

Índex

1	Introducció.....	5
2	Metodologia.....	6
3	Part teòrica.....	7
3.1	Diferència entre cèl·lules sanes i cèl·lules cancerígenes	7
3.2	Càncer de pulmó	8
3.2.1	Línia cel·lular A549	9
3.3	Càncer de còlon	10
3.3.1	Línia cel·lular CACO-2.....	11
3.4	Citotòxics	11
3.4.1	5-Fluorouracil (5FU).....	12
4	Part experimental.....	14
4.1	Material de laboratori utilitzat	14
4.1.1	Cabina de flux laminar	14
4.1.2	Càmera de Neubauer	14
4.1.3	Centrífuga.....	15
4.1.4	Pipeta automàtica o micropipeta	15
4.1.5	Flascó de cultiu.....	16
4.1.6	Microscopi invertit	16
4.1.7	Lector de plaques	17
4.2	Objectiu de l'experiment	17
4.3	Disseny experimental.....	17
4.4	Diari de laboratori	19
4.4.1	Dia 1 (29-08-2014).....	19
4.4.2	Dia 2 (01-09-2014).....	20
4.4.3	Dia 3 (02-09-2014).....	22
4.4.4	Dia 4 (03-09-2014).....	22

4.4.5 Dia 5 (04-09-2014).....	23
4.5 Resultats obtinguts (cèl·lules A549).....	24
4.6 Resultats obtinguts (cèl·lules CACO-2)	26
5. Conclusions	28
6. Annex	31
6.1 La cèl·lula	31
6.2 El cicle cel·lular	31
6.3 Factors de risc del càncer de pulmó.....	35
6.4 Tipus de càncers de pulmó.....	36
6.5 Síntomes del càncer de pulmó	37
6.6 Tipus de càncer de còlon	38
6.7 Creixement i metàstasi del càncer de còlon.....	39
6.8 Síntomes del càncer de còlon.....	39
Font de les imatges	40
Bibliografia.....	42

1 Introducció

He triat fer un treball de recerca sobre un tema relacionat amb la Biologia Cel·lular i la Química. Vaig decidir triar el tema de la Biologia, i del càncer en concret, perquè sempre he sentit una gran curiositat per aquest àmbit i, ja abans de fer el treball, estava molt intrigada en el procés que porta a una cèl·lula sana a convertir-se en una tumoral.

El càncer és un terme molt general i, per això, vaig decidir centrar-me en l'ús de citotòxics en el seu tractament. La hipòtesi que volia comprovar era: els citotòxics afecten al cicle cel·lular de la cèl·lula, fent que aquesta sigui incapaç de reproduir-se i produint-li la mort.

El citotòxic que he estudiat es diu 5-Fluorouracil, i s'utilitza com a quimioteràpic (actualment, és un dels fàrmacs més agressius contra el càncer). Aquesta molècula afecta a la fase S del cicle cel·lular.

L'objectiu principal del meu treball és comparar els efectes del 5-Fluorouracil, un fàrmac antitumoral, en dues línees cel·lulars diferents, una provinent d'un adenocarcinoma de pulmó (línia A549) i l'altra d'un adenocarcinoma de còlon (línia CACO-2).

Així doncs, el treball pràctic ha constatat en preparar les cèl·lules (és a dir, preparar els cultius cel·lulars), exposar-les a diverses concentracions del fàrmac i durant diversos períodes de temps i, finalment, comparar els efectes del fàrmac en els dos tipus de cèl·lules per tal de veure quina línia cel·lular és més sensible.

Els meus objectius eren:

- Conèixer les particularitats del funcionament de les cèl·lules cancerígenes
- Conèixer el mecanisme d'acció d'algun dels fàrmacs que es poden aplicar per tal de frenar la seva proliferació
- Aplicar aquests coneixements en un laboratori d'investigació
- Observar els canvis en la proliferació de les cèl·lules enfrontades al fàrmac
- Treballar *in vivo* amb cèl·lules tumorals
- Adquirir experiència en el treball científic

Tots aquest objectius s'han complert un cop finalitzat el treball.

2 Metodologia

Aquest treball s'ha pogut dur a terme gràcies als programes Bojos per la Bioquímica i Recerca a Secundària. Sense ells, no hauria estat possible realitzar la part experimental als laboratoris del Parc Científic de Barcelona.

El treball consta de dues parts, una teòrica i una experimental. La part teòrica es va fer durant l'estiu de 2014 i el primer trimestre del curs 2014-2015. En aquesta part, s'expliquen els diferents conceptes necessaris per poder entendre la part experimental. Aquesta es va dur a terme durant la primera setmana de setembre de 2014 al Laboratori de Toxicologia del Parc Científic de Barcelona. Aquí, comptava amb l'ajut d'un tutor, en, que em va guiar en tot el procés. Al laboratori, vaig poder treballar amb material que normalment no es troba als instituts, i vaig poder observar l'activitat del dia a dia d'un científic.

També s'inclou un annex amb informació bàsica sobre el funcionament cel·lular en relació amb la seva reproducció i les característiques dels càncers dels que procedeixen les línies cel·lulars que he utilitzat en el treball d'investigació

3 Part teòrica

3.1 Diferència entre cèl·lules sanes i cèl·lules cancerígenes

En els teixits tumorals, les cèl·lules perden la capacitat de dur a terme correctament les seves funcions a causa de mutacions en el seu material genètic. Aquestes mutacions produeixen una alteració en el cicle cel·lular, que fa que les cèl·lules es reproduïxin de manera descontrolada i que s'acumulin en excés, formant un tumor.

Hi ha dos tipus de tumors, els benignes i els malignes. Un tumor benigne és una massa de cèl·lules que creix localment i que no té la capacitat d'envair altres teixits (metàstasi¹). Aquesta capacitat és necessària per tal de considerar que un tumor és cancerigen. Aquest tipus de tumors tenen una taxa de creixement més lenta que els malignes, i les cèl·lules que els conformen estan més diferenciades que als tumors cancerígens. En molts casos no suposen un perill per a la salut de l'organisme, però poden ser problemàtics si pressionen òrgans vitals (per exemple, el cervell). En canvi, els tumors malignes es caracteritzen per tenir la capacitat d'envair altres teixits. Els tumors malignes són el que anomenem càncer (o neoplàsia maligna).

Els tumors malignes estan formats per cèl·lules cancerígenes. Les cèl·lules cancerígenes tenen la capacitat de créixer i de dividir-se sense la necessitat de determinades senyals o en presència de senyals inhibidores. A més, també presenten canvis en les seves propietats físiques. Alguns d'ells són:

- Canvis en el citoesquelet: aquestes alteracions interfereixen en la manera que la cèl·lula interactua amb les seves veïnes, així com en la seva aparença. Els canvis en el citoesquelet també poden alterar la adhesió cel·lular i el seu moviment.
- Adhesió/Mobilitat cel·lular: la reducció de la adhesió entre dues cèl·lules i entre cèl·lula i matriu extracel·lular possibilita la formació de grans masses de cèl·lules. Les cèl·lules canceroses no mostren inhibició per contacte, i així poden continuar creixent encara que estiguin envoltades per altres cèl·lules. Aquestes alteracions en la adhesió cel·lular també tenen efecte en l'habilitat de les cèl·lules per moure's. Les cèl·lules canceroses han de tenir l'habilitat de moure's i migrar per tal de propagar-se, i la adhesió cel·lular juga un rol molt important en la regulació de la mobilitat cel·lular.

¹ La metàstasi consisteix en la propagació d'un tumor des del lloc inicial a una altra part del cos. Les metàstasis tenen el mateix tipus de cèl·lules que el tumor original.

- Canvis nuclears: la forma i organització dels nuclis en les cèl·lules cancerígenes pot ser molt diferent a las que es troben en les cèl·lules sanes. Les cèl·lules cancerígenes poden presentar més d'un nucli, números anormals de cromosomes i membranes i citoesquelets poc definits.

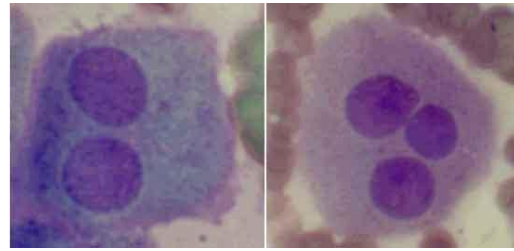


Figura 1: cèl·lules polinucleades

- Pèrdua de la capacitat de reparar l'ADN quan es produeixen mutacions i l'habilitat d'autodestruir-se per apoptosi.
- Secreció d'enzims que permeten envair els teixits veïns. Aquests enzims digereixen les barreres de la migració i fan possible la propagació de les cèl·lules tumorals.
- Presenten una alta taxa de reproducció i de mutacions.
- Variació de la mida i forma de les cèl·lules.
- Pèrdua de l'especialització i impossibilitat de dur a terme les funcions del teixit en el que es troben.
- Desorganització de les cèl·lules i límits del tumor mal definits.

3.2 Càncer de pulmó

Els pulmons són dos òrgans encarregats d'aportar oxigen a la sang i d'excretar el diòxid de carboni residu del metabolisme de l'organisme. Pertanyen a l'aparell respiratori i estan situats a la caixa toràcica. Estan protegits per les costelles i recoberts per una doble membrana anomenada pleura, que facilita la contracció i expansió dels pulmons. El pulmó dret és lleugerament més gran que l'esquerre, degut a l'espai que ocupa el cor. Els dos pulmons es troben separats per una zona anomenada mediastí, on es troba la tràquea, l'èsofag, el cor i vasos sanguinis.

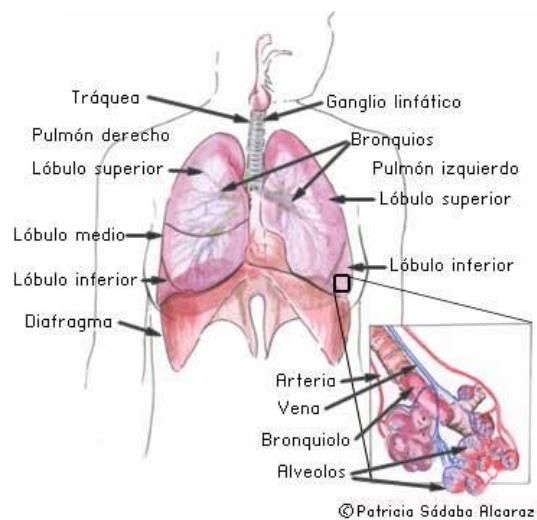


Figura 2: esquema dels pulmons

L'aire arriba als pulmons a través de la tràquea, que es divideix en dos bronquis principals, el dret i l'esquerre. A dins dels pulmons, cada bronqui principal es divideix en conductes cada cop més fins: bronquis secundaris, bronquíols, conductes alveolars i, finalment, alvèols.

Les parets dels alvèols contenen una gran quantitat de petits vasos sanguinis i capil·lars on es produeix l'intercanvi de gasos durant la respiració. Als alvèols es produeix el pas de l'oxigen de l'aire a la sang (durant la inspiració) i el pas del diòxid de carboni i altres gasos de la sang a l'aire (durant la expiració).

El càncer de pulmó és la principal causa de morts relacionades amb el càncer a tot el món. Representa el 16,6% de tots els tumors entre els homes (965.000 casos) i el 7,6% entre

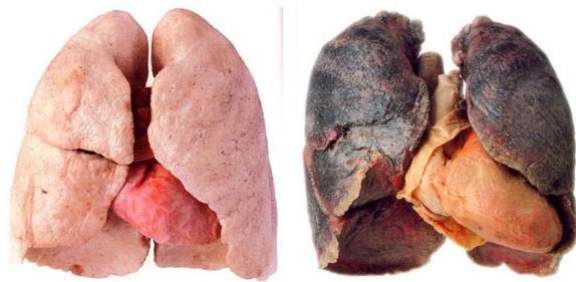


Figura 3: pulmons sans i pulmons d'un fumador

es dones (387.000 casos). Es tracta d'un conjunt de malalties provocades

pel creixement de cèl·lules tumorals al teixit pulmonar. Aquest tipus de càncer està directament relacionat amb el consum de tabac.

3.2.1 Línia cel·lular A549

La línia cel·lular A549 està formada per cèl·lules epitelials basals² provinents d'un adenocarcinoma³ alveolar humà. Va ser desenvolupada a l'any 1972 per el científic D. J. Giard. Provenen del tumor d'un home caucàsic de 58 anys. En la natura, aquestes cèl·lules són les encarregades de la difusió de substàncies a través dels alvèols dels

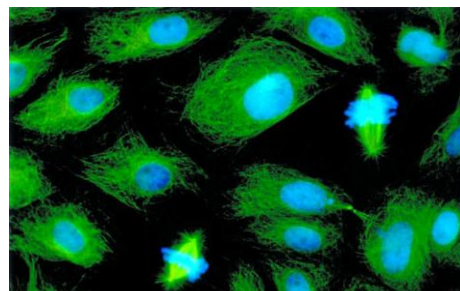


Figura 4: cèl·lules de la línia cel·lular A549

² La làmina basal és una fina capa de matriu extracel·lular excretada per les cèl·lules epitelials ubicada entre l'epiteli i el teixit conjuntiu. Té diverses funcions, entre les quals es troben la estructural i la de filtració. També influeix en la polaritat de la cèl·lula i regula la proliferació i diferenciació de les cèl·lules. Està constituïda per proteïnes fibroses (elastina, col·lagen...), proteoglicans i glicosaminoglicans.

³ Càncer que comença en las cèl·lules glandulars (secretores). Les cèl·lules glandulars es troben en el teixit que revesteix certs òrgans interns, i produeixen i alliberen substàncies en el cos (com la mucositat, los sucs gàstrics i altres líquids). La majoria dels càncers de mama, pàncrees, pulmó, pròstata i colon són adenocarcinomes.

pulmons. In vitro, creixen en una monocapa i, in vivo, causen tumors en ratolins atímics⁴.

3.3 Càncer de còlon

El còlon és l'última porció de l'aparell digestiu. Forma part de l'intestí gros, que està format pel cec, el còlon, el recte i l'anus. La seva funció dins de l'organisme és absorbir vitamines i minerals, extreure l'aigua dels residus sòlids i emmagatzemar la matèria fecal abans de ser eliminada del cos. El còlon està format per quatre seccions: el còlon ascendent, el còlon transvers, el còlon descendent i el còlon sigmoide. En els humans, l'intestí gros (el còlon) mesura aproximadament 1,5 metres, el que equival a una cinquena part de tot el canal intestinal.

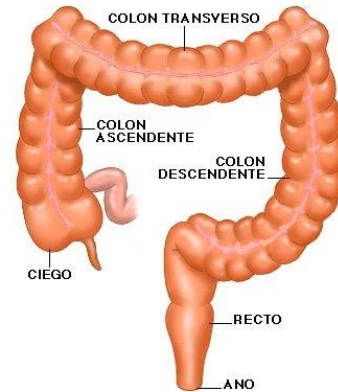


Figura 5: intestí gros

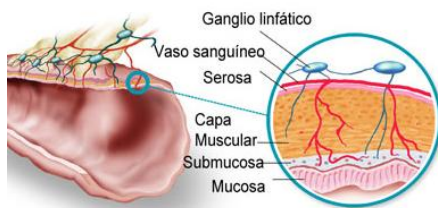


Figura 6: capes de teixit del còlon

El còlon i el recte estan constituïts per diverses capes de teixit. La més interna s'anomena mucosa, on hi ha glàndules productores de moc. En aquestes glàndules és on es localitzen amb major freqüència els tumors malignes. La mucosa es troba envoltada per la submucosa. Més externament es troba la capa

muscular, que amb la seva contracció permet el moviment del contingut del tub digestiu. La capa més externa s'anomena serosa, i la seva funció és la reducció del fregament.

El càncer de còlon és el tipus de càncer més freqüent a Espanya si tenim en compte els dos sexes. Consisteix en la presència de tumors malignes a la mucosa de l'intestí gros i/o a les seves glàndules. La majoria dels càncers de còlon apareixen sobre lesions preexistents (per exemple, un pòlip) a la mucosa de l'intestí gros que, per diverses circumstàncies evoluciona fins a tornar-se un tumor maligne. Majoritàriament es

⁴ Els ratolins atímics són aquells que no tenen una glàndula del timus normal i que presenten un sistema immunològic defectuós degut a alteracions genètiques. El timus és un òrgan localitzat al mediastí, darrere de l'estèrnum. La seva principal funció és oferir un espai per a la maduració de les cèl·lules T, i és vital en la protecció contra l'autoimmunitat.

diagnostica entre els 65 i els 75 anys d'edat, però es poden donar casos entre els 35-40 anys. Aquests últims acostumen a tenir una predisposició genètica.

3.3.1 Línia cel·lular CACO-2

La línia cel·lular CACO-2 està formada per cèl·lules epitelials provinents d'un adenocarcinoma colorectal humà. Va ser desenvolupada per l'Institut per la Recerca del Càncer Sloan-Kettering, en una investigació liderada pel Doctor Jorgen Fogh.

Vistes al microscopi, es evident que aquestes cèl·lules són heterogènies. Això ha fet que, a través dels anys, les característiques de les cèl·lules CACO-2 utilitzades

en laboratoris de tot el món hagin canviat tant que es fa difícil comparar resultats entre diferents laboratoris.

La línia cel·lular CACO-2 s'utilitza molt en la indústria farmacèutica com a model in vitro de la mucosa de l'intestí prim humà per predir l'absorció de fàrmacs administrats oralment.

3.4 Citotòxics

Els tractaments de determinades malalties (com podrien ser el càncer, les malalties autoimmunes, l'artritis...) en la actualitat requereixen l'ús de fàrmacs amb efectes tòxics a nivell cel·lular. Aquests fàrmacs contenen el que anomenem agents citotòxics, que dins l'àmbit sanitari es coneixen amb el nom de citostàtics.

Els citostàtics són substàncies capaces d'inhibir o impedir la maduració i proliferació de les cèl·lules. Actuen sobre determinades fases del cicles cel·lular. Això vol dir que són actives contra cèl·lules que es troben en fase de divisió (com s'ha dit abans, les cèl·lules tumorals es troben constantment en divisió). Aquesta propietat fa que aquestes substàncies també siguin tòxiques per a les cèl·lules sanes.

Les cèl·lules exposades a aquestes substàncies poden experimentar necrosi (les cèl·lules perden la integritat de la membrana i moren ràpidament a causa de la lisis d'aquesta), una alta taxa de mutageneïtat, poden parar de créixer i de dividir-se o bé poden activar els gens encarregats de la mort programada de la cèl·lula (apoptosi).

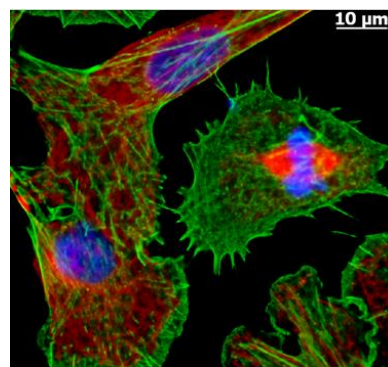


Figura 7: cèl·lules de la línia cel·lular Caco-2

Els citotòxics poden ser:

- Carcinògens: aquells que tendeixen a provocar o afavorir el desenvolupament d'un càncer o bé de lesions que constitueixen el punt de partida per el desenvolupament del càncer. És important no confondre els termes "carcinogen" (es refereix únicament a tumors malignes) i "oncogènic" (es refereix a tumors benignes i també malignes). Alguns exemples de carcinògens són el DDT (diclorodifeniltricloroetà), el benzè i el tabac.
- Teratogènics: aquells que provoquen malformacions congènites sobre l'embrió (per exemple, la Talidomida).
- Mutàgens: aquells que tenen la capacitat d'alterar el material genètic provocant mutacions. Alguns exemples són: estirè, hidrocarburs aromàtics polinuclears, rajos ionitzants...
- Tòxics per a la reproducció: aquells que poden produir alteracions de la fertilitat (infertilitat, mort fetal...).
- Tòxics per a un òrgan en escasses dosis: produeixen un efecte tòxic sobre un òrgan concret o sobre la salut en dosis escasses (per exemple, dany hepàtic, necrosi local dels teixits exposats...).

3.4.1 5-Fluorouracil (5FU)

El 5-fluorouracil pertany a la classe de fàrmacs quimioteràpics anomenats antimetabòlits. Aquests fàrmacs intervenen en la síntesi d'ADN i inhibeixen la formació d'ARN. Ambdues accions es combinen per provocar un desequilibri metabòlic que resulta en la mort de la cèl·lula. La activitat inhibidora del fàrmac, per la seva analogia amb l'uracil, té un efecte sobre el creixement veloç de les cèl·lules tumorals, que aprofiten l'uracil per a la biosíntesis d'àcids nucleics.

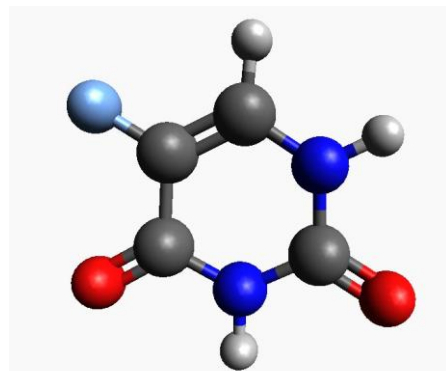


Figura 8: molècula de 5-fluorouracil

El 5-fluoracil actua en la fase S del cicle cel·lular. L'eficàcia d'aquest fàrmac radica en el fet que s'uneix de forma permanent a l'enzim timidilat sintasa, essencial per a la síntesi de nucleòtids de timina. La timina és una de les quatre bases nitrogenades que

formen l'ADN, i la seva absència implica que l'ADN no es pot replicar. Això inhibeix la divisió cel·lular i, per tant, el creixement tumoral. Els efectes de la privació de nucleòtids per a la replicació de l'ADN, tot i que repercuteixen en totes les cèl·lules de l'organisme, afecten més a aquelles que es reproduïxen sense control.

El 5-Fluorouracil s'utilitza per tractar diferents tipus de càncer. Principalment s'utilitza en el tractament dels següents: càncer de còlon, recte, coll, i els tumors cerebrals.

4 Part experimental

4.1 Material de laboratori utilitzat

4.1.1 Cabina de flux laminar

La cabina de flux laminar és un recinte que, gràcies a un ventilador, expulsa un flux d'aire que impedeix el pas de partícules de fins a 0,1 micròmetres. L'aire que mou el ventilador es fa passar per un filtre HEPA⁵ per tal d'evitar la propagació de virus i bacteris i així impedir la contaminació del sistema i del material amb el que es treballa. Només tenen una cara lliure, la cara frontal, que dóna accés a l'interior, on es localitza la superfície de treball. Mentre no s'utilitza, es pot encendre una làmpada de llum ultraviolada amb acció germicida per tal d'esterilitzar totalment el seu interior. N'hi ha de quatre classes diferents, depenent del grau de protecció que proporcionen a la mostra, a l'ambient i a l'operari, sent la de classe I la que ofereix la mínima protecció i la de classe 4 la que ofereix la màxima.



Figura 9: cabina de flux laminar de classe II



Figura 10: cabina de flux laminar de classe II amb llum UV.

4.1.2 Càmera de Neubauer

La càmera de Neubauer és un instrument utilitzat principalment en medicina i biologia per tal de realitzar recomptes de cèl·lules en un medi líquid (per exemple, en cultius cel·lulars, a la sang, a l'orina...). Es tracta d'un



Figura 11: càmera de Neubauer.

portaobjectes que té dues zones lleugerament deprimides, al fons de les quals s'ha

⁵ Un filtre HEPA (de l'anglès High Efficiency Particle Arresting) és un tipus de filtre d'aire d'alta eficiència.

marcat, amb l'ajuda d'un diamant, una quadrícula d'una determinada dimensió amb quatre quadrants.

Per tal d'utilitzar-la, es cobreix la càmera amb l'ajuda d'un cobrecàmeres que s'adhereix per tensió superficial. Després s'introdueix el líquid que conté les cèl·lules en dissolució. Per comptar les cèl·lules s'observa al microscopi amb l'augment adequat i es compten les cèl·lules que hi ha a cada quadratet marcat. Llavors, es fa la mitjana de la quantitat de cèl·lules que hi ha a cada quadrant i, com que el volum de líquid és conegut, es pot calcular la concentració de cèl·lules de la dissolució.

4.1.3 Centrífuga

La centrífuga és una màquina que utilitza la força centrífuga per tal d'accelerar la decantació o la sedimentació dels components o fases d'una mostra segons la seva densitat. Consta de dues parts principals, el motor i el rotor (on es col·loquen les mostres). És imprescindible que les masses de les mostres estiguin compensades entre si a l'hora de posar en funcionament la màquina, ja que, degut a la gran acceleració que agafa la mostra (normalment mesurada en G o en revolucions per minut), si no es compensessin les masses, la màquina podria explotar.



Figura 12: centrifugadora.

4.1.4 Pipeta automàtica o micropipeta

La pipeta automàtica és un instrument de laboratori utilitzat per mesurar i transferir petits volums de líquid. Permet utilitzar diferents líquids sense la necessitat de netejar tot l'instrument, ja que es fan servir puntes d'un sol ús que acostumen a ser estèrils. Els volums de líquid que pot captar varien segons el model. Els més habituals són els anomenats p20, p 200 i p1000, que poden mesurar un màxim de 20, 200 i 1000 μl respectivament. Hi ha micropipetes simples, que només accepten una punta alhora, i



Figura 13: micropipeta simple.



Figura 14: micropipeta multicanal.

micropipetes multicanal, que permeten incorporar diverses puntes, absorbint el mateix volum de líquid amb totes elles.

4.1.5 Flascó de cultiu

El flascó de cultiu és una espècie d'ampolla que serveix per fer cultius monocapa de cèl·lules i que permet la reproducció de les cèl·lules i l'adhesió d'aquestes a la seva superfície, degut als tractaments que es fan als seus materials. Estan fets de poliestirè, són estèrils, i normalment disposen d'una àrea de creixement de entre 25 i 250 cm².



Figura 15: flascó de cultiu.

També tenen un tap amb filtre que permet l'intercanvi de gasos. S'utilitzen horitzontalment per tal d'utilitzar la màxima superfície.

4.1.6 Microscopi invertit

El microscopi invertit és un tipus de microscopi que presenta la font de llum i el diafragma a sobre de la platina, i els objectius a sota d'aquesta (a l'inrevés que el microscopi convencional). S'utilitza per observar mostres "in vivo" sense danyar-les.



Figura 16: microscopi invertit

4.1.7 Lector de plaques

El lector de plaques és un tipus d'espectrofotòmetre utilitzat en l'anàlisi de mostres biològiques i assaigs químics. Serveix per quantificar proteïnes i per dur a terme assajos d'activitat enzimàtica (com és el cas de l'assaig MTT, realitzar a la part experimental d'aquest treball). El seu funcionament és el següent: un feix de llum il·lumina la mostra



Figura 17: lector de plaques

amb una longitud d'ona específica, i un detector de llum situat a l'altra banda de la mostra mesura el percentatge de la llum inicial que es transmet a través de la mostra. La quantitat de llum que traspasa la mostra està relacionada amb la concentració de la molècula d'interès.

4.2 Objectiu de l'experiment

L'objectiu de l'experiment és fer un estudi comparatiu de l'efecte del citotòxic 5-FU sobre dues línees cel·lulars (CACO-2 i A549) durant diferents períodes de temps i a diferents concentracions. Un cop acabat el temps d'exposició al citotòxic, es fa l'anàlisi de les dades amb un espectrofotòmetre per tal d'avaluar la taxa d'inhibició de les dues línees cel·lulars i així determinar quina és més sensible i quina és la dosi més efectiva.

4.3 Disseny experimental

Per tal de dur a terme l'experiment, es cultiven en dues plaques de 96 pous les dues línees cel·lulars. En els pous de l'interior d'aquestes plaques es cultiven les cèl·lules, deixant els pous exteriors només amb el medi de creixement. Als pous interiors (contenint cèl·lules) és on s'apliquen les diferents concentracions de 5-FU, seguint el següent model:

	0h	4h	24h	48h	72h	0h	4h	24h	48h	72h	
Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi
Medi	CV	3,2	3,2	3,2	3,2	CV	3,2	3,2	3,2	3,2	Medi
Medi	CV	1,6	1,6	1,6	1,6	CV	1,6	1,6	1,6	1,6	Medi
Medi	CV	0,8	0,8	0,8	0,8	CV	0,8	0,8	0,8	0,8	Medi
Medi	CV	0,4	0,4	0,4	0,4	CV	0,4	0,4	0,4	0,4	Medi
Medi	CV	0,2	0,2	0,2	0,2	CV	0,2	0,2	0,2	0,2	Medi
Medi	CV	0,1	0,1	0,1	0,1	CV	0,1	0,1	0,1	0,1	Medi
Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi

- Els números de les caselles interiors indiquen la concentració en µg/ml de la dissolució de 5-FU a la que s'exposaran les cèl·lules de cada pou.
- CV significa control vehicle, és a dir, el control negatiu, on les cèl·lules no s'exposen al 5-FU (però sí que s'exposen a DMSO, el dissolvent orgànic que s'utilitza per dissoldre el 5-FU).
- Els números que hi ha a sobre de cada columna representen el número d'hores en les que s'exposarà les cèl·lules al fàrmac.

Un cop acabat el temps d'exposició es fa un tractament amb MTT. Es retira el medi dels pous, s'aplica medi fresc amb MTT⁶ i es deixa actuar durant un mínim de 2 hores. Posteriorment, es retira el medi i s'aplica DMSO (dissolvent orgànic) per dissoldre la sal de formazan. Es deixen les plaques en agitació durant un mínim de cinc minuts i es fa una lectura amb l'espectrofotòmetre.

⁶ La prova de MTT ens permet conèixer la quantitat de cèl·lules mortes i vives que hi ha en cada pou. Es basa en la reducció metabòlica del MTT (realitzada per un enzim mitocondrial) en una sal de color lila (*formazan*) de manera que es pot determinar la funcionalitat mitocondrial de les cèl·lules tractades. La quantitat de cèl·lules vives és proporcional a la quantitat de *formazán* produït, ja que l'activitat mitocondrial només es produeix mentre les cèl·lules estan vives.

4.4 Diari de laboratori

4.4.1 Dia 1 (29-08-2014)

Objectiu: descongelar les dues línees cel·lulars que s'utilitzaran a l'experiment i passar-les a un lloc òptim per al creixement i reproducció de les cèl·lules.

Temps total: 3 hores

Passos seguits:

1. **Preparació dels medis per a les cèl·lules:** el medi és una solució amb tots els nutrients necessaris i un pH adequat per tal que les cèl·lules puguin sobreviure. Es preparen 9 ml de dos medis diferents en dos tubs cònics de 15 ml: un per a les cèl·lules A549 i un altre per a les CACO-2. El medi de les A549 conté un 0,5% d'antibiòtic (penicil·lina i estreptomicina), un 10% de Fetal Bovine Serum (FBS), un 1% de glutamina (aminoàcid essencial) i un 88,5% de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). El medi de les CACO-2 és pràcticament igual, només canvia en el fet que té un 1% d'aminoàcids no essencials. Un cop preparats, es posen els dos tubs al bany a 37°C. Es preparen 30 ml més de cada medi, que s'utilitzaran posteriorment.

2. **Descongelació de les línees cel·lulars:** la descongelació de les cèl·lules ha de ser un procés ràpid, ja que els productes que s'utilitzen per tal de congelar-les (medi crioprotector) són tòxics quan aquestes estan vives. Les cèl·lules es guarden en tancs de nitrogen líquid, en uns tubs amb una capacitat d'1,8 ml (anomenats criotubs). Per tal de descongelar-les, es submergeix el criotub durant un minut al bany a 37°C,



Figura 18: tanc de nitrogen líquid.

agitant-lo constantment. Després, s'introdueix el criotub a la campana de bioseguretat II. S'afegeix 1ml de medi a 37°C directament al criotub i es traspasa tot el contingut del criotub al tub cònic de 15 ml amb medi. A continuació es centrifuga tot el contingut a 200G durant 5 minuts. Un cop acabat aquest temps, s'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet (cèl·lules

que han quedat al fons) en 1 ml de medi. Tot seguit, amb una pipeta automàtica de 20 µl, s'extreuen 10 µl del medi amb cèl·lules i es fica en un eppendorf. En aquest eppendorf també s'introdueixen 10 µl de tint blau tripà (tipus de tint que s'adhereix a les cèl·lules mortes) per tal de poder fer un comptatge de les cèl·lules i fer un estudi de la viabilitat del cultiu. Si la viabilitat està per sobre del 75%, es podrà seguir amb el procediment. Si no, caldrà descongelar una altra línia. Es passen 0,5 ml del contingut del tub de 15 ml (medi + cèl·lules) a un altre tub amb 9,5 ml de medi, i tot junt es passa a un flascó de cultiu. Finalment, es posa el flascó de cultiu en un incubador a 37°C i amb un 5% de CO₂ durant dos dies per tal que les cèl·lules creixin i es reproduïxin. Al flascó s'ha d'indicar el dia en que es fa la descongelació, el tipus de cèl·lules i el vial descongelat. Es segueix aquest procediment per a les dues línees cel·lulars. La primera línia de cèl·lules A549 descongelades presentava una viabilitat inferior al 50% i, per tant, es va haver de descongelar una altra.

4.4.2 Dia 2 (01-09-2014)

Objectiu: tripsinitzar les cèl·lules del flascó de cultiu, passar-les a una placa de 96 pous i aplicar la primera dosi de 5FU (72h)

Temps total: 5 hores

Passos seguits:

- 1. Tripsinització de les cèl·lules:** la tripsina és un enzim que trenca els enllaços peptídics de les proteïnes per hidròlisi per tal de formar pèptids de menor mida i aminoàcids. En el laboratori, s'utilitza amb la finalitat de trencar els enllaços que es formen entre cèl·lules i així poder recollir les cèl·lules cultivades en plaques de Petri o flascons de cultiu. Primer de tot, es treu el flascó de cultiu de la incubadora, s'absorbeix el medi i es fan dos rentats amb PBS (una solució isotònica). A continuació, s'apliquen 2,5 ml de tripsina (és la quantitat mínima per cobrir la superfície del flascó de cultiu) i es fica el flascó de cultiu durant dos minuts a la incubadora. Un cop passats els dos minuts, s'afegeixen 5 ml de medi i es passa tot el contingut a un tub circular i es centrifuga a 200 G durant 5 minuts. A continuació, s'absorbeix el medi amb tripsina i es resuspenen les cèl·lules en 1 ml de medi.

S'extreuen 10 µl de la solució i es fa un recompte de les cèl·lules en una càmera de Neubauer seguint el mateix procediment que al dia 1. Finalment, s'omple la placa de 96 pous amb les cèl·lules. Per tal de fer-ho, s'omplen els pous exteriors de la placa només amb medi (sense cèl·lules), i els pous interiors es sembren amb 100µL/pou de la solució cel·lular a una densitat aproximada de 1×10^5 cels/ml amb una micropipeta multicanal. Es posen les plaques de 96 pous a la incubadora durant un mínim de tres hores. Primer de tot es van tripsinitzar les cèl·lules A549, i després del recompte es va obtenir una densitat aproximada de $2,51 \times 10^6$ cèl·lules/ml. Es van introduir aquestes cèl·lules a la incubadora a les 10:00. Després, es va seguir el mateix procediment amb les CACO-2. Es va obtenir un recompte aproximat de $1,73 \times 10^6$ cèl·lules/ml. Aquestes cèl·lules es van introduir a la incubadora a les 11:00.

2. Preparació de les dilucions de 5FU:

es pesen 6,4 mg de 5FU i es dissolen en 1 ml de DMSO⁷ (concentració: 6,4 mg/ml). Es fa una dilució 1:10, és a dir, es barregen 100 µL del stock amb 900 µL de DMSO (concentració: 0,64 mg/ml). S'utilitza l'equació

$C_0 \cdot V_0 = C_f \cdot V_f$ (C= concentració i

V= volum) per tal de saber la quantitat de stock que s'ha d'afegir al medi al que posteriorment exposarem les cèl·lules. Com que farem una dilució en sèrie, haurem de partir d'una major quantitat de la dilució de major concentració (3,2 µg/ml). Llavors: $0,64 \text{ mg/ml} \cdot x = 3,2 \text{ µg/ml} \cdot 2 \text{ ml}$; $x = 0,01 \text{ ml} = 10 \text{ µL}$. Per fer la primera dilució (3,2 µg/ml), farem servir 10 µL de stock i 2 ml de medi, que es barrejaran bé en un tub circular. A continuació, es preparen 5 tubs circulars i es posa 1 ml de medi a cada un. Per fer la primera dilució a la meitat (1,6 µg/ml), es pipeteja 1 ml de la primera dilució (3,2 µg/ml) i es barreja amb el contingut d'un dels tubs amb 1 ml de medi. Per fer la segona dilució a la meitat (0,8 µg/ml), es pipeteja 1 ml de la segona dilució (1,6 µg/ml) i es barreja amb el contingut d'un dels tubs amb 1 ml de medi, i així successivament fins a arribar a la dilució de concentració 0,1 µg/ml.

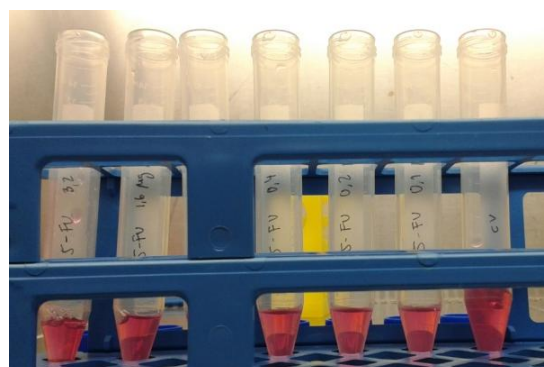


Figura 19: dilucions de 5-FU

⁷ DMSO (dimetil sulfòxid): líquid orgànic sense color que conté sulfòxid, emprat com a dissolvent orgànic, com a criopreservant i com a medicament.

3. **Aplicació de les diferents dosis de 5-FU:** s'extreu la placa de 96 pous de la incubadora i s'absorbeix el medi de les columnes CV i 72h. A cada pou s'apliquen 200 µl de les diferents dilucions de 5-FU, seguint el model exposat l'apartat 4.3 (disseny experimental). A les columnes del control vehicle s'aplicaran 200 µl de medi amb DMSO al 0,5% (la mateixa proporció en la que es troba a les dilucions de 5-FU). L'hora d'aplicació per a les cèl·lules A549 va ser les 13:30, i la de les CACO-2 va ser les 14:00. Un cop acabat el procediment s'introdueixen les cèl·lules a la incubadora.

4.4.3 Dia 3 (02-09-2014)

Objectiu: aplicar la segona dosi de 5-FU (48 h)

Temps total: 1 hora

Passos seguits:

1. **Preparació de les dilucions de 5FU:** es preparen les dilucions seguint el mateix procediment que al dia 2.
2. **Aplicació de les diferents dosis de 5-FU:** s'apliquen les dosis de 5-FU a la columna 48 h seguint el mateix mètode que el dia 2. Hora d'aplicació a les cèl·lules A549: 13:00. Hora d'aplicació a les cèl·lules CACO-2: 13:30. Un cop acabat el procediment s'introdueixen les cèl·lules a la incubadora.

4.4.4 Dia 4 (03-09-2014)

Objectiu: aplicar la tercera dosi de 5-FU (24 h)

Temps total: 1 hora

1. **Preparació de les dilucions de 5FU:** es preparen les dilucions seguint el mateix procediment que al dia 2.
2. **Aplicació de les diferents dosis de 5-FU:** s'apliquen les dosis de 5-FU a la columna 24 h seguint el mateix mètode que el dia 2. Hora d'aplicació a les cèl·lules A549: 13:00. Hora d'aplicació a les cèl·lules CACO-2: 13:30. Un cop acabat el procediment s'introdueixen les cèl·lules a la incubadora.

4.4.5 Dia 5 (04-09-2014)

Objectiu: aplicar la quarta dosi de 5-FU (4h) i obtenció de resultats.

Temps total: 7 hores

Passos seguits:

1. **Preparació de les dilucions de 5FU:** es preparen les dilucions seguint el mateix procediment que al dia 2.
2. **Aplicació de les diferents dosis de 5-FU:** s'apliquen les dosis de 5-FU a la columna 4 h seguint el mateix mètode que el dia 2. Hora d'aplicació a les cèl·lules A549: 09:06. Hora d'aplicació a les cèl·lules CACO-2: 09:30. Un cop acabat el procediment s'introdueixen les cèl·lules a la incubadora durant quatre hores.
3. **Preparació de la solució de MTT:** es preparen 16,5 ml en total de la solució, 15 ml dels quals seran medi i es 1,5 ml restants MTT.
4. **Aplicació del MTT:** un cop les cèl·lules han passat quatre hores a la incubadora, s'absorbeix el medi amb 5-FU i el medi del control vehicle i s'apliquen 100 μ L de la solució de MTT a cada pou. Un cop s'ha acabat, es posen les cèl·lules a la incubadora durant 3 hores. Un cop transcorregut aquest temps s'extreu el medi amb MTT. Es pot veure com al fons de cada pou ha precipitat una sal de color marró. A continuació, s'apliquen 100 μ L de DMSO a cada pou per tal de dissoldre la sal de formazan. Un cop aplicat el DMSO es pot observar el to lila de la sal dissolta. Finalment, es posen les plaques a l'agitador durant 5 minuts.

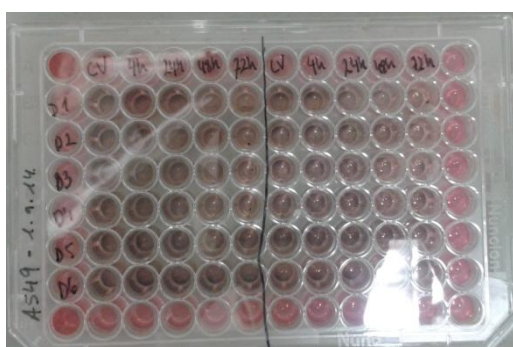


Figura 20: cèl·lules amb la dissolució de MTT

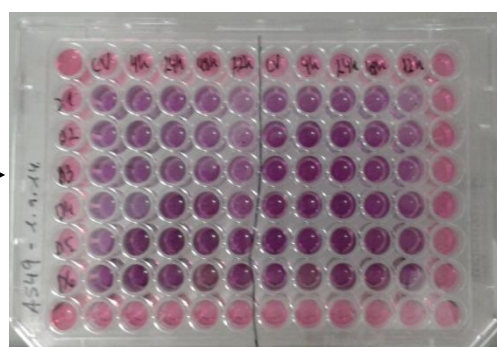


Figura 21: cèl·lules després d'aplicar el DMSO

5. **Obtenció dels resultats amb l'espectrofotòmetre** (programa utilitzat: KC Junior).

4.5 Resultats obtinguts (cèl·lules A549)

Els resultats obtinguts amb l'espectrofotòmetre van ser els següents per a les cèl·lules A549:

Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi
Medi	0,765	0,718	0,756	0,594	0,321	0,678	0,721	0,766	0,638	0,33	Medi
Medi	0,733	0,896	0,917	0,662	0,356	0,737	0,912	0,857	0,621	0,371	Medi
Medi	0,751	1,171	1,064	0,801	0,449	0,817	0,798	0,839	0,622	0,447	Medi
Medi	0,925	1,294	1,265	0,968	0,562	0,757	0,909	0,99	0,695	0,653	Medi
Medi	0,846	1,449	1,405	1,246	0,88	1,045	0,963	0,941	0,701	0,6	Medi
Medi	0,893	1,343	1,267	0,68	1,131	0,83	0,624	0,879	0,781	0,832	Medi
Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi

Per tal de calcular la viabilitat de les cèl·lules i l'efecte del 5-FU, s'ordenen els resultats i es calcula la mitjana i la desviació estàndard. S'obté el següent:

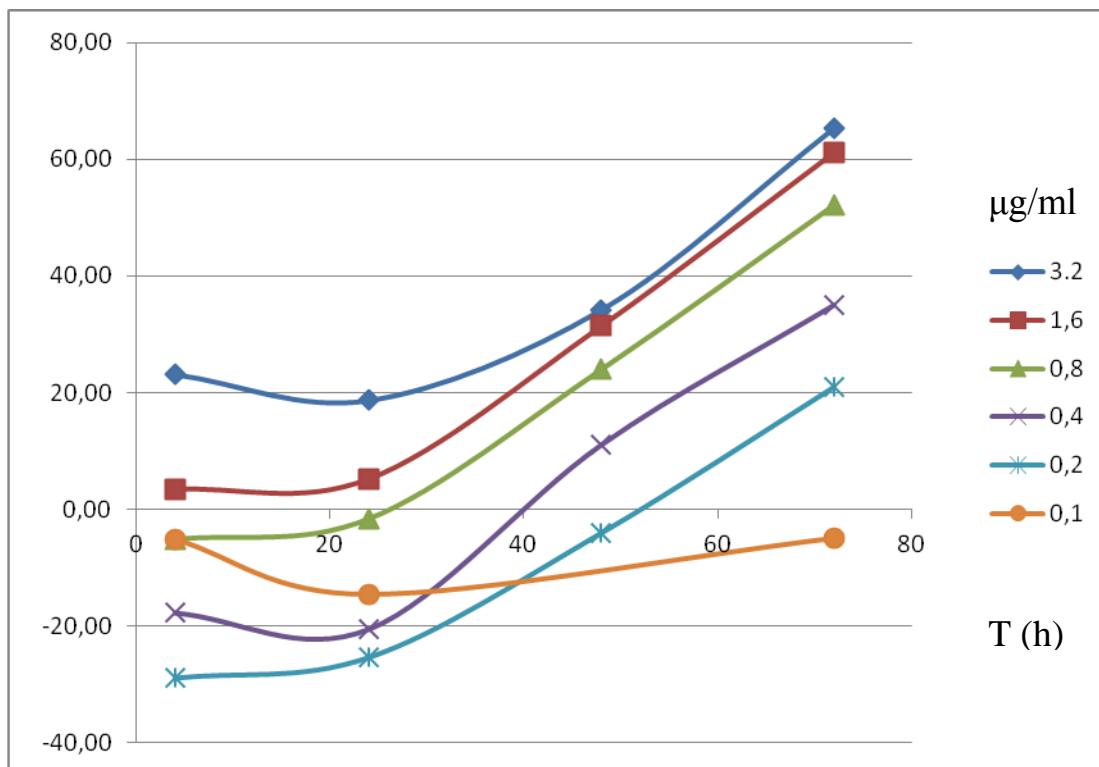
CV		µg/ml	4		24		48		72	
M.	D.E		M.	D.E	M.	D.E	M.	D.E	M.	D.E
0,936	0,10	3,2	0,720	0,00	0,761	0,01	0,6	0,03	0,326	0,01
		1,6	0,904	0,01	0,887	0,04	0,642	0,03	0,364	0,01
		0,8	0,985	0,26	0,952	0,16	0,712	0,13	0,448	0,00
		0,4	1,102	0,27	1,128	0,19	0,832	0,19	0,608	0,06
		0,2	1,206	0,34	1,173	0,33	0,974	0,39	0,740	0,08
		0,1	0,984	0,51	1,073	0,27	0,731	0,07	0,982	0,21

A partir de la mitjana i la desviació estàndard es pot calcular la viabilitat de les cèl·lules ($M \cdot 100 / M(CV)$) i l'efecte del 5-FU ($(1 - (M / M(CV))) \cdot 100$). Els resultats són els següents (expressats en %):

	4		24		48		72	
	Viabilitat	Efecte	Viabilitat	Efecte	Viabilitat	Efecte	Viabilitat	Efecte
3,2	76,87	23,13	81,30	18,70	65,81	34,19	34,78	65,22
1,6	96,58	3,42	94,76	5,24	68,54	31,46	38,84	61,16
0,8	105,18	-5,18	101,66	-1,66	76,01	23,99	47,86	52,14
0,4	117,68	-17,68	120,46	-20,46	88,84	11,16	64,90	35,10
0,2	128,85	-28,85	125,32	-25,32	104,01	-4,01	79,06	20,94
0,1	105,07	-5,07	114,64	-14,61	78,04	21,96	104,86	-4,86

A partir d'aquests resultats podem fer aquest gràfic sobre l'efectivitat del 5-FU en cèl·lules A549:

Efectivitat %



4.6 Resultats obtinguts (cèl·lules CACO-2)

Els resultats obtinguts per l'espectrofotòmetre van ser els següents per a les cèl·lules CACO-2:

Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi
Medi	0,109	0,168	0,126	0,128	0,051	0,103	0,144	0,103	0,16	0,072	Medi
Medi	0,126	0,246	0,123	0,143	0,074	0,1	0,143	0,119	0,171	0,081	Medi
Medi	0,066	0,197	0,146	0,182	0,115	0,101	0,15	0,2	0,215	0,108	Medi
Medi	0,082	0,235	0,193	0,225	0,108	0,115	0,187	0,154	0,219	0,143	Medi
Medi	0,081	0,278	0,193	0,218	0,195	0,088	0,19	0,192	0,165	0,125	Medi
Medi	0,098	0,3	0,232	0,285	0,178	0,099	0,213	0,233	0,278	0,152	Medi
Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi	Medi

Per tal de calcular la viabilitat de les cèl·lules i l'efecte del 5-FU, s'ordenen els resultats i es calcula la mitjana i la desviació estàndard. S'obté el següent:

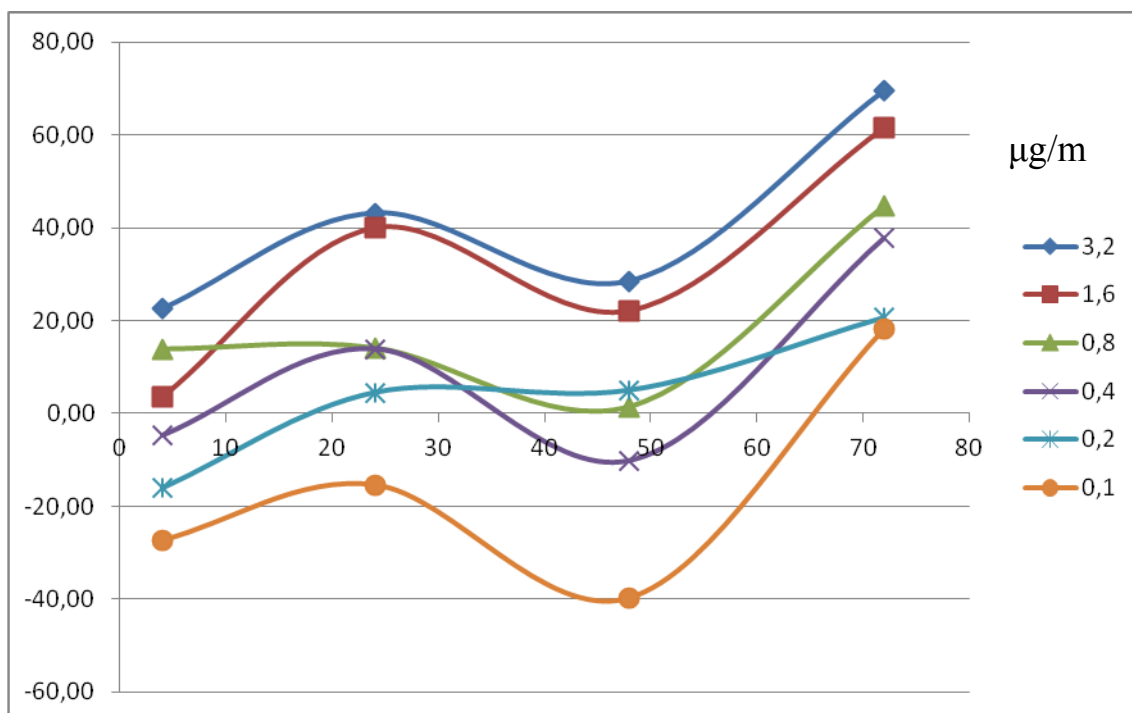
CV		µg/ml	4		24		48		72	
M.	D.E		M.	D.E	M.	D.E	M.	D.E	M.	D.E
0,2015	0,05	3,2	0,156	0,02	0,115	0,02	0,144	0,02	0,062	0,01
		1,6	0,195	0,07	0,121	0,02	0,157	0,02	0,078	0,00
		0,8	0,174	0,03	0,173	0,02	0,199	0,02	0,112	0,00
		0,4	0,211	0,03	0,174	0,00	0,222	0,00	0,126	0,02
		0,2	0,234	0,06	0,193	0,04	0,192	0,04	0,160	0,00
		0,1	0,257	0,06	0,233	0,00	0,282	0,00	0,165	0,02

A partir de la mitjana i la desviació estàndard es pot calcular la viabilitat de les cèl·lules ($M \cdot 100 / M(CV)$) i l'efecte del 5-FU ($(1 - (M / M(CV))) \cdot 100$). Els resultats són els següents:

	4		24		48		72	
	Viabilitat	Efecte	Viabilitat	Efecte	Viabilitat	Efecte	Viabilitat	Efecte
3,2	77,42	22,58	56,82	43,18	71,46	28,54	30,52	69,48
1,6	96,53	3,47	60,05	39,95	77,92	22,08	38,46	61,54
0,8	86,10	13,90	85,86	14,14	98,51	1,49	55,33	44,67
0,4	104,71	-4,71	86,10	13,90	110,17	-10,17	62,28	37,72
0,2	116,13	-16,13	95,53	4,47	95,04	4,96	79,40	20,60
0,1	127,30	-27,30	115,38	-15,38	139,70	-39,70	81,89	18,11

A partir d'aquests resultats podem fer aquest gràfic sobre l'efectivitat del 5-FU en cèl·lules CACO-2:

Efectivitat %



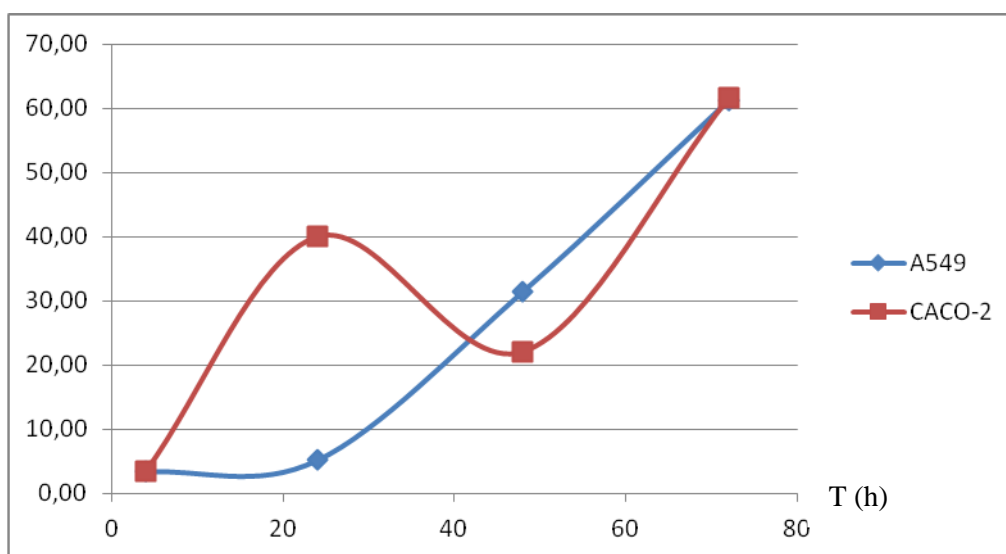
5. Conclusions

Les conclusions a les que he arribat observant els resultats són les següents:

- **Les cèl·lules CACO-2 són més sensibles al fàrmac durant les primeres hores d'exposició (24 h) que les cèl·lules A549**, però en un període d'exposició llarg (72 h), s'arriba a la mateixa efectivitat. Això podria ser degut a diferents mecanismes de reparació de l'ADN entre els dos tipus de cèl·lules.

Això es pot observar al següent gràfic, en el que es compara l'efecte de la dosi 1,6 µg/ml en les dues línies cel·lulars.

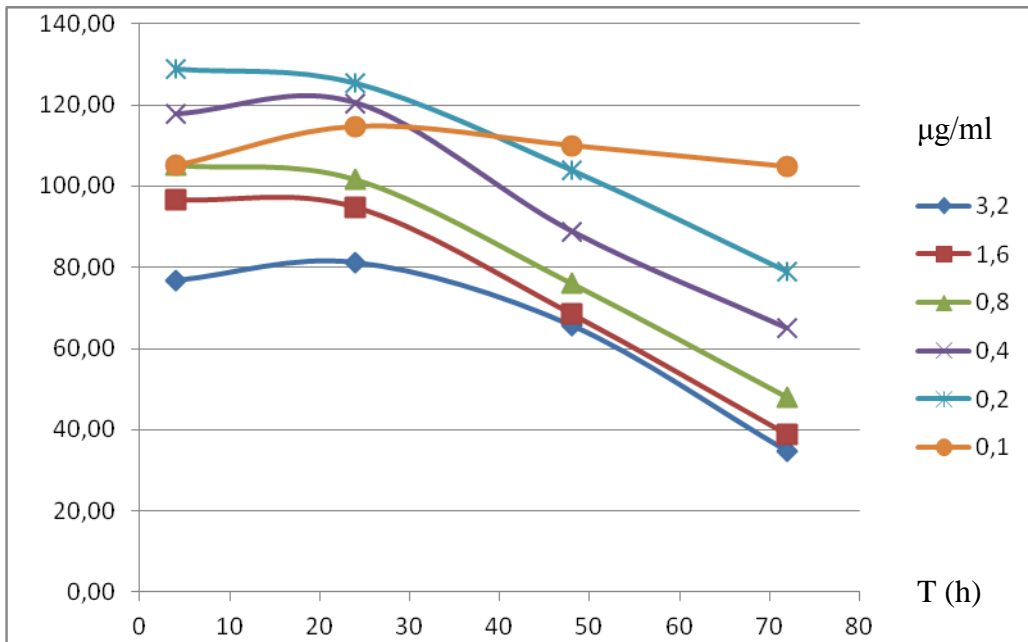
Efectivitat %



- **El control vehicle presenta uns nivells molt baixos de viabilitat degut al fet que va estar exposat a DMSO** (substància tòxica per les cèl·lules) durant 72 hores. Aquest és el motiu pel qual ens trobem amb resultats negatius per les dosis inferiors a 1,6 µg/ml.
- **El 5-Fluorouracil afecta al cicle cel·lular**. Quant més temps d'exposició i major dosi del fàrmac, els cultius presenten una viabilitat menor, tal i com es pot observar als gràfics següents.

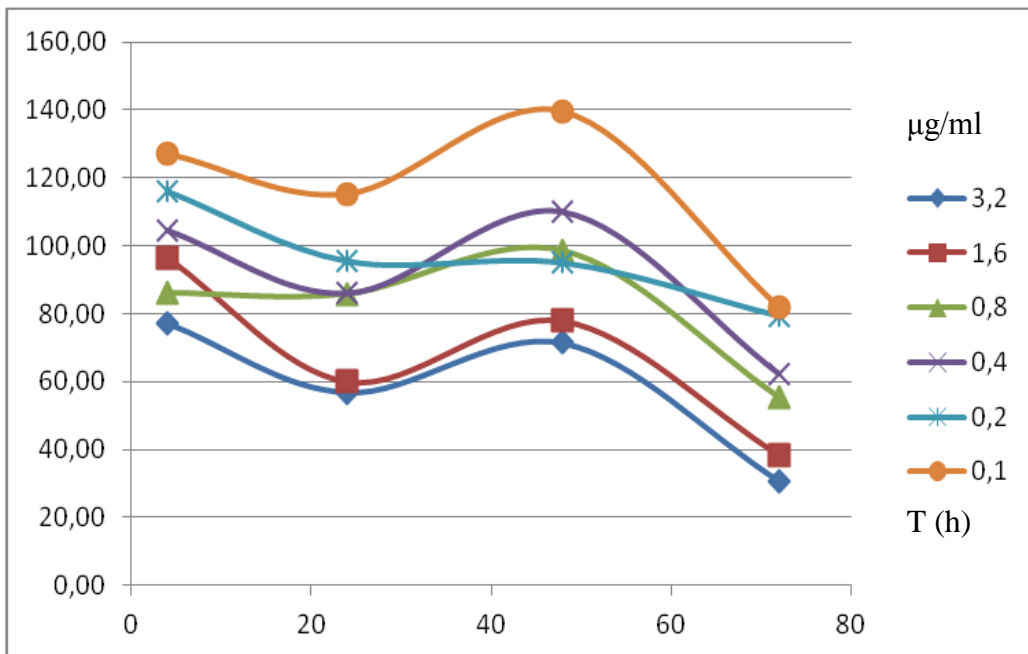
A549

Viabilitat %



CACO-2

Viabilitat %



- **Les cèl·lules CACO-2 presenten la major viabilitat després de 48 hores d'exposició al fàrmac.** No he pogut trobar una explicació a aquest fenomen i, per tant, s'hauria de repetir l'experiment per saber si s'ha produït algun error.
- **La dosi més efectiva és la més alta,** és a dir, la de 3,2 µg/ml, tot i que amb la dosi 1,6 µg/ml s'arriba a uns resultats similars.
- **El període d'exposició que presenta una viabilitat menor és el de 72 h.**

A partir d'aquestes conclusions se'n poden extreure d'altres més generals.

- Amb un mateix fàrmac es poden obtenir resultats molt diferents.
- Cada tipus de cèl·lula cancerígena és diferent a les altres.

Per tant:

- Cada càncer és diferent dels altres i, per tant, s'hauria de fer un tractament personalitzat per a cada un d'ells.
- Cada persona té reaccions diferents davant d'un mateix tractament. Encara que dues persones presentin un mateix tipus de càncer, les seves reaccions davant d'un mateix tractament poden diferir molt les unes de les altres.
- El futur del tractament del càncer està basat en un estudi personalitzat de cada cas per tal de saber quin és el tractament més eficaç.

6. Annex

6.1 La cèl·lula

La cèl·lula és l'element més simple amb vida pròpia que forma els teixits organitzats. En els teixits sans, les cèl·lules creixen i es reproduïxen només quan l'organisme ho necessita. A més, aquestes estan ben diferenciades per tal de poder realitzar diferents funcions dins l'organisme. Per exemple, el sistema nerviós està format per neurones, mentre que el sistema immunològic està format per limfòcits (entre altres).

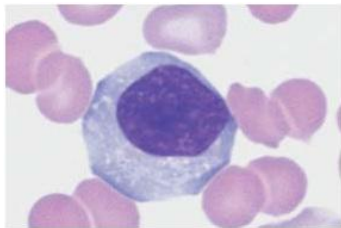


Figura 22: limfòcit

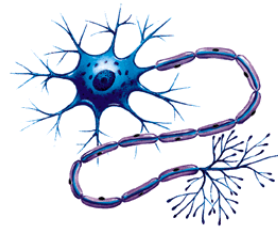


Figura 23: neurona

Tot i que aquestes cèl·lules presenten un aspecte molt diferent entre elles, contenen la mateixa informació genètica a l'ADN (sempre i quan pertanyin al mateix organisme). El motiu per el qual són tan diferents i duen a terme funcions tan diverses és perquè durant el procés d'especialització, s'activen uns gens o uns altres.

6.2 El cicle cel·lular

El cicle cel·lular és una complexa seqüència d'esdeveniments pels quals les cèl·lules creixen i es divideixen. Aquest cicle comprèn el període de temps que va des de que es forma la cèl·lula fins que aquesta es divideix i en genera de noves. A les cèl·lules eucariotes, aquest procés consta de dues etapes: la interfase i la fase de divisió (també anomenada fase M).

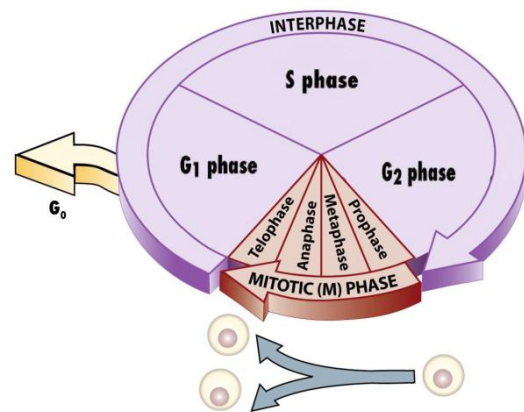


Figura 24: esquema del cicle cel·lular

La interfase és una etapa de llarga durada. Les cèl·lules passen la major part de la seva vida en aquesta fase (entre el 90% i el 95% de la seva vida), ja que és en aquesta etapa que la cèl·lula es prepara per a la divisió. Durant la interfase la cèl·lula duplica el seu

citoplasma i sintetitza ADN (es produeix la replicació de l'ADN). La interfase consta de tres fases diferenciades:

- Fase G₁: en aquesta fase es produeix la síntesi d'ARN missatger i, en conseqüència, la síntesi de proteïnes. La cèl·lula presenta un sol centrosoma⁸ amb dos centríols (en les cèl·lules dels animals, les algues i els protozous). La durada d'aquesta fase, a diferència de les altres, varia segons el tipus de cèl·lula. D'aquesta fase depèn la durada total del cicle cel·lular. Al final d'aquesta fase hi ha un punt de no retorn, anomenat punt de control G₁, punt de restricció o punt R, a partir del qual és impossible que impedingui que succeeixin les següents fases. En algunes cèl·lules, abans d'arribar a aquest punt, es manifesten alguns gens concrets. D'aquesta manera es tornen cèl·lules especialitzades del teixit que determinen. Aquest procés és anomenat diferenciació cel·lular o especialització. Així poden quedar durant un temps indefinit sense assolir el punt R. Llavors, es diu que la cèl·lula ha entrat en fase G₀. Posteriorment, sota l'efecte d'activadors mitòtics, poden tornar a la fase G₁ i assolir el punt R. En els casos de cèl·lules molt especialitzades, com podrien ser les neurones o les cèl·lules musculars esquelètiques, aquestes queden detingudes en aquesta fase, per la qual cosa mai arriben a assolir les altres fases i no es poden dividir.
- Fase S: en aquesta fase es produeix la replicació de l'ADN per tal que, quan es produeixi la mitosi, les dues cèl·lules filles tinguin la mateixa quantitat d'ADN que la cèl·lula original. És per aquest motiu que posteriorment, quan es condensa el material genètic en forma de cromosomes, aquests constaran de dues cromàtides unides per un centròmer. Durant aquesta fase també es produeix la síntesi d'ARN missatger i de proteïnes, majoritàriament histones⁹. A més, juntament amb cada centríol es forma un "esbós" de centríol anomenat procentríol.
- Fase G₂: s'inicia quan s'acaba la síntesi d'ADN i finalitza en el moment en què es poden distingir els cromosomes. En aquesta fase la cèl·lula conté el doble

⁸ El centrosoma (també anomenat citocentre o centre cel·lular) és un orgànul que es troba al citoplasma, proper al nucli, i que conté el centre organitzador de microtúbuls (COM). Es considera el centre dinàmic de la cèl·lula, ja que els microtúbuls que parteixen d'ell intervien tant en els moviments interns de la cèl·lula (per exemple, en moviment dels cromosomes durant la mitosi) com en els externs (constitueixen els cilis i els flagels).

⁹ Les histones són proteïnes amb una funció estructural. Interven en la condensació de l'ADN i constitueixen un punt de suport per al seu empaquetament.

d'ADN que a la fase G₁. Continua la síntesi d'ARN missatger i de proteïnes, sobretot de la histona H1 i de les proteïnes que formaran els microtúbuls del fus mitòtic (actina, tubulina, proteïnes filamentoses...). Al final de la fase G₂ la cèl·lula conté dos diplosomes¹⁰ immadurs.

Durant la fase M (i durant la citocinesi) el contingut de la cèl·lula en divisió es distribueix de manera equitativa entre dues cèl·lules filles. La fase M comprèn la divisió del nucli, també anomenada mitosi o cariocinesi, i la divisió del citoplasma (la citocinesi).

La mitosi és un tipus de divisió cel·lular pel qual es generen, a partir d'una cèl·lula mare, dues cèl·lules filles amb la mateixa informació genètica. Per tant, en els éssers diploides, es pot definir com el procés mitjançant el qual d'una cèl·lula amb $2n$ cromosomes se n'obtenen dues cèl·lules amb $2n$ cromosomes (n és el nombre de tipus diferents de cromosomes).

La mitosi es divideix en quatre fases:

- **Profase:** s'inicia quan es comencen a visualitzar els cromosomes. El cromosoma profàsic està format per dues cromàtides unides a l'altura del centròmer. A causa de la condensació del material genètic es produeix la desaparició del nuclèol¹¹. Els dos diplosomes immadurs es troben envoltats d'un material proteic anomenat material pericentriolar, a partir del qual es formen microtúbuls que es disposen radialment i formen les fibres de l'àster. Els dos àsters constitueixen unes fibres entre si anomenades fibres polars, les quals s'allarguen. Això produeix la separació dels dos àsters, que finalment se situen en els pols oposats de la cèl·lula. Les fibres polars formen el fus mitòtic. Els procentríols que formen els diplosomes immadurs s'allarguen fins a formar cadascun un nou centríol. Al final de la profase, el nucli s'infla a causa de l'entrada d'aigua. Això provoca la fragmentació de l'embolcall nuclear i la dispersió del material genètic

¹⁰ Un diplosoma és un conjunt format per dos centríols col·locats perpendicularment entre sí. Durant la profase, està constituït per un centríol i un procentríol.

¹¹ El nuclèol és una estructura esfèrica sense membrana que es troba al nucli de les cèl·lules en interfase. Està constituït bàsicament per ARN nucleolar (ARN_n) i proteïnes. La funció principal del nuclèol és fabricar ARN_n, que després dóna lloc als diferents tipus de ARN ribosòmic (ARN_r), imprescindible per a la formació de ribosomes. Aquest ARN_n s'origina a partir de diferents segments d'ADN (els organitzadors nucleolars). L'ARN_n s'associa a proteïnes ribosòmiques procedents del citoplasma. Es distingeixen dues zones al nuclèol: la zona fibril·lar, constituïda per ARN_n, i la zona granular, constituïda per ARN_r associat a proteïnes.

(els cromosomes) al citoplasma. En els cromosomes es comença a formar, a l'altura del centròmer i a les dues cromàtides, el cinetocor. Aquest actua com a centre organitzador de microtúbuls. A partir del cinetocor parteixen els microtúbuls cinetocòrics, que se superposen al fus mitòtic i permeten la orientació de les cromàtides, cadascuna de les quals queda orientada cap a un dels dos pols.

- **Metafase:** a causa de l'allargament dels microtúbuls cinetocòrics els cromosomes se situen a la placa equatorial, és a dir, els cromosomes queden equidistants als dos diplosomes. Durant la metafase els cromosomes presenten un grau d'empaquetament més alt que a la profase.
- **Anafase:** s'inicia amb la separació de les dues cromàtides germanes que constitueixen els cromosomes. En aquest moment, una sola cromàtide forma un cromosoma (cromosoma anafàsic). Els cromosomes anafàsics es desplacen cap als pols a causa de l'escurçament dels microtúbuls cinetocòrics i es produeix l'allargament del fus mitòtic. Al final de l'anafase es produeix l'arribada dels cromosomes als pols del fus mitòtic i la desaparició dels cinetocors.
- **Telofase:** comença quan les dues dotacions cromosòmiques s'agrupen en dues masses situades als pols del fus mitòtic, i acaba quan aquestes queden envoltades per un nucli (formació dels dos nuclis fills). Els dos nuclis fills es formen a partir dels sàculs del reticle endoplasmàtic i de les restes de l'embolcall nuclear de la cèl·lula mare. Quan s'han format els dos nuclis, els cromosomes de l'interior es desespiralitzen, la qual cosa permet la transcripció i la formació de nuclèols. Progressivament, el nucli telofàsic es fa més semblant a l'interfàsic. La citocinesi (divisió del citoplasma) es produeix simultàniament a la telofase.

No totes les cèl·lules es divideixen per mitosi. Els organismes amb reproducció sexual presenten un altre tipus de divisió en algunes de les seves cèl·lules, la meiosi. Aquest tipus de divisió cel·lular només té lloc per a la producció de les cèl·lules sexuals, els gàmetes. La meiosi és el tipus de divisió cel·lular pel qual, a partir d'una sola cèl·lula mare, se n'obtenen quatre de filles amb la meitat de cromosomes. Comprèn dues divisions successives, la primera divisió meiótica (meiosi I), i la segona divisió meiótica (meiosi II). La primera divisió és reduccional (les cèl·lules obtingudes tenen la meitat de cromosomes que la cèl·lula mare), mentre que la segona divisió és equacional (les cèl·lules resultants tenen el mateix nombre de cromosomes que la cèl·lula mare). És per

aquest motiu que els gàmetes són haploides. Quan un gàmeta masculí i un femení s'uneixen durant la fertilització, formen el zigot, una cèl·lula diploide a partir de la qual es formaran totes les altres del nou organisme.

Un cop la cèl·lula completa el cicle cel·lular, torna a la fase G_1 i repeteix el cicle de nou, a no ser que entri en fase G_0 . En aquest cas, la cèl·lula deixarà de dividir-se i s'activaran determinats gens, produint-se l'especialització.

El temps que necessita una cèl·lula per completar un cicle cel·lular varia depenent del tipus de cèl·lula que es tracti. Algunes cèl·lules, com podrien ser les cèl·lules sanguínies de la medul·la òssia, les cèl·lules de la pell i les cèl·lules de l'estómac i els intestins, es divideixen ràpida i constantment. Altres cèl·lules només es divideixen quan han de reemplaçar les cèl·lules mortes o malmeses (per exemple, les cèl·lules dels ronyons, el fetge o els pulmons). Altres cèl·lules paren de dividir-se un cop són madures (per exemple, les neurones).

6.3 Factors de risc del càncer de pulmó

Es coneixen diversos factors de risc en el desenvolupament d'aquesta malaltia:

- Consum de tabac: entre el 80-90% dels càncers de pulmó es donen en persones fumadores, o en persones que hagin deixat de fumar recentment. Els fumadors tenen un risc de 10 a 20 vegades major de desenvolupar càncer de pulmó que els no fumadors. Els fumadors passius també tenen una major probabilitat de desenvolupar aquest càncer. Alguns dels agents cancerígens del tabac són els hidrocarburs aromàtics policíclics. Deixar de fumar disminueix les probabilitats de desenvolupar càncer de pulmó, de manera que al cap de cap d'uns 15 anys de deixar de consumir-ne, s'aproximen a les d'un no fumador
- Determinades ocupacions laborals: els llocs de treball que impliquen una exposició a determinades substàncies (per exemple, l'amiant, el petroli i els seus derivats, el níquel i el radó) presenten una major incidència del càncer de pulmó. Algunes d'aquestes ocupacions laborals són la mineria i la indústria tèxtil.
- Edat: com en la majoria de tumors, el risc de desenvolupar càncer de pulmó augmenta amb l'edat.

- Sexe: els homes tenen una taxa de càncer de pulmó tres vegades major que les dones. Això és degut a que la població femenina es va iniciar en l'hàbit de fumar uns 40 anys més tard que els homes.
- Factors genètics: el risc de desenvolupar càncer de pulmó es multiplica per quatre si hi ha antecedents familiars amb la malaltia.
- Determinades malalties: els pacients diagnosticats amb MPOC (malaltia pulmonar obstructiva crònica) presenten un major risc de desenvolupar aquest càncer. També es relaciona amb la fibrosi pulmonar.

6.4 Tipus de càncers de pulmó

Es distingeixen dos tipus principals de càncer de pulmó, els carcinomes microcítics (també anomenats carcinomes de cèl·lules petites) i els carcinomes no microcítics. Els carcinomes microcítics suposen aproximadament un 20% de tots els càncers de pulmó. Sovintment, es localitzen a la zona central dels pulmons. Poden comprimir vasos sanguinis i òrgans localitzats en aquesta zona (per exemple, la vena cava). Es caracteritzen per la seva alta agressivitat i una alta taxa de creixement.

Els carcinomes no microcítics representen el 80% restant dels càncers de pulmó. Hi ha tres subtipus principals:

- Carcinoma epidermoide: és la varietat de càncer pulmonar més freqüent al nostre país. Representa el 40% dels carcinomes no microcítics. Es caracteritza per la queratinització de les cèl·lules i l'aparició de ponts intercel·lulars. Això dona a les cèl·lules una aparença escamosa, motiu pel

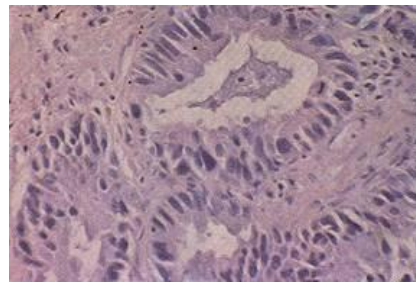


Figura 25: cèl·lules d'un carcinoma epidermoide pulmonar

qual també s'anomena carcinoma escamós. Acostuma a localitzar-se en la part central dels pulmons. Té un creixement relativament lent i produeix metàstasi amb menor freqüència que altres tipus de càncer. És la varietat de neoplàsia de pulmó amb millor resposta al tractament quirúrgic. És el tipus de càncer de pulmó més relacionat amb el consum de tabac. Presenta una major incidència en els homes.

- **Adenocarcinoma:** representa el 30% dels carcinomes no microcítics. És el menys relacionat amb el consum de tabac, però tot i això és més freqüent en fumadors. Té una major incidència en les dones, i acostuma a localitzar-se en zones perifèriques del pulmó, com per exemple la pleura¹² o la paret toràcica. S'origina a partir de les cèl·lules que formen les glàndules bronquials. L'adenocarcinoma bronquial és el tumor associat més freqüentment a lesions cicatricials pulmonars, com per exemple la tuberculosi. Està constituït per cèl·lules binucleades amb mucines (família de proteïnes d'alt pes molecular altament glucosilades produïdes pels teixits epitelials, components de la majoria de secrecions gelatinoses) en el 80% dels casos. Produeix metàstasi per via hemàtica (a través de la sang) als ossos, al cervell i al fetge.
- **Carcinoma de cèl·lules grans:** es denomina així per la mida de les cèl·lules que el formen. Representa aproximadament entre el 10 i el 20% dels carcinomes situats als bronquis. Aquest tipus de carcinoma està molt relacionat amb l'hàbit de fumar. Aquest tipus de tumors acostumen a localitzar-se en la zona central dels pulmons, i tendeixen a estar acompanyats per una gran hemorràgia i dany en el teixit. Aquests tumors tendeixen a créixer ràpidament i a produir metàstasi en les etapes inicials. Es tracta amb cirurgia, radioteràpia i quimioteràpia. Normalment, es detecta en etapes avançades fet que fa que hi hagi una supervivència del 16% al cap dels cinc anys. Quan es detecta en una fase inicial, la tasa de supervivència és de quasi un 50%, i si es detecta en etapes molt avançades és d'un 8%.

6.5 Síntomes del càncer de pulmó

Durant les fases precoces d'aquesta malaltia no es presenta cap tipus de símptoma o se'n presenten de molt inespecífics. Això fa que, generalment, el diagnòstic durant aquesta etapa sigui accidental (es a dir, es diagnostica per proves que es realitzen per descobrir altres problemes de salut).

En la majoria de casos, el càncer de pulmó es diagnostica quan els símptomes obliguen al pacient a acudir al metge, és a dir, quan el càncer ja està en una etapa avançada.

¹² La pleura és una membrana d'origen mesodèrmic que recobreix els pulmons, el mediastí, el diafragma i la part interna de la caixa toràcica. La pleura parietal és la part externa, en contacte amb la caixa toràcica, el mediastí i la cara superior del diafragma, mentre que la pleura visceral és la part interna, en contacte amb els pulmons.

Els símptomes depenen de la localització i l'extensió del tumor. Els més freqüents són:

- **Tos:** és el símptoma més freqüent. Es produeix per irritació bronquial i acostuma a estar acompanyat de expectoració.
- **Expectoració acompanyada de sang:** és el símptoma que crida més l'atenció al pacient i, generalment, és el que el fa acudir al metge.
- **Dispnea:** el pacient nota sensació de falta d'aire, que fa que progressivament pugui realitzar menys esforços físics.
- **Dolor a la zona toràcica:** el dolor es produeix quan el tumor afecta a la paret toràcica o a la pleura. És característic dels tumors situats en la zona més perifèrica dels pulmons.
- **Disfonia:** el pacient pot notar canvis en la veu. Aquest símptoma es produeix quan el tumor s'estén al mediastí i afecta al nervi encarregat del moviment de les cordes vocals.
- **Disfàgia:** el pacient té dificultats en la deglució i té la sensació de que el menjar es deté a la meitat del tòrax. Es produeix quan el tumor o els ganglis afectats comprimeixen l'esòfag.
- **Síndrome de Bernard-Horner:** es produeix quan el tumor afecta a estructures nervioses de la part més alta del tòrax. Es caracteritza per la caiguda de la parpella, tenir la pupil·la contraïda i per la falta de sudoració en la meitat de la cara corresponent al pulmó on es localitza el tumor.

En les fases avançades es presenten símptomes com la pèrdua de la gana, mal als ossos, cansament, debilitat, confusió, marejos o pèrdua de pes. Altres símptomes com mal de cap i dolor a la zona lumbar poden ser provocats per la metastasi del tumor a altres òrgans.

6.6 Tipus de càncer de còlon

Hi ha diversos tipus de càncer de còlon. El més freqüent de tots és l'adenocarcinoma. Es presenta en el 90-95% dels casos i es produeix a la mucosa que recobreix l'interior del còlon i del recte. Altres tipus de tumors que poden aparèixer al còlon són:

- **Sarcomes:** tumors originats a la capa muscular del tub digestiu.
- **Limfomes:** càncer de les cèl·lules defensives de l'estómac i l'intestí.

- **Tumors carcinoides:** càncer de les cèl·lules productores d'hormones de l'aparell digestiu.
- **Melanomes:** tumors pigmentats situats al còlon o al recte.

6.7 Creixement i metàstasi del càncer de còlon

Aquests tumors acostumen a augmentar de mida per creixement local. Es produeix al créixer en profunditat envaint totes les capes que formen la paret del tub digestiu, és a dir, creix des de la mucosa fins la serosa passant per les capes submucosa i muscular. Un cop que el tumor traspasa tota la paret de l'intestí pot envair qualsevol òrgan, proper o distant, per mitjà de :

- **Disseminació limfàtica:** el colon posseeix una gran xarxa de vasos limfàtics que permeten el drenatge de la limfa a diverses regions ganglionars. La disseminació per aquesta via es realitza de forma ordenada, afectant primer als ganglis més pròxims i després als més allunyats.
- **Disseminació hematògena:** les cèl·lules tumorals passen al torrent sanguini i, a través de la sang es disseminen a altres parts del cos, preferentment al fetge, el pulmó, als ossos i al cervell.

6.8 Síntomes del càncer de còlon

Els símptomes d'aquest tipus de càncer són:

- Presència de sang a les deposicions
- Canvi en el ritme de les deposicions
- Excrements més prims: generalment això es produeix perquè el tumor no permet el pas normal dels excrements.
- Sensació d'evacuació incompleta
- Dolor abdominal
- Restrenyiment prolongat, nàusees, vòmits i malestar general.
- Cansament extrem i pèrdua de pes sense causa aparent

Font de les imatges

Figura 1: <http://www.conganat.org/sec/marzo99/016/fig2d.jpg>

Figura 2:

<https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdepulmon/PublishingImages/Pulmon.jpg>

Figura 3: <http://coaleffects.files.wordpress.com/2011/12/lungs.png>

Figura 4:

<http://www.olympusmicro.com/galleries/fluorescence/images/a549vinculinmyosincellnuclarge.jpg>

Figura 5: <http://www.biomagnetism.se/uploads/7/1/4/3/7143249/5490930.jpeg?916>

Figura 6:

<https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdecolon/PublishingImages/Anatomia.jpg>

Figura 7: <http://www.iayork.com/Images/2009/5-26-09/Caco-cells.jpg>

Figura 8:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a9/5-Fluorouracilo.jpg/220px-5-Fluorouracilo.jpg>

Figura 9: font pròpia

Figura 10: font pròpia

Figura 11:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4d/Neubauer_improved_counting_chamber.jpg/1024px-Neubauer_improved_counting_chamber.jpg

Figura 12: font pròpia

Figura 13: <http://www.cromakit.es/img/c/45-large.jpg>

Figura 14: font pròpia

Figura 15: http://img.directindustry.es/images_di/photo-g/matraces-cultivo-celular-98133-5047813.jpg

Figura 16: https://www.pce-instruments.com/chile/slot/8/artimg/large/euromex-microscopio-invertido-oxion-inverso-475198_745632.jpg

Figura 17:

http://www.tideca.net/sites/default/files/import/tideca/Imagenes/Publicidades/sirio_-_lector.jpg

Figura 18: font pròpia

Figura 19: font pròpia

Figura 20: font pròpia

Figura 21: font pròpia

Figura 22: <http://www.studydroid.com/imageCards/06/he/card-6863258-front.jpg>

Figura 23:

<http://3.bp.blogspot.com/-CDvBrrOsogk/VBCs57F5tzI/AAAAAAAAAEg/GmQzK1hCclk/s1600/neuronaa.bmp>

Figura 24:

<http://4.bp.blogspot.com/-OaomLnHO5Yc/UT09GTSb1fI/AAAAAAAAABs/hPkz5trwKfA/s1600/114205534.png>
(tractada amb paint)

Figura 25: <http://do.areastematicas.com/graficos/image004.jpg>

Bibliografía

- EDICIONES EL MUNDO. Todo sobre el càncer [en línia] ELMundo.es <<http://www.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/basicos1.html>> [Consulta: 7 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Càncer de pulmón [en línia] Wikipedia <http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer_de_pulm%C3%B3n> [Consulta: 7 juliol 2014]
- MERCK MANUALS. Lung carcinoma [en línia] Merckmanuals.com <http://www.merckmanuals.com/professional/pulmonary_disorders/tumors_of_the_lungs/lung_carcinoma.html?qt=&sc=&alt=> [Consulta: 7 juliol 2014]
- EDICIONES EL MUNDO. Las células madre del càncer [en línia] ELMundo.es <<http://www.elmundo.es/elmundosalud/2007/03/05/oncodossiers/1173120315.html>> [Consulta: 7 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Colorrectal cancer [en línia] Wikipedia <http://en.wikipedia.org/wiki/Colorectal_cancer> [Consulta: 7 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Adenocarcinoma [en línia] Wikipedia <<http://es.wikipedia.org/wiki/Adenocarcinoma>> [Consulta: 7 juliol 2014]
- MEDLINE PLUS. Tumores benignos [en línia] <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/benigtumors.html>> [Consulta: 19 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Benign tumor [en línia] Wikipedia <http://en.wikipedia.org/wiki/Benign_tumor> [Consulta: 19 juliol 2014]
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Metastatic cancer [en línia] <<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/metastatic>> [Consulta: 19 juliol 2014]
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Understanding cancer [en línia] <<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer/page9>> [Consulta: 19 juliol 2014]
- EMORY UNIVERSITY. Las características de las células cancerosas [en línia] <<http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=55&lang=spanish>> [Consulta: 19 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Pulmones [en línia] Wikipedia <<http://es.wikipedia.org/wiki/Pulmones>> [Consulta: 19 juliol 2014]

- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Basal lamina [en línia] Wikipedia <http://en.wikipedia.org/wiki/Basal_lamina> [Consulta: 19 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. A549 cell [en línia] Wikipedia <http://en.wikipedia.org/wiki/A549_cell> [Consulta: 19 juliol 2014]
- CELL BIOLABS, INC. A549/GFP Cell line [en línia] <<http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-209-gfp-a549-cell-line.pdf>> [Consulta: 19 juliol 2014]
- MEDICINE NET. Athimic mouse definition [en línia] <<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=33852>> [Consulta: 19 juliol 2014]
- INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Diccionario del càncer [en línia] <<http://www.cancer.gov/diccionario?cdrid=46216>> [Consulta: 19 juliol 2014]
- NYU LANGONE MEDICAL CENTER. Crecimiento y desarrollo celular canceroso [en línia] <<http://www.med.nyu.edu/content?ChunkIID=126525>> [Consulta: 19 juliol 2014]
- AECC. Tipos de cánceres de pulmón [en línia] <<https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/CANCERDEPULMON/Paginas/tipos.aspx>> [Consulta: 20 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Carcinoma epidermoide pulmona [en línia] Wikipedia <http://es.wikipedia.org/wiki/Carcinoma_epidermoide_pulmonar> [Consulta: 20 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Adenocarcinoma of the lung [en línia] Wikipedia <http://en.wikipedia.org/wiki/Adenocarcinoma_of_the_lung> [Consulta: 20 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Adenocarcinoma pulmonar [en línia] Wikipedia <http://es.wikipedia.org/wiki/Adenocarcinoma_pulmonar> [Consulta: 20 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Pleura [en línia] Wikipedia <<http://es.wikipedia.org/wiki/Pleura>> [Consulta: 20 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Mucin [en línia] Wikipedia <<http://en.wikipedia.org/wiki/Mucin>> [Consulta: 20 juliol 2014]
- HARVARD HEALTH PUBLICATIONS. Carcinoma pulmonar de células grandes [en línia] <<http://www.vidaysalud.com/salud-de-a-a-z/enfermedades-y->

[condiciones/carcinoma-pulmonar-de-celulas-grandes/](#)>

[Consulta: 20 juliol 2014]

- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Còlon [en línia] Wikipedia <<http://ca.wikipedia.org/wiki/C%C3%B2lon>> [Consulta: 22 juliol 2014]
- INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Cáncer de colon: Tratamiento [en línia] <<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/colon/Patient/page1>> [Consulta: 22 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Large intestine [en línia] Wikipedia <[http://en.wikipedia.org/wiki/Colon_\(anatomy\)#Structure](http://en.wikipedia.org/wiki/Colon_(anatomy)#Structure)> [Consulta: 22 juliol 2014]
- AECC. Anatomía del colon o intestino grueso [en línia] <<https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdecolon/Paginas/anatomia.aspx>> [Consulta: 22 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Serosa [en línia] Wikipedia <<http://es.wikipedia.org/wiki/Serosa>> [Consulta: 22 juliol 2014]
- AECC. ¿Qué es el cáncer de colon [en línia] <<https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdecolon/Paginas/quees.aspx>> [Consulta: 22 juliol 2014]
- AECC. Incidencia del cáncer de colon [en línia] <<https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdecolon/Paginas/incidencia.aspx>> [Consulta: 22 juliol 2014]
- SEOM. Cáncer de colon y recto [en línia] <<http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/digestivo/colon-recto?start=6>> [Consulta: 22 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Melanoma [en línia] Wikipedia <<http://es.wikipedia.org/wiki/Melanoma>> [Consulta: 22 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Caco-2 [en línia] Wikipedia <<http://en.wikipedia.org/wiki/Caco-2>> [Consulta: 22 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Cytotoxicity [en línia] Wikipedia <<http://en.wikipedia.org/wiki/Cytotoxicity>> [Consulta: 23 juliol 2014]
- GENERAL PUBLIC LICENSE. Agentes citotóxicos [en línia] <<http://prevention.dlinkddns.com/2-higiene-industrial/2-3-agentes-quimicos/agentes-citotoxicos.html>> [Consulta: 23 juliol 2014]

- AMERICAN CANCER SOCIETY. Fluorouracil (5-FU) [en línia] <<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/guidetocancerdrugs/fluorouracil>> [Consulta: 23 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. 5-Fluorouracilo [en línia] Wikipedia <<http://es.wikipedia.org/wiki/5-fluorouracilo>> [Consulta: 23 juliol 2014]
- ABOUT EDUCATION. The cell cycle of growth and replication [en línia] <<http://biology.about.com/od/celldivision/ss/cell-cycle.htm>> [Consulta: 24 juliol 2014]
- A. GIMENO i L. UGEDO. *Biología 1 Batxillerat*. Barcelona: Santillana, 2008.
- FIBAO. Histona [en línia] <<http://medmol.es/glosario/19/>> [Consulta: 24 juliol 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Nucleolus [en línia] Wikipedia <<http://en.wikipedia.org/wiki/Nucleolus>> [Consulta: 11 agost 2014]
- AECC. Anatomía de los pulmones [en línia] <<https://www.aecc.es/sobreelcancer/cancerporlocalizacion/cancerdepulmon/Paginas/anatomia.aspx>> [Consulta: 11 agost 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. HEPA [en línia] Wikipedia <<http://es.wikipedia.org/wiki/HEPA>> [Consulta: 16 setembre 2014]
- CULTEK. Aplicación flujo laminar [en línia] <http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Flujo_Laminar&opc=tecnicas&idap=68> [Consulta: 16 setembre 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Centrifugadora [en línia] Wikipedia <<http://es.wikipedia.org/wiki/Centrifugadora>> [Consulta: 16 setembre 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Cámara de Neubauer [en línia] Wikipedia <http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1mara_de_Neubauer> [Consulta: 16 setembre 2014]
- <<http://instrumentosdelaboratorio.org/pipeta>> [Consulta: 21 setembre 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Micropipeta [en línia] Wikipedia <<http://es.wikipedia.org/wiki/Micropipeta>> [Consulta: 21 setembre 2014]
- VWR INTERNATIONAL. Frascos para cultivo celular [en línia] <https://es.vwr.com/app/catalog/Product?article_number=734-0010> [Consulta: 21 setembre 2014]

- CIENTIFICA SENNA S.A. Frascos para cultivo celular [en línea]
<<http://www.cientificasenna.com/index.php?modulo=catalogo&accion=articulo&id=980>> [Consulta: 21 setembre 2014]
- CULTEK. Aplicación cultivos celulares [en línea]
<http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Cultivos_Celulares&opc=productosdestacados&idap=123> [Consulta: 21 setembre 2014]
- PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. Microscopio invertido [en línea]
<<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/minvertido.htm>> [Consulta: 21 setembre 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Microscopio invertido [en línea] Wikipedia
<http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_invertido>
[Consulta: 21 setembre 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Tripsina [en línea] Wikipedia
<<http://es.wikipedia.org/wiki/Tripsina>> [Consulta: 18 octubre 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Dimetilsulfóxido [en línea] Wikipedia
<<http://es.wikipedia.org/wiki/Dimetilsulf%C3%B3xido>>
[Consulta: 18 octubre 2014]
- WIKIMEDIA FOUNDATION INC. Lector de placas [en línea] Wikipedia
<http://es.wikipedia.org/wiki/Lector_de_placas> [Consulta: 11 diciembre 2014]