triple negative breast cancers: an updated review on treatment options*". Current Oncology*. Department of Pathology, Wayne State University School of Medicine. 2011.

[6] OLIVERAS SERRAT, Gloria. *Derivats del (-)-3-galat d'epigalocatequina com a nous inhibidors de la sintasa d'àcids grassos amb efectes antitumorals en models cel·lulars i animals de càncer de mama.* Tesi doctoral. Directora: Dra. Teresa Puig Miquel. Barcelona: Universitat de Barcelona. Departament de Medicina. 2012

[7] Metzger-Filho Otto, Tutt Andrew, De Azambuja Evandro, *et al*. "Dissecting the Heterogeneity of Triple-Negative Breast Cancer". *Journal of Clinical Oncology.* American Society of Clinical Oncology. 2012

[8] BreastCancer.Org : http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/trip_neg/behavior [Citat 2013 Agost 13]

[9] Carey, Lisa A. "Directed Therapy of Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer." *The Oncologist*. University of North Carolina. 2011. 16 (suppl 1): 71-78

[10] Duffy MJ , McGowman PM , Crown J. "Targeted therapy for triple-negative breast cancer: Where are we?*". International Journal of Cancer*. Union for International Cancer Control. 2012. ISSN:2090-3189

[11] Clemons Mark, MB., BS., MD., Paul Goss, MD., PhD. "Estrogen and the Risk of Breast Cancer*". The New England Journal of Medicine*. University Health Network.. 2001.

[12] Macmillan Cancer Support: http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertypes/Breast/Symptomsdiagnosis/HormoneandHER2receptors/HER2andbreastcancer.aspx [Citat 2013 Setembre 12]

[13] KANNO Syu-ichi, Tomizawa Ayako, Hiura Takako *et al*. “Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and Sarcoma S-180-Implanted Mice”. *Research Gate*. Tohoky Pharmateutical University. 2004. 28(3):527-30

ALTRES PÀGINES WEBS CONSULTADES

National Breast Cancer Foundation, Inc:
http://www.nationalbreastcancer.org/triple-negative-breast-cancer [Citat 2013 Juny 10]

Pubmed: “Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices.” http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8875554 [Citat 2013 Juny 14]

Pubmed: “Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents.” http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164691 [Citat 2013 Juny 14]

Agraïments

En primer lloc, m'agradaria agrair a tots els membres de la Universitat de Girona i concretament del Parc Tecnològic, qui varen permetre'm d'utilitzar el laboratori del Departament de Ciències Mèdiques per realitzar tots els experiments. Vull agrair a la Doctora Teresa Puig, del Departament de Ciències Mèdiques, per el seu suport, per totes les eines que em va facilitar i per tots els consells que em va donar abans de dur a terme tot el treball. Tanmateix, a qui dec tot el meu agraïment és a l'Ariadna. Ella m'ha ajudat amb tots els experiments, explicant-me pas per pas tot el procediment que calia seguir i a més, va tenir una immensa paciència amb mi.

En segon lloc, voldria donar les gràcies a la meva tutora del treball, la Teresa Barnadas, per respondre'm tot tipus de pregunta, per encarar-me bé en tot el procediment de la monografia i per sempre animar-me a tirar endavant.

Per últim, vull mostrar la meva gran gratitud a les meves amigues i a la meva família, espacialment a la meva germana, per la seva ajuda constant i els seus consells durant tota l' elaboració del treball.

Sense cap d'ells, els resultats finals del treball no haurien estat tant exitosos.

ANNEX A

GLOSSARI

Totes les definicions són tretes del Diccionari Enciclopèdic de Medicina o bé del Centre de Terminologia de la Generalitat de Catalunya.

http://www.medic.cat/

http://www.termcat.cat/ca/Cercaterm/

Aglicona: fracció no glucídica dels heteròsids. La natura química de l'aglicona, que pot ésser molt diversa, confereix a cada heteròsid les seves principals característiques i serveix de base per a classificar-lo.

Alíquota: porció mesurada d'un líquid, d'una solució o, en general, d'una mostra que s'ha d'analitzar.

Apoptosi: procés degeneratiu que condueix a la mort cel·lular mitjançant un seguit de mecanismes d'autodestrucció i permet l'eliminació controlada de cèl·lules.

Doxorubicina: antibiòtic aïllat d'espècies d'estreptomices, d'estructura molt similar a la de la daunorubicina. És emprada, per via intravenosa, en el tractament de leucèmies agudes i també, associada a d'altres quimioteràpics, en limfomes no hodgkinians, carcinoma d'ovari, de mamella i de pulmó (de cèl·lules petites de gra de civada) i d'altres. Pot produir cardiotoxicitat.

Flavanona: Flavonoide format per reducció d'una flavona; existeix en forma lliure i com a glicòsid.

Formazan: hidrazona hipotètica (CH_4N_4) relacionada amb l'àcid fòrmic i conegut només en la forma de derivats de colors intensos dels quals alguns s'obtenen a partir de compostos incolors, per l'acció reductora dels teixits vius i serveixen com a indicadors de viabilitat per la producció de color.

Gen supressor: gen que redueix la probabilitat que una cèl·lula d'un organisme multicel·lular es transformi en una cèl·lula cancerígena.

Glicòsid: nom genèric de les substàncies constituïdes per un sucre unit a un altre compost mitjançant un enllaç acetàlic (enllaç glicosídic).

***In vitro*:** tècnica que permet mantenir i/o fer créixer de forma asèptica cèl·lules o fragments de teixits vegetals en un medi nutritiu i en condicions ambientals controlades.

Oncogen: gen que, en expressar-se, determina la transformació d'una cèl·lula sana en cancerosa.

Proliferació: reproducció o multiplicació de formes semblants, especialment de cèl·lules.

Pronòstic: previsió, segons els signes, els símptomes i la natura del cas, de l'evolució probable d'una malaltia i de les perspectives de guarició.

Protocol: pla precís i detallat per a l'estudi d'un problema biomèdic o per al tractament d'una determinada malaltia.

Tripsina: enzim proteolític que catalitza la hidròlisi dels enllaços peptídics interns d'una cadena peptídica en què el carbonil és aportat per la lisina o per l'arginina. Intervé en la digestió intestinal. És secretat pel suc pancreàtic en forma d'un precursor inactiu -el tripsinogen- que es converteix en tripsina per acció de l'enterocinasa.

ANNEX B

MTT Cell Proliferation Assay

ATCC® 30-1010K

Store at 4°C

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans, animals or for diagnostics.

INTRODUCTION

Measurement of cell viability and proliferation forms the basis for numerous *in vitro* assays of a cell population's response to external factors. The reduction of tetrazolium salts is now widely accepted as a reliable way to examine cell proliferation. The yellow tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) is reduced by metabolically active cells, in part by the action of dehydrogenase enzymes, to generate reducing equivalents such as NADH and NADPH. The resulting intracellular purple formazan can be solubilized and quantified by spectrophotometric means.

The MTT Cell Proliferation Assay measures the cell proliferation rate and conversely, when metabolic events lead to apoptosis or necrosis, the reduction in cell viability. The number of assay steps has been minimized as much as possible to expedite sample processing. The MTT Reagent yields low background absorbance values in the absence of cells. For each cell type the linear relationship between cell number and signal produced is established, thus allowing an accurate quantification of changes in the rate of cell proliferation.

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 (U.S., Canada, and Puerto Rico)
703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
Or contact your local distributor

KIT COMPONENTS

Component	Volume	Storage
MTT Reagent	25 mL	4°C
Detergent Reagent	2 × 125 mL	Room Temp. or 4°C

The MTT Reagent is ready to use and stable at 4°C in the dark for up to eighteen months, provided there is no contamination. Care should be taken not to contaminate the MTT Reagent with cell culture medium during pipetting. We recommend that the appropriate volume required for each experiment be removed and aseptically placed into a separate clean tube and the stock bottle returned to 4°C in the dark. If the MTT Reagent is bluegreen, do not use and refer to the troubleshooting guide on page 6.

The Detergent Reagent is supplied ready to use. If the Detergent Reagent has been stored at 4°C, warm the bottle for 5 minutes at 37°C then mix by inverting gently to avoid frothing. The detergent is stable for up to eighteen months at room temperature.

EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED BUT *NOT* SUPPLIED

Microtiter plate reader with 650- and 570-nm filters	Microtiter plate (flat-bottomed)
Inverted microscope	Sterile tubes (5 mL)
Multi-channel pipette	Serological pipettes
37°C incubator	Sterile pipette tips
Laminar flow hood	

BASIC PROTOCOL

If you are familiar with the procedure and know the cell count to use in your specific assay, you may follow this basic protocol.

Step	Action
1	Plate cells at 1,000 to 100,000 per well.
2	Incubate for 6 to 24 hours.
3	Add 10 µL MTT Reagent.
4	Incubate for 2 to 4 hours until purple precipitate is visible.
5	Add 100 µL Detergent Reagent.
6	Leave at room temperature in the dark for 2 hours.
7	Record absorbance at 570 nm.

DETERMINING OPTIMAL CELL COUNTS

Use the protocol below to determine the optimal cell count and incubation period for your cell line. This determination should only have to be done once for each cell type. The data will be used thereafter in your experimental system following the protocol above.

Step	Action
1	Harvest suspension cells by centrifugation. Adherent cells should be released from their substrate by trypsinization or scraping.
2	Resuspend cells at 1×10^6 per mL.
3	Prepare serial dilutions of cells in culture medium from 1×10^6 to 1×10^3 cells per mL.
4	Plate out, in triplicate, 100 µL of the dilutions into wells of a microtiter plate.
5	Include three control wells of medium alone to provide the blanks for absorbance readings.
6	Incubate the cells under conditions appropriate for the cell line for 6 to 48 hours (to recover from handling). The time required will vary but 12 hours to overnight is sufficient for most cell types.
7	Add 10 µL of MTT Reagent to each well, including controls.
8	Return plate to cell culture incubator for 2 to 4 hours.
9	Periodically view the cells under an inverted microscope for presence of intracellular punctate purple precipitate.
10	When the purple precipitate is clearly visible under the microscope add 100 µL of Detergent Reagent to all wells, including controls. Swirl gently; do not shake.
11	Leave plate with cover in the dark for 2 to 4 hours or overnight at room temperature.
12	Remove plate cover and measure the absorbance in each well, including the blanks, at 570 nm in a microtiter plate reader. [Absorbances can be read with any filter in the wavelength range of 550 - 600 nm. The reference wavelength should be higher than 650 nm. The blanks should give values close to zero (+/- 0.1).]
13	If the readings are low return the plate to the dark for longer incubation.
14	Determine the average values from triplicate readings and subtract the average value for the blank. Plot absorbance against number of cells/mL. The number of cells to use in your assay should lie within the linear portion of the plot and yield an absorbance of 0.75 - 1.25.

PERFORMING AN ASSAY

The plot of the data obtained in Step 14 on page 3 (absorbance against number of cells) should provide a curve with a linear portion. The optimal number of cells for the assay should fall within the linear portion of the curve and give an absorbance value between 0.75 and 1.25. Then both stimulation and inhibition of cell proliferation can be measured.

To run an assay, select an optimal cell number and follow the MTT Cell Proliferation Assay steps 4 to 13 (page 3) using your experimental system, plating in triplicate. Assays will include:

a) Blank wells containing medium only
b) Untreated control cells
c) Test cells treated with the substance to be assayed

If more than 100 µL of medium is used per well, increase the amount of MTT Reagent accordingly; e.g., for 250 µL of medium use 25 µL of MTT Reagent.

DATA INTERPRETATION

Absorbance values that are lower than the control cells indicate a reduction in the rate of cell proliferation. Conversely a higher absorbance rate indicates an increase in cell proliferation. Rarely, an increase in proliferation may be offset by cell death; evidence of cell death may be inferred from morphological changes.

REFERENCES

van de Loosdrecht, A.A., et al. J. Immunol. Methods 174: 311-320, 1994.
Ferrari, M., et al. J. Immunol. Methods 131: 165-172, 1990.
Gerlier, D., and N. Thomasset. J. Immunol. Methods 94: 57-63, 1986.
Alley, M.C., et al. Cancer Res. 48: 589-601, 1988.
Mosmann, T. J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983.

TROUBLESHOOTING

Problem: MTT Reagent is blue-green.

Cause	Remedy
Contamination with a reducing agent or cell/bacterial contamination.	Discard. Remove aliquots of new MTT Reagent using sterile technique.
Excessive exposure to light.	Store solution in the dark at 4°C.

TROUBLESHOOTING (CONTINUED)

Problem: Blanks (medium only) give high absorbance readings.

Cause	Remedy
The medium is contaminated with cells/ bacteria/yeast (visible under microscope).	Discard. Check medium before plating. Use sterile technique for cell plating in biological hood. Use sterile 96-well plate.
The medium contains ascorbic acid.	Incubate plate in the dark. Find alternative medium if possible.

Problem: Absorbance readings too high.

Cause	Remedy
Cell number per well too high.	Decrease cell density at plating.
Contamination of culture with bacteria or yeast.	Discard. View wells prior to addition of MTT Reagent to check for contamination.

Problem: Absorbance readings are too low.

Cause	Remedy
Cell number per well is too low.	Increase cell density at plating.
Incubation time for reduction of MTT is too short. No purple color visible in cells when viewed under microscope.	Increase incubation time with MTT Reagent until purple color is evident inside cells when viewed under microscope. Longer incubation of up to 24 hours may be required for some cell types.
Incubation time for solubilization of formazan dye too short (intact cells with intracellular dye visible when viewed under the microscope).	Increase incubation time with Detergent Reagent or incubate at 37°C. View under microscope to ensure no crystals remain out of solution.
Cells not proliferating due to improper culture conditions or inadequate time of recovery after plating.	Check that culture conditions (medium, temperature, humidity, CO_2, etc.) are appropriate. View cells periodically to check condition. Increase time in culture after plating for cell recovery.

Problem: Replicates have different values.

Cause	Remedy
Inaccurate plating or pipetting.	Increase accuracy of cell plating, check accuracy of pipette.

SAFETY

See the Material Safety Data Sheet regarding safety precautions for this product.

RELATED PRODUCTS

ATCC has the world's largest collection of cell lines. If you need a cell line as a control for performing your assay, see our Web site at www.atcc.org to search our online catalog. We also offer cell culture media, serum, and reagents.

306/59 01

American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110 USA
www.atcc.org

© 2011 ATCC. All rights reserved.

800-638-6597 (U.S., Canada, and Puerto Rico)
703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
Or contact your local distributor