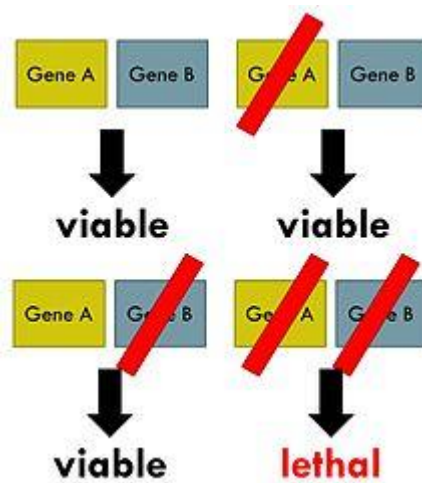
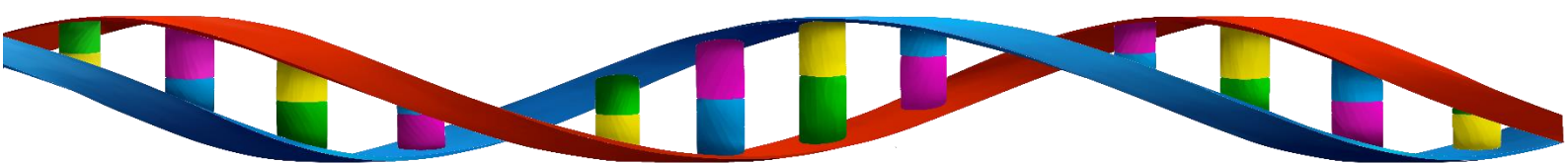


ESTRÈS REPLICATIU DERIVAT DE LA INHIBICIÓ DE LES PROTEÏNES TLK1, TLK2 I PARP, I DE LA MUTACIÓ DE BRCA1 PER A TRACTAR EL CÀNCER DE MAMA



Ramón y Cajal

Curs 2018-2019



ÍNDEX

	Pàgina
1. INTRODUCCIÓ	7
1.1. Justificació del tema escollit	7
1.2. Procés de concreció del treball	7
1.3. Hipòtesi i objectius plantejats	8
1.4. Descripció de la metodologia emprada	9
2. MARC TEÒRIC	10
2.1. El càncer de mama	11
2.1.1. La malaltia	14
2.1.1.1. Local	15
2.1.1.2. Sistèmica	15
2.1.2. Tractaments	16
2.1.2.1. Quimioteràpia	16
2.1.2.2. Radioteràpia	16
2.1.2.3. Intervenció quirúrgica.....	17
2.1.2.4. Teràpia diana	17
2.2. Les “Tousled-like Kinases” (TLK)	17
2.2.1. Les cinases	18
2.2.2. Funció de les TLK	18
2.2.3. Vies de senyalització cel·lular on estan implicades	19
2.2.4. siRNA per silenciar les TLK	21
2.3. Les PARP	22
2.3.1. Funció de les PARP	22
2.3.2. Inhibidors de les PARP: olaparib	23
2.4. Les BRCA	23
2.4.1. BRCA1	24
2.4.2. BRCA2	25
2.4.3. Mutacions en les BRCA i càncer	25
2.5. El DNA	26
2.5.1. Replicació	27
2.5.2. Transcripció	28
2.5.3. Dany en el DNA	29
2.6. L'estrès replicatiu	30
2.6.1. Descripció de l'estrès replicatiu	30
2.6.2. Causes de l'estrès replicatiu	30
2.6.3. Conseqüències de l'estrès replicatiu	32
2.6.4. L'estrès replicatiu com a diana per tractar el càncer	33

3. TREBALL DE CAMP	34
3.1. Objectius	34
3.2. Plantejament del treball	34
3.2.1. Problema a investigar	35
3.2.2. Hipòtesi	35
3.2.3. Disseny experimental	36
3.2.4. Resultats i anàlisi dels resultats.....	38
3.3. Material i mètodes	42
4. CONCLUSIONS	48
5. DISCUSSIÓ	49
6. VALORACIÓ CRÍTICA	51
7. BIBLIOGRAFIA	52
AGRAÏMENTS	55
ANNEXOS	
ANNEX 1: AMPLIACIÓ DE CONCEPTES DEL CÀNCER	57
ANNEX 2: MECANISME DE FUNCIONAMENT DELS SIRNA PER SILENCIAR LES TLK	62
ANNEX 3: EL DNA	63
ANNEX 4: LA REPARACIÓ DEL DNA (DDR PATHWAY).....	66
ANNEX 5: CÈL·LULES EN EL LABORATORI.....	69
ANNEX 6: MATERIAL I MÈTODES	75
ANNEX 7: INFORMACIÓ SOBRE ELS INVESTIGADORS CONSULTATS	84
ANNEX 8: RESUM DE LES REUNIONS CELEBRADES AMB ELS INVESTIGADORS CONSULTATS	91

ÍNDIX DE FIGURES

	Pàgina
Figura 1.....	11
Figura 2.....	14
Figura 3.....	15
Figura 4.....	16
Figura 5.....	18
Figura 6.....	19
Figura 7.....	21
Figura 8.....	21
Figura 9.....	23
Figura 10.....	24
Figura 11.....	26
Figura 12.....	26
Figura 13.....	28
Figura 14.....	28
Figura 15.....	29
Figura 16.....	31
Figura 17.....	31
Figura 18.....	32
Figura 19.....	32
Figura 20.....	36
Figura 21.....	36
Figura 22.....	37
Figura 23.....	38
Figura 24.....	38
Figura 25.....	40
Figura 26.....	40

Figura 27.....	41
Figura 28.....	42
Figura 29.....	43
Figura 30.....	45
Figura 31.....	46
Figura 32.....	46
Figura 33.....	47
Figura 34.....	47
Figura 35: Gràfic que mostra l'evolució al llarg dels anys de la taxa de detecció de nous casos de càncer de mama a Espanya....	60
Figura 36: Recta patró elaborada pel lector de plaques	73
Figura 37: Amb la Dra. Neus Agell i part del seu equip	93
Figura 38: Amb estudiant de doctorat de l'equip de la Dra. Agell ...	93
Figura 39: Entrada al CABIMER	97
Figura 40: Amb el Dr. Felipe Cortés	97
Figura 41: Amb el Dr. Pablo Huertas	100
Figura 42: Entrada al CBM Severo Ochoa	101
Figura 43: Amb el Dr. José Antonio Tercero	101

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Justificació del tema escollit

Des de ben petit he estat un noi fascinat per la ciència, i amb especial interès per les matèries científiques de l'escola. De fet, des de 2n d'ESO, tinc clar que vull estudiar Medicina, i fins i tot sé quina especialitat -al menys, actualment- vull fer: oncologia. Tinc clar que la meua vocació és la ciència, i més específicament, la Medicina i la Biomedicina. Els meus pares sempre m'han recolzat en la meua decisió de la carrera que vull fer en un futur i, de fet, a la meua família hi ha una certa tradició de carreres professionals científicotecnològiques.

El càncer és una malaltia que m'interessa moltíssim, la seva complexitat i la seva naturalesa em fascinen, i de gran m'agradaria ajudar a totes aquelles persones que la sofreixen. També, vull compaginar la feina de doctor amb la d'investigador, i poder aplicar tractaments especialitzats en els meus pacients, és a dir, aplicar la Medicina Translacional, una branca de la Medicina per la qual jo apostaria perquè crec que pot millorar considerablement l'eficàcia dels tractaments.

A més, cada cop hi ha més grups d'investigació que volen estudiar el càncer, pel que al final es pot obtenir una visió molt més global del càncer i de molts punts de vista diferents.

També em fascina moltíssim el DNA i la biologia molecular, a més de la genètica. Tots els temes relacionats amb el DNA, gens, expressió gènica, dany al DNA, etc. m'encanten i gaudeixo moltíssim estudiant-los i aprenent sobre ells.

Per tant, aquest Treball de Recerca combina els dos temes de biologia que més m'agraden: el càncer i la biologia molecular d'aquest. Així doncs, puc veure com es poden utilitzar els estudis sobre el comportament del DNA en les cèl·lules canceroses per tractar-les.

1.2. Procés de concreció del treball

Abans de començar el Treball de Recerca, tenia clar que el volia centrar en el càncer. Vaig començar a enfocar el meu Treball de Recerca en el càncer infantil, i més específicament, la leucèmia. Més endavant, vaig decidir encaminar-lo cap al càncer de mama, ja que aquest i el càncer cerebral sempre havien despertat intriga en mi.

Gràcies al programa "Crazy about Biomedicine", vaig poder assistir a una conferència on els estudiants de doctorat Marina Villamor i Josep Biayna ens van explicar els projectes que estaven duent a terme. Vaig decidir parlar amb ells perquè el tema del qual m'havien parlat em semblava summament interessant, i estava molt relacionat amb el càncer. Després d'haver parlat amb la Marina Villamor, l'estudiant de doctorat de l'IRB amb qui he realitzat les pràctiques

experimentals, em va dir que el seu laboratori se centra en el càncer de mama. Això em va animar perquè era un dels dos tipus de càncer que més m'interessava, així que vaig decidir seguir endavant.

La Marina em va explicar amb quines cinases treballen al laboratori, les TLK, pel que delimitaria molt més el tema del meu Treball de Recerca. Al principi, vam decidir que faríem un anàlisi de genotip, una qPCR i un Western Blot, a partir de teixit de ratolí.

Al final, vam decidir que faríem tres estudis: un de proliferació cel·lular, un altre de formació de colònies i un Western Blot, a partir de cèl·lules que no tenien BRCA1.

Per tant, treballaria també amb aquestes dues proteïnes i amb una altra que inhibiríem amb olaparib, la proteïna PARP, de manera que vam acabar de concretar el meu Treball de Recerca.

Vaig decidir que faria una part bibliogràfica extraient la informació d'articles científics i altres fonts fiables, i una part experimental a l'Stracker Lab de l'IRB.

1.3. Hipòtesi i objectius plantejats

Pregunta problema: La silenciació de les proteïnes TLK1 i TLK2, i l'olaparib, influiran en el creixement, la formació de colònies i l'aparició de dany en el DNA de les cèl·lules?

Hipòtesi: Potser no podran créixer cèl·lules -o molt poques-, potser no es formarà un nombre elevat de colònies i potser es generarà dany al DNA ocasionat per l'aparició d'estrès replicatiu, amb la silenciació de les proteïnes TLK1 i TLK2 i amb olaparib.

Objectius plantejats:

- Experimentar en el món de la recerca científica, i veure si realment és un àmbit en el qual m'agradaria treballar.
- Realitzar, de forma contínua i constant, un Treball de Recerca coherent, organitzant-me i repartint-me les tasques a fer.
- Contactar amb especialistes del tema del meu Treball de Recerca amb una dilatada experiència en el món de la investigació científica.
- Fer recerca en el camp del càncer de mama i obtenir informació sobre els diferents aspectes que té.
- Investigar amb les proteïnes TLK1, TLK2, PARP i BRCA i realitzar experiments inhibint-les per comprovar o refutar la hipòtesi plantejada.
- Buscar informació sobre el DNA, la reparació d'aquest i l'estrès replicatiu, i poder contrastar la bibliografia trobada en articles i llibres.
- Explicar tots els continguts d'aquest Treball de Recerca d'una forma clara, concisa i precisa, però també divulgativa.

1.4. Descripció de la metodologia emprada

Abans de començar el Treball de Recerca, ja tenia una base de coneixements prèvia, però vaig decidir ampliar-la per poder començar a redactar la part bibliogràfica del mateix i poder planificar el disseny experimental.

Un cop vaig parlar amb la Marina Villamor, i vaig saber quins eren els estudis que es feien de forma més habitual a l'Stracker Lab, i sabent quin projecte estava realitzant, vaig formular la pregunta problema del meu Treball de Recerca.

Quan ja sabia en què se centraria el meu Treball de Recerca, vaig començar a aprofundir sobre el tema per anar coneixent diferents conceptes dels quals no estava acostumat a llegir, i per tenir més clar en què hauria de treballar. Més endavant, i amb aquesta nova informació, vaig redactar la meva hipòtesi.

Un cop ja sabia més específicament cap on enfocaria el meu treball, vaig decidir aprendre més sobre el tema, pel que vaig extreure gran part d'informació de llibres de Biologia Molecular, i d'articles científics de revistes on-line, principalment. En menor part, també vaig utilitzat pàgines web que tinguessin un nivell de fiabilitat alt, la majoria de les quals eren d'universitats. D'altra banda, com és un tema molt específic, vaig buscar contactes als quals els podria demanar informació i consell respecte l'estrès replicatiu i les TLK. Vaig contactar amb ells mitjançant correu electrònic i els vaig visitar presencialment, tret d'un parell que vaig parlar amb ells per telèfon o Skype. Els contactes han estat una peça clau d'aquest Treball de Recerca: sense molts d'ells, no hagués obtingut informació imprescindible per entendre algun dels conceptes que tracto.

D'aquesta manera, vaig poder planificar i el disseny experimental del meu treball de camp, que vaig desenvolupar a l'IRB durant 9 dies. Les dades que vaig obtenir van ser tractades de la manera més adequada per poder interpretar-les i poder extreure'n informació per redactar les conclusions, demostrant així si la meva hipòtesi era certa o falsa.

2. MARC TEÒRIC

Resum:

El càncer és una de les principals causes de mort a nivell mundial, i la recerca de nous fàrmacs per tractar-lo és clau per a millorar la qualitat de vida de la població. El càncer de mama, present tant en dones com en homes, és un dels més comuns i, en dependre de molts aspectes, es pot tractar de formes molt diferents.

El DNA és la molècula que conté tota la informació del nostre sistema biològic, i pot sofrir certs danys. Les proteïnes TLK1, TLK2, PARP i BRCA1 estan involucrades en el mecanisme de reparació del DNA, la “DDR pathway”, i si estan mutades o inhibides pot aparèixer dany al DNA a causa de l'estrès replicatiu, i no ser reparat.

Es van silenciar les proteïnes TLK1 i TLK2 amb siRNAs, PARP amb olaparib en les línies cel·lulars MDA-MB-231, MDA-MB-436, les quals ja tenien BRCA1 mutada.

Vam realitzar tres estudis per comprovar les funcions d'aquestes proteïnes i observar els efectes que la cèl·lula pateix en la seva absència: un de proliferació cel·lular, un de formació de colònies i un Western Blot.

Finalment, vam poder observar amb el Western Blot que inhibint les proteïnes anteriorment esmentades es generava dany al DNA, que era causat per l'estrès replicatiu que experimentaven les cèl·lules. Per tant, TLK1, TLK2, PARP i BRCA1 són proteïnes que s'encarreguen de mantenir l'estabilitat genòmica i a reparar les lesions que es generen diàriament en el DNA.

Paraules clau: càncer de mama, TLK1, TLK2, PARP, BRCA1, estrès replicatiu, siRNA, DNA.

Actualment, les investigacions en contra del càncer s'han expandit i han guanyat importància i l'atenció de la gent, perquè és un problema que està creixent i ja porta afectant la població des de fa bastant temps. S'ha arribat al punt en què els objectius d'investigació s'han diversificat tant (proteòmica del càncer, metastasi, dany en el DNA, etc.) que s'està “atacant” amb coneixements a la malaltia, per tal que, tard o d'hora, s'acabin trobant tractaments molt més eficients que els actuals, amb farmacocinètica¹ i farmacodinàmica² més potents.

El càncer és una malaltia d'abast global que afecta les cèl·lules d'un mateix organisme i que de vegades pot resultar desconcertant i frustrant. Més

¹ Estudi dels processos que un fàrmac experimenta en un organisme (el que el cos li fa al fàrmac).

² Estudi dels efectes que un fàrmac té en un organisme (el que el fàrmac li fa al cos).

específicament, el càncer de mama és un dels càncers més comuns entre la població, sent el sector femení el més afectat per aquesta malaltia i, en menor grau, el masculí. A més, els tractaments actuals són poc acurats i, malgrat molts d'ells sí que curen el càncer d'un pacient, tenen nombrosos efectes secundaris en la integritat del mateix: pèrdua de pèl, nàusees o anèmia, entre d'altres. Es pot dir que és com matar mosques a canonades, una metàfora molt explícita i utilitzada per descriure tractaments inespecífics com la quimioteràpia, que elimina cèl·lules que es divideixen ràpidament, però sense importar si són perjudicials o no.

Així doncs, en aquest Treball de Recerca investigo tractaments innovadors i molt més específics, en funció del pacient, perquè en cada pacient el càncer actua d'una manera diferent, i és necessari optimitzar els medicaments per aconseguir la màxima millora del pronòstic d'un pacient. Vull difondre alguns conceptes, que poden servir de base per al disseny de fàrmacs dirigits a certs tipus de pacients, "jugant" amb possibles mutacions que puguin tenir, i amb proteïnes essencials que es puguin inhibir en les cèl·lules tumorals.

També vull introduir als lectors d'aquest treball en el món de la biologia molecular, parlant del DNA, els problemes que pot sofrir, els mecanismes que el reparen, etc.

Faig una important marca d'atenció en l'estrès replicatiu, una circumstància que pot ocórrer en el procés de la replicació del DNA i que, malgrat estar de moment poc estudiada, crec que s'haurien de centrar molts tractaments en produir aquesta situació en les cèl·lules canceroses, perquè ocasiona petites lesions en el DNA, però la seva acumulació porta les cèl·lules a la seva mort o infuncionalitat.

En conclusió, vull fer una especial incisió en la creació de medicaments dirigits a persones específiques, per millorar l'efectivitat d'aquests i disminuir considerablement els efectes secundaris que poden originar.

2.1. El càncer de mama

Aquest Treball de Recerca planteja una alternativa als tractaments habituals contra el càncer, que permeti disminuir els efectes secundaris que aquests puguin causar. Abans de dissenyar tractaments contra una malaltia, cal conèixer les seves causes, com pot aparèixer, i com pot progressar. Tots els organismes vius estan formats per cèl·lules. La cèl·lula és la unitat de vida més petita que existeix. Les cèl·lules i els organismes estan vius perquè realitzen les tres funcions vitals: automantenir-se, formant noves estructures i reparant les que estan danyades; autoregular-se, controlant les reaccions químiques del metabolisme, i tenir la potencialitat de reproduir-se, per tal de formar nous éssers vius.

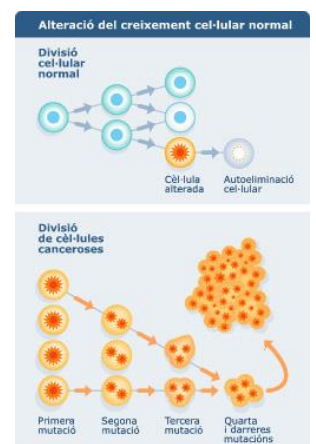


Figura 1. Procés d'aparició d'un càncer a partir de múltiples mutacions. Font: http://cancer.gencat.cat/ca/ciudadans/el_cancer/que_es_el_cancer

Les cèl·lules d'un ésser viu estan contínuament dividint-se per tal de formar nous individus, en el cas dels organismes unicel·lulars, o per reparar o formar teixits, en el cas dels organismes pluricel·lulars. De vegades, poden aparèixer errors al llarg de la vida d'una cèl·lula, molts dels quals, estan associats al DNA que es troba al nucli d'aquestes, i es pot formar una cèl·lula cancerosa. Les cèl·lules canceroses no cessen de dividir-se, evadint les ordres d'altres cèl·lules per evitar que creixin i escapant-se del sistema immunitari, que les vol eliminar. Finalment, s'acaba formant una acumulació de cèl·lules que s'anomena "tumor" (Figura 1).

Els càncers no apareixen per una sola mutació, sinó per una gran acumulació de mutacions, ja que si només amb una ja n'aparegués, no seriem éssers viables. En tota una vida, s'espera que cada gen experimenti unes 10^{10} mutacions. Tot i que la majoria s'aconsegueixen reparar a temps o són innòcues, n'hi ha força que, si s'acumulen, poden acabar produint càncer (1).

Els tumors no sempre causen càncer. Poden ser tumors benignes, que no envaeixen altres teixits, i no són perillosos, o tumors malignes, que segueixen creixent d'una forma descontrolada, destrueixen els teixits propers i poden arribar a altres òrgans o teixits del cos (metàstasi), que són els que causen càncer.

Segons Douglas Hanahan i Robert A. Weinberg, en el famós article "Hallmarks of Cancer: The Next Generation", una cèl·lula pot formar un tumor si:

- **Presenta una senyalització cel·lular per proliferar:** les cèl·lules canceroses desregulen la producció i l'alliberament de senyals de creixement, que s'uneixen a receptors de membrana, els quals desencadenen una via de senyalització involucrada en la regulació del cicle i el creixement cel·lular.
- **Evadeix els supressors del creixement:** les cèl·lules canceroses han d'evitar mecanismes que aturen el creixement de les cèl·lules, de forma que puguin seguir creixent descontroladament. Les proteïnes RB i TP53 són els dos supressors de creixement més importants que existeixen. RB decideix si la cèl·lula està suficientment preparada o sana com per créixer i dividir-se. TP53 rep estímuls de l'interior de la cèl·lula i si aquesta no funciona correctament, pot aturar el creixement de la cèl·lula o pot fer que aquesta mori per apoptosi (mort cel·lular programada). Les cèl·lules tumorals normalment tenen defectes en aquestes proteïnes, el que provoca que aquestes es divideixin, encara que sigui amb errors.
- **Resisteix la mort cel·lular:** l'apoptosi permet que una cèl·lula sigui eliminada si aquesta podria suposar un problema per a l'organisme. Hi ha dos mecanismes de regulació d'apoptosi: un intracel·lular i un extracel·lular. Moltes proteïnes, com el citocrom c, Bax o Bak participen en vies cel·lulars d'apoptosi. Quan apareix un error en aquestes, les cèl·lules canceroses poden evitar l'apoptosi.

- **Adquireix immortalitat replicativa:** les cèl·lules canceroses, per tal de formar un tumor, necessiten un gran potencial de replicació. Existeixen dues maneres per aturar la divisió de les cèl·lules: la senescència, un estat en el qual una cèl·lula segueix viva, però no es divideix, i l'apoptosi, en la qual la cèl·lula mor. Normalment, si una cèl·lula entra en senescència i aconsegueix dividir-se, aleshores entra en apoptosi. Però les cèl·lules que sobreviuen de l'apoptosi, són les cèl·lules que crearan un càncer. El fet de sobreviure a l'apoptosi s'anomena "immortalització". També es pensa que els telòmers tenen un paper important en el càncer. Els telòmers són els extrems dels cromosomes i protegeixen a aquests. A cada divisió, es van fent més curts, fins al punt en què ja no pugui protegir al cromosoma i la cèl·lula ja no es pugui dividir. Hi ha un enzim, anomenat "telomerasa", que no es troba en les cèl·lules normals, però sí en les tumorals. Aquest enzim allarga els telòmers després de cada divisió, de manera que així la cèl·lula es pot dividir contínuament.
- **Indueix l'angiogènesi:** les cèl·lules que formen un càncer necessiten nutrients i oxigen per viure, i aquests els obtenen amb la sang que els vasos sanguinis transporten. La proteïna VEGF-A està molt involucrada en aquest procés, i una mutació en aquesta podria desencadenar aquesta situació.
- **Activa la invasió i la metàstasi:** les cèl·lules canceroses poden abandonar el tumor primari i arribar a altres parts del cos, on poden generar tumors secundaris, procés que rep el nom de metàstasi. Les cèl·lules que provoquen metàstasi normalment adquireixen una forma diferent i tenen mutacions en la proteïna E-cadherina, que té com a funció l'adhesió cel·lular. Si les cèl·lules no estan ben adherides les unes amb les altres, és molt fàcil que puguin deixar de formar part del teixit on estaven i arribar a una altra part del cos.
- **Generen inestabilitat genòmica i mutacions:** les cèl·lules tumorals tenen un conjunt de mutacions en el seu DNA, de forma que tenen gens mutants que provoquen la creació d'un tumor. Les cèl·lules tumorals adquireixen una gran capacitat per mutar el seu DNA, i això ho poden aconseguir incrementant la sensibilitat a agents que provoquen mutacions o a errors en la maquinària per reparar els danys en el DNA.
- **Produeixen inflamació:** per tal d'evadir el sistema immunitari, les cèl·lules canceroses imiten les respostes inflamatòries d'un teixit normal, de manera que passen desapercebudes. A més, la inflamació permet que se secretin factors de creixement a prop de les cèl·lules del tumor, de forma que aquestes poden créixer encara més.
- **Reprogramen el metabolisme energètic:** en condicions aeròbiques (amb oxigen), les cèl·lules obtenen energia degradant la glucosa en piruvats mitjançant la glucòlisi, i els piruvats en diòxid de carboni i aigua; però en condicions anaeròbiques (sense oxigen), es produeix molta glucòlisi, i el piruvat no se sol descompondre. Les cèl·lules canceroses poden, en

condicions aeròbiques, afavorir la glucòlisi, per obtenir molta més energia (glucòlisi aeròbica) i poder dividir-se més i metastatitzar.

- **Evadeixen el sistema immunològic:** el sistema immunitari comprova que no hi ha cèl·lules perilloses al cos i, en cas que n'hi hagi, les elimina. Els tumors poden evitar que el sistema immunitari els detectin mitjançant la secreció de TGF- β , és a dir, un factor immunosupressor, que permet que algunes cèl·lules del sistema immunològic no s'infiltrin en certs teixits (Figura 2) (2).

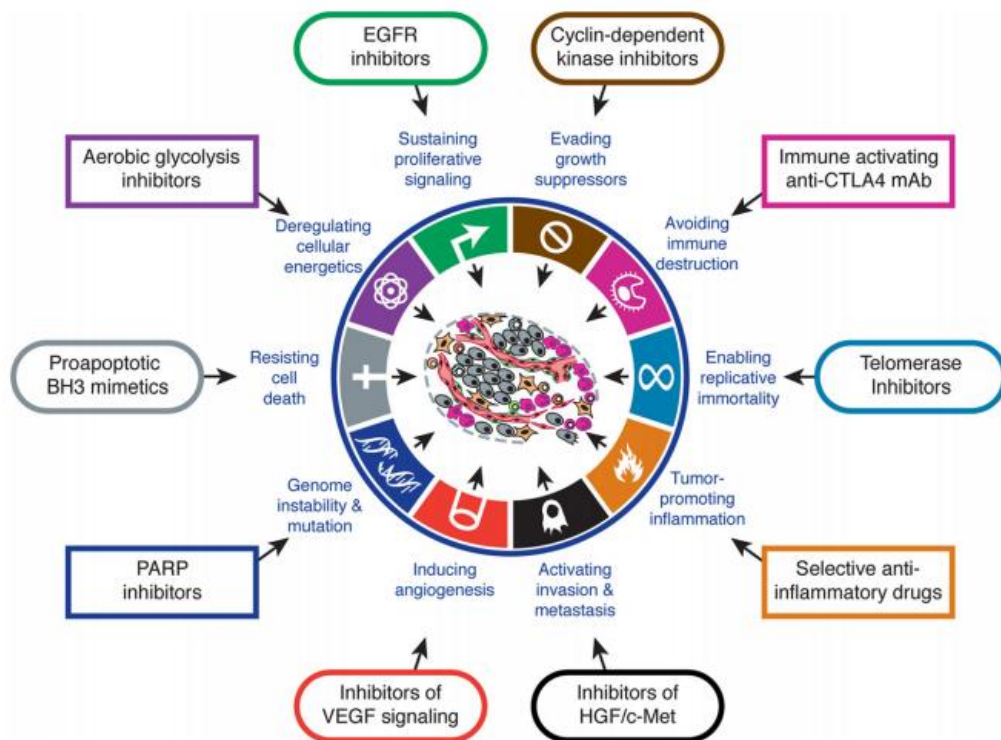


Figura 2. Esquema representatiu de les 10 condicions que ha de tenir un tumor per ser maligne, acompanyat de possibles teràpies enfocades en cada una d'aquestes. Es pot observar que són situacions molt diferents, però que, en conjunt, poden suposar un problema per a un grup de cèl·lules. Font: "Hallmarks of Cancer: The Next Generation".

2.1.1. La malaltia

Quan el tumor apareix en els teixits pertanyents als pits, es parla de "càncer de mama". Tot i que normalment apareix en dones, també hi ha casos de càncer de mama en homes, molt menys freqüents (els casos en homes representen menys d'un 1% dels casos de càncer de mama). Tal com va dir el Dr. Octavi Córdoba, el càncer de mama es pot considerar una malaltia local i sistèmica.

2.1.1.1. Local

El càncer de mama es considera una malaltia local ja que el tumor està situat en un teixit específic del cos i per tant, afecta a una zona concreta d'aquest. Principalment, existeixen els següents tipus de càncer de mama:

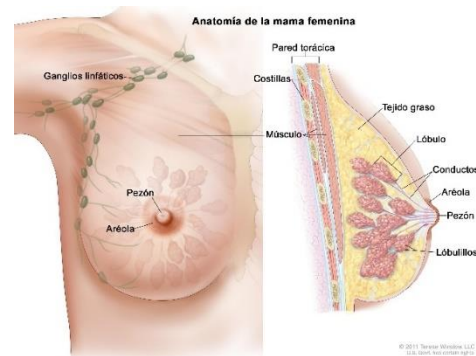


Figura 3. Anatomia de la mama. Font: <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR710874.jpg>

- **Carcinoma ductal in situ:** els carcinomes són càncers que afecten les cèl·lules epitelials (cèl·lules de pell que envolten els òrgans) i són força comuns en els càncers de mama. De fet, aquest tipus en concret representa el 20% de la totalitat de càncers de mama. S'anomena "in situ" perquè està només en un lloc, no ha envaït els teixits propers, pel que no pot fer metàstasi.
- **Carcinoma lobular in situ:** tot i anomenar-se "carcinoma", no es considera un càncer, tot i que la seva presència fa que es tingui entre 7 i 12 vegades més probabilitat de tenir un càncer de mama invasiu. Es desenvolupa en els lòbuls del pit (Figura 3), les zones on es produeix la llet, però mai no travessen la pell dels lòbuls. Entre el 3% i 5% dels casos de càncer de mama són d'aquest tipus.
- **Carcinoma ductal invasiu:** s'anomena invasiu ja que es propaguen cap al teixit mamari. És el càncer de mama més comú (aproximadament, un 80% dels casos). Es desenvolupa en els conductes galactòfors (ductes), els conductes que transporten la llet dels lòbuls al mugró. Les cèl·lules canceroses travessen la paret dels ductes, per fer metàstasi.
- **Carcinoma lobular invasiu:** es desenvolupa en els lòbuls i pot metastatitzar. És més difícil de detectar amb exàmens físics o mamografies (tècnica en la qual s'utilitzen raigs X per veure si hi ha acumulacions anormals de cèl·lules) que el carcinoma ductal invasiu.

2.1.1.2. Sistèmica

També es defineix el càncer de mama com una malaltia sistèmica, ja que el tumor primari pot estendre's pel cos i arribar a altres òrgans, infiltrant-se i afectant teixits distants del lloc on es troba el tumor primari, és a dir, que pot causar metàstasi, mitjançant el sistema circulatori o el sistema limfàtic, com a vies de desplaçament. El càncer de mama normalment metastatitza a:

- Els pulmons: els símptomes varien depenent del nombre de tumors secundaris que apareguin (tumors metastàtics), però generalment són tos, dificultat per respirar, infeccions pulmonars, tos amb sang, mal a la caixa toràcica i pèrdua de pes.
- Els ossos: en la majoria de casos, a la columna vertebral, pelvis o fèmur. Causa dolor, propensió a trencament d'ossos, incontinença urinària i intestinal, feblesa a les extremitats i nivells elevats de calci a la sang (3).

2.1.2. Tractaments

Depenent de la classificació que té un càncer de mama, se li aplicarà un tractament o un altre. Els més habituals són els següents:

2.1.2.1. Quimioteràpia:

És un tractament sistèmic, és a dir, que afecta molts teixits del cos i serveix per curar el càncer, evitar la metastasi i pal·liar els símptomes. Depenent de l'objectiu que es vol aconseguir, hi ha quatre tipus de quimioteràpia:

El cicle cel·lular, és a dir, el conjunt d'estats pels quals una cèl·lula sempre passa, està molt regulat per uns mecanismes de control, anomenats "checkpoints", que comproven que tot estigui funcionant correctament, i llavors, permeten a la cèl·lula passar al següent procés. Les cèl·lules tumorals no tenen aquests checkpoints, o els tenen desactivats, perquè es divideixen molt ràpidament, sense importar, per exemple, que no hi hagi errors en el DNA. Per això, la quimioteràpia actua en la fase de la divisió de la cèl·lula o mitosi, fent que no es puguin dividir i acabin morint. Es pot administrar per via intravenosa, la més habitual, o per via oral.

Tot i així, solen causar molts efectes secundaris, perquè els compostos de la quimioteràpia actuen sobre cèl·lules que es divideixen molt, i aquestes poden ser les del tumor, però també les del cabell, l'estómac, la medul·la òssia... provocant la pèrdua de pèl, nàusees i vòmits, anèmia i immunodepressió (el sistema immunitari no funciona correctament).

2.1.2.2. Radioteràpia

Mitjançant altes dosis de radiació despreses per una complexa maquinària (Figura 4), es pot danyar el DNA de les cèl·lules canceroses, provocant així que deixin de dividir-se i morin. És un tractament que s'ha d'anar aplicant setmana rere setmana perquè s'acumulin el nombre suficient de mutacions en el DNA com perquè una cèl·lula mori.

Pot causar efectes secundaris com la fatiga, que és independent de la zona on s'apliqui, i molts d'altres, però que depenen de la zona del cos que s'ha tractat. Per exemple, al cap, pot provocar la caiguda de pel, canvis del sabor i canvis a la pell, i al pit, edemes, sensibilitat o canvis en la pell.



Figura 4. Representació d'un pacient sent tractat amb radioteràpia . Font: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia/haz-externo>

2.1.2.3. *Intervenció quirúrgica*

La cirurgia és molt utilitzada com a tractament del càncer de mama, ja que normalment és un tumor localitzat i es pot extirpar fàcilment. Hi ha dos tipus de cirurgia, la conservadora i la radical.

Els efectes secundaris més importants són el postoperatori immediat, ja que després de la intervenció poden aparèixer hematomes; la disminució de la mobilitat del braç, en cas que s'hagin extirpat els ganglis axil·lars, els músculs del braç poden estar més rígids i pot causar dolor, i el limfedema, és a dir, l'acumulació de limfa en el braç més proper al pit extirpat, ja que aquest no pot circular correctament en haver-se extirpat els ganglis, provocant que el braç s'infla (4).

2.1.2.4. *Teràpia diana*

La teràpia diana o dirigida es basa en fàrmacs que s'uneixen a molècules específiques de les cèl·lules canceroses, i causen el bloqueig del creixement d'aquestes. En contrast amb la quimioteràpia, que ataca a totes les cèl·lules que es divideixen ràpidament, la teràpia diana ataca només a les cèl·lules que tenen la molècula específica.

La majoria d'aquestes estan encara en estudis clínics o preclínics, és a dir, que encara no estan comercialitzades, sinó que només s'administren en casos de la malaltia que no responen als tractaments habituals.

Els blancs als quals els fàrmacs diana s'uneixen han de ser necessaris per al creixement de la cèl·lula, de manera que, quan interaccionin, el creixement no es pugui dur a terme correctament. Una manera per identificar possibles blancs seria comparar les proteïnes que es troben en cèl·lules normals d'un teixit i les cèl·lules tumorals d'aquest. Les proteïnes que només es trobin en les últimes cèl·lules, seran, segurament, les que les cèl·lules tumorals necessiten per créixer (5).

2.2. **Les “Tousled-Like kinases” (TLK)**

Tal com s'ha exposat anteriorment, una de les causes, un dels “hallmarks” del càncer, és que genera inestabilitat genòmica i mutacions. Les TLK són unes proteïnes molt involucrades en mantenir l'estabilitat del genoma.

Les proteïnes són biomolècules, és a dir, molècules necessàries per a la vida, que estan formades d'unes petites unitats, denominades “aminoàcids”, i que proporcionen un caràcter determinat a un organisme, executen l'acció que dicta un gen. Un dels tipus de proteïnes que existeixen són els enzims, que són proteïnes que catalitzen (fan que passi més de pressa) una reacció química. Les cinases són enzims que catalitzen fosforilacions, això és, transferències de grups fosfat (Figura 5). Per tant, si una cinasa actua sobre una molècula amb un grup fosfat, la cinasa l'hi traurà i l'hi donarà al substrat (molècula sobre la qual un enzim actua). Normalment, la molècula de la qual treuen els grups fosfat és l'ATP (adenosina trifosfat), la molècula energètica per excel·lència.

Com té tres fosfats, quan una cinasa li treu un, es converteix en ADP (adenosina difosfat). Les cinases són molt importants, perquè un sol grup fosfat pot modificar molt l'estructura de la molècula que el rep, de manera que pot canviar la funció que té.

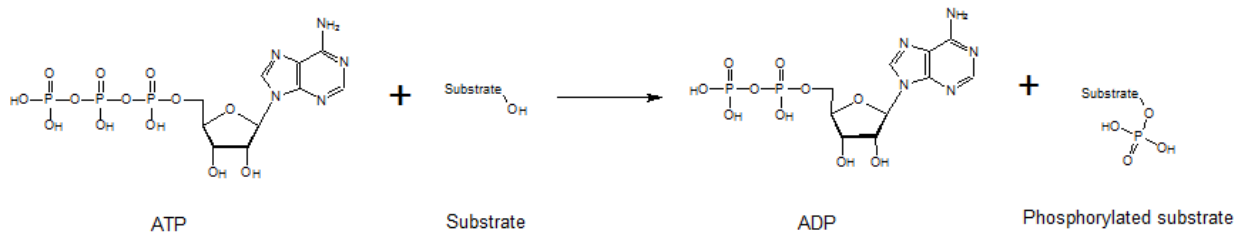


Figura 5. Procés de fosforilació d'un substrat. Es pot observar que un dels tres grups fosfat de l'ATP passa a formar part d'un substrat, pel que s'obté ADP i un substrat fosforilat. En aquest procés, hi intervé una cinasa, que s'encarrega de treure el grup fosfat de l'ATP (convertint a aquest en ADP) i donar-lo al substrat (convertint aquest en un substrat fosforilat). Font: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Basic_phosphorylation_reaction.png

2.2.1. Les cinases

Les cinases són enzims molt importants, ja que tenen un gran paper en la regulació enzimàtica i en la transmissió de senyals, donat que la fosforilació permet activar o desactivar una proteïna. Les cinases poden ser molt o poc específiques, depenent de la forma que tingui el seu lloc actiu (zona de l'enzim on es catalitza la reacció). Aproximadament, un 30% de les proteïnes humanes poden ser modificades per cinases (6).

2.2.2. Funció de les TLK

Les TLK són unes cinases que fosforilen molts substrats diferents, entre els quals, el més important és ASF1, una xaperona de les histones³ H3/H4, però també Rad9, que intervé en la resposta al dany al DNA. Són cinases nuclears, és a dir, que es troben a l'interior del nucli, i la seva màxima activitat es dona en la replicació del DNA (procés en el qual el DNA crea una còpia de si mateix). Les TLK s'expressen en tots els teixits, i els nivells es mantenen estables al llarg del temps.

Els dominis de la proteïna són els següents: domini catalític (on es duu a terme la reacció) en l'extrem C-terminal i domini regulador en l'extrem N-terminal. Té una regió, denominada "coiled-coil", que li permet unir-se amb altres TLK.

Aquestes cinases es van identificar en el model de laboratori *Arabidopsis thaliana*, on es va veure que quan el gen estava mutat, ni les flors ni les fulles es desenvolupaven correctament. La proteïna està molt conservada evolutivament, ja que les TLK de la *Drosophila melanogaster* (una mosca), *Chaenorhabditis elegans* (un cuc nematode), *Mus musculus* (un ratolí) i humana tenen un 70% de semblança. Les funcions principals de les TLK són la transcripció, la replicació del DNA, la reparació del DNA, la interferència a l'RNA, la continuïtat del cicle cel·lular,

³ Una xaperona és una proteïna que modifica altres proteïnes, com les histones, perquè puguin funcionar correctament, i una histona és una proteïna al voltant de la qual el DNA s'enrotlla per poder-se compactar i cabre al nucli

la segregació de cromosomes i la mitosi, pel que es pot observar que la majoria estan implicades en processos relacionats amb el DNA (7).

Gràcies als articles proporcionats per la Dra. Rosa Aligué, vaig poder saber que en els vertebrats, hi ha la TLK1 i la TLK2, que fosforilen tant ASF1a com ASF1b (dues subunitats de la xaperona). En la resposta al dany al DNA, la CHK1 (checkpoint kinase 1), una cinasa, fosforila -i, per tant, activa- la TLK1. Aquesta cinasa no és essencial, tot i que és necessària, per al desenvolupament de ratolins, l'envelliment i la reparació del DNA. En canvi, la TLK2 és necessària per al bon desenvolupament de la placenta, ja que una mutació en el gen de la TLK2 provocaria un "placental defect", que originaria "embryonic lethality", és a dir, la mort dels embrions. La falta o error del gen de la TLK2 causa que les placentes siguin més petites i hi hagi poca circulació en el cordó umbilical. Això succeeix perquè en l'embrió hi ha nivells molt elevats de TLK1, excepte en la placenta, on hi ha nivells molt elevats de TLK2. Si no es pot arribar a aquests nivells, la placenta no es forma correctament. Per tant, la TLK2 té un paper molt important en l'embriogènesi dels mamífers (Figura 6). A més, la TLK1 no és estrictament necessària per realitzar funcions cel·lulars si la TLK2 està present (8). Una dada molt interessant a partir de la qual s'articularà aquest Treball de Recerca és que la TLK2 està sobreexpressada, és a dir, expressada en uns nivells superiors als que es consideren normals, en un nombre elevat de casos de càncer de mama ER+ (presenten el receptor d'estrògens) (9).

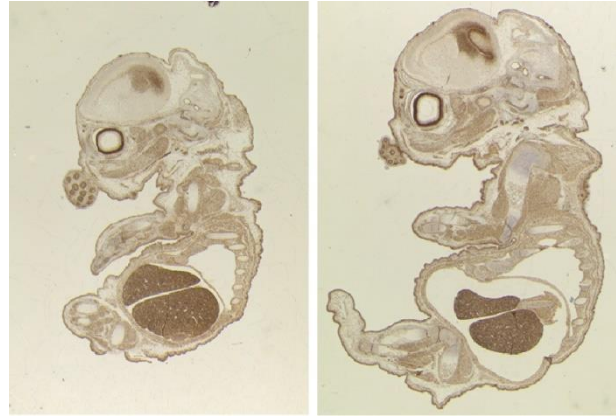


Figura 6. Comparació entre dos embrions de ratolí. El de l'esquerra no té TLK2, i es pot observar que aquesta proteïna té un rol important en el desenvolupament embrionari. Font: "Differential requirements for Tausled-like kinases 1 and 2 in mammalian development".

2.2.3. Vies de senyalització cel·lular on estan implicades

Com la funció principal de les TLK es assegurar el bon estat del genoma (conjunt de gens d'un organisme) i protegir el DNA, les TLK participen en una via de reparació del DNA, la via ATR-CHK1 (Figura 7). Una via de senyalització cel·lular es basa en una cascada de proteïnes, és a dir, una activació contínua de proteïnes (A activa B, B activa C, C activa D, i així successivament), on, al final, s'aconsegueix una resposta en forma d'expressió d'un gen.

Quan hi ha dany al DNA, ja sigui causat de forma exògena o endògena, mutacions en la seqüència de nucleòtids (unitats que formen el DNA) o manca de nucleòtids suficients, hi ha una aturada de forquetes de replicació (estructura que es forma en replicar-se el DNA). En aquest moment, la polimerasa (enzim que sintetitza el DNA) se separa d'aquest i queden ssDNA (single-stranded DNA, DNA de cadena senzilla). Com aquest és molt fràgil i, per evitar que es plegui sobre ell mateix

formant estructures secundàries difícils de dissoldre, ràpidament se li uneix una proteïna, anomenada RPA.

1. La proteïna **RPA** (proteïna de replicació A) és un heterotrímer, és a dir, que està formada per tres estructures diferents i està molt conservada (molt semblant) en tots els organismes eucariotes. Té una zona que s'uneix molt fàcilment al ssDNA, però en canvi, no ho fa amb el DNA de doble cadena o l'RNA. Quan RPA s'uneix al **ssDNA** i es manté així durant un cert temps, es formen DSB (el dany en una cadena es converteix en dany en les dues cadenes) (10).
2. La proteïna **ATRIP** (ATR-interacting protein) s'uneix al complex **ssDNA-RPA**. Aquesta proteïna estabilitza la següent proteïna de la via, l'ATR, ja que, sense ATRIP, ATR no funciona correctament. Per tant, es pot arribar a la conclusió que les dues formen el complex ATR-ATRIP. ATRIP s'uneix a RPA per moltes interaccions diferents (11).
3. **ATR**, un enzim necessari per al desenvolupament dels mamífers, s'uneix a **ATRIP**. La falta d'aquesta proteïna ocasiona la Síndrome de Seckel, on hi ha un creixement més lent que l'habitual en el fetus, ja que les cèl·lules no es poden dividir amb tanta rapidesa en no tenir una proteïna tan important per mantenir la integritat del genoma (12).
4. **CHK1** (Checkpoint kinase 1) és activada per **ATR**. Aquesta cinasa és essencial per al desenvolupament dels mamífers ja que la seva absència provoca una continuació de les forquetes de replicació obertes, un increment de l'activació d'origens de replicació i una disminució dels nivells de nucleòtids lliures. Si s'activa, hi ha un arrest del cicle cel·lular: tots els processos que s'estan duent a terme a la cèl·lula s'aturen perquè l'error en el DNA es repari (13).
5. La **TLK1** (Tousled-like Kinase 1) és fosforilada per la **CHK1** en la serina 695, la qual cosa provoca la seva inactivació. Les TLK son cinases involucrades en molts processos diferents, els més rellevants dels quals són la replicació del DNA, la reparació del DNA, la progressió del cicle cel·lular i la segregació de cromosomes. Segurament realitzen les funcions en dímers o oligòmers, és a dir, en grups de dos, o més TLK1 juntes (14).
6. **ASF1**, una xaperona d'histones, és activada per la **TLK1**. Si la TLK1 s'inactiva, no es pot activar ASF1. Aquesta proteïna regula l'estat de condensació del DNA, i si està inactivada, la cromatina es troba descondensada, perquè altres enzims de reparació del DNA, com Rad9, que també és activat per TLK1, puguin accedir més fàcilment a les lesions del DNA i reparar-les (8). Per tant, normalment ASF1 està activada, mantenint condensat el DNA, però, quan sorgeix una lesió en el DNA, s'activa la via ATR-CHK1, es desencadenen totes les activacions i/o inactivacions oportunes i el procés acaba amb la inactivació d'ASF1, el que es tradueix en la descondensació del DNA, perquè pugui ser reparat.

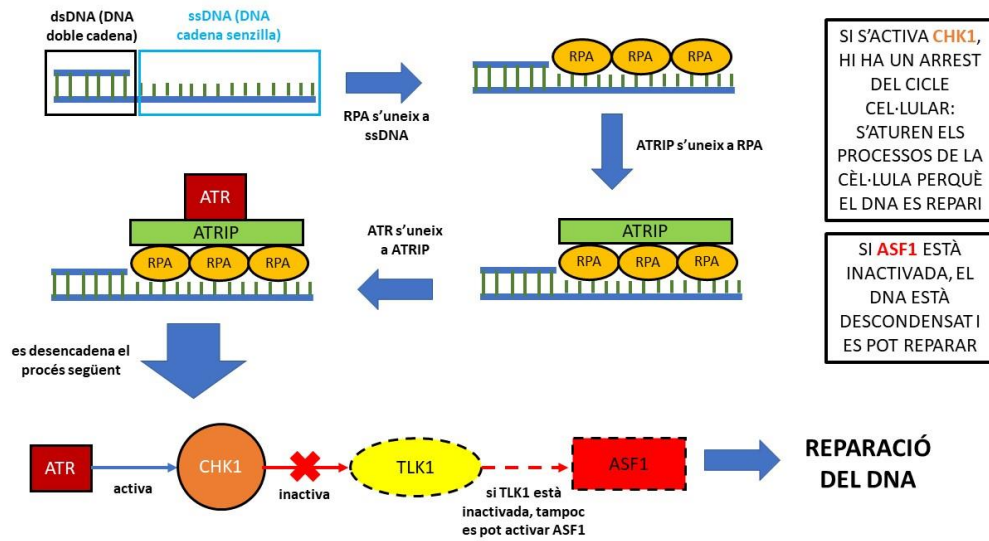


Figura 7. Esquema de la via ATR-Chk1 de reparació del dany al DNA. El contorn continu indica que la proteïna està activada, i el discontinu, que està inactivada. Font pròpia.

2.2.4. siRNA per silenciar les TLK

Actualment, hi ha una gran varietat de tècniques utilitzades als laboratoris de biologia molecular per silenciar, és a dir, inhibir l'expressió d'un gen i que, per tant, no es produeixi la proteïna que codifica.

Els siRNA (small interfering RNA) són petites molècules d'RNA, àcid ribonucleic, d'uns 20-30 nucleòtids de llargada i són bicatenàries. Aquestes molècules tenen complementarietat de bases per a un mRNA específic (veure apartat 2.5.2.), pel que, en unir-s'hi, el missatge d'aquest no pot ser llegit pel ribosoma i la proteïna no es pot produir (Figura 8) (15). Per exemple, siTLK1 serà un siRNA que s'unirà a l'mRNA sintetitzat a partir del gen de TLK1. Quan s'hi uneixi, tota una maquinària s'activarà i aquest mRNA serà degradat, i la proteïna TLK1, no es podrà sintetitzar.

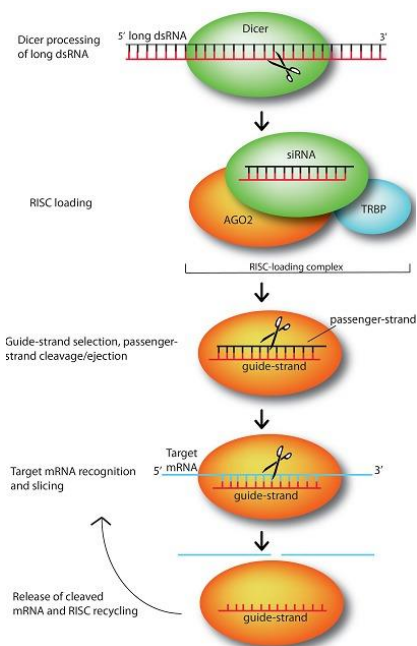


Figura 8. Procés de síntesi i funcionament d'un siRNA. Es pot observar com, a partir d'una doble cadena d'RNA llarga, mitjançant el Dicer, s'obtenen petits fragments de la doble cadena, que són els siRNA, dels quals només la cadena antisentit (la cadena guia) s'uneix al complex RISC. Després, la cadena guia hibrida amb l'mRNA complementari, i el RISC catalitzarà el trencament d'aquest. Finalment, s'allibera l'mRNA tallat, que serà posteriorment degradat, i el RISC, amb la cadena guia, buscarà un altre mRNA per tallar. Font: "Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA".

2.3. Les PARP

Les PARP, unes altres proteïnes que s'han estudiat en aquest Treball de Recerca, també estan molt relacionades amb la reparació de danys en el DNA, més concretament, "single strand breaks".

Dintre del grup de proteïnes reparadores del DNA, es troben les poli (ADP-ribosa) polimerases, les PARP, que tenen un paper molt important a l'hora de mantenir l'estabilitat genòmica e les cèl·lules.

Les PARP estan formades, a grans trets, per quatre dominis: el domini d'unió al DNA, el domini d'unió a caspases⁴, el domini d'auto-modificació i el lloc actiu. En el domini d'unió al DNA, on hi ha un ió zinc, la PARP formarà un complex amb el DNA, per la qual cosa l'enzim canviarà la seva conformació i el lloc actiu catalitzarà la polimerització necessària per reparar el DNA. El domini d'unió a caspases té un rol important en l'apoptosi o mort cel·lular programada, i és el lloc on la caspasa actua tallant la PARP i inactivant-la.

Quan hi ha massa dany al DNA com per ser reparat, les caspases inactiven les PARP tallant-les, i dirigeixen el procés d'apoptosi. Finalment, el domini d'auto-modificació és el que s'encarrega de la separació de la PARP del DNA quan la polimerització ha acabat (16).

2.3.1. Funció de les PARP

La funció principal de les PARP és la de detectar i reparar els "single-strand breaks" (SSB) o trencaments d'una sola cadena del DNA. Les PARP s'uneixen a aquestes lesions del DNA i sintetitzen una cadena PAR (poli ADP-ribosa), que serveix per iniciar i amplificar la resposta de reparació dels SSB, atraient altres proteïnes involucrades en la reparació del DNA. Després de la reparació del SSB, la cadena PAR, que pot arribar a mesurar 200 nucleòtids, és degradada.

També manté la inestabilitat genòmica, ja que la cadena PAR inicia la resposta al dany al DNA específica per a SSB i perquè, sense les PARP, es creen aberracions cromosòmiques. Les PARP tenen un paper important en l'apoptosi, ja que és tallada per les caspases quan la cèl·lula decideix entrar en el procés de mort cel·lular programada.

La creació de la cadena PAR relaxa la cromatina i la descondensa. Per això, es pot afirmar que té un paper en l'estructura de la cromatina. Així, els enzims de reparació del DNA poden accedir més fàcilment a les lesions d'aquest (17).

⁴ Enzims que s'activen de forma encadenada i són els principals reguladors de l'apoptosi.

2.3.2. Inhibidors de les PARP: olaparib

Últimament s'ha popularitzat l'ús de tractaments per a determinats tipus càncer de mama orientats en els inhibidors de les PARP. Especialment aquells que han desenvolupat una dependència en aquestes proteïnes per reparar el DNA, com els tumors que tenen BRCA mutat, un gen que també intervé en la reparació del DNA. Com té un gen de reparació de DNA mutat, ha de dependre d'altres gens de reparació del DNA, i si s'inhibeix aquest mitjançant inhibidors de les PARP, les cèl·lules canceroses no tindran sobre què recolzar-se per seguir proliferant.

L'olaparib és un compost sintètic comercialitzat sota el nom de "Lynparza" des del desembre de 2014, ja que l'Administració d'Aliments i Fàrmacs dels Estats Units i l'Agència Europea de Medicaments van aprovar el seu ús per a tractar el càncer d'ovari amb BRCA mutada, i des del gener de 2018, per a tractar també els càncers de mama amb el mateix gen mutat. La seva fórmula molecular és $C_{24}H_{23}FN_4O_3$ i la seva massa molar, 435,08 g/mol. La via d'administració és oral i el tractament es basa en prendre 400 mg d'olaparib dues vegades al dia (Figura 9).

Se sol receptar en casos de càncer de mama, d'ovari i de pròstata que no responen als tractaments habituals. Els efectes secundaris més recurrents són: nàusees, fatiga general, dolors musculars, anèmia i somnolència (18).

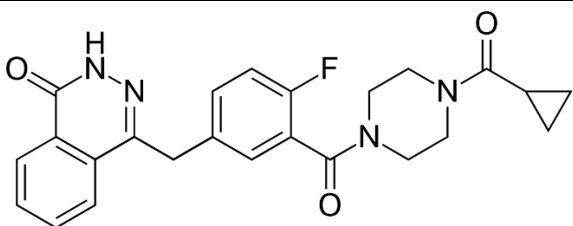
Fórmula estructural	
Fórmula molecular	$C_{24}H_{23}FN_4O_3$
Massa molar	435,08 g/mol
Via d'administració	Oral
Nom comercial	Lynparza

Figura 9. Es pot observar tant en la fórmula estructural com en la molecular que es tracta d'una molècula sintètica, que conté dos anells aromàtics, i tres altres cicles. Conté àtoms de F, N i O, encara que molt menys abundants que els de C i H. Té una massa molar elevada, la via d'administració és oral i es comercialitza sota el nom de "Lynparza". Font pròpia.

2.4. Les BRCA

BRCA són unes altres proteïnes que, en ser la seva funció reparar un altre tipus de lesions en el DNA, també estan relacionades amb un dels "hallmarks" del càncer esmentat anteriorment. Amb això podem veure que hi ha moltes proteïnes i maquinàries que funcionen coordinadament per reparar els danys en el DNA.

En de les proteïnes de reparació del DNA, es troba la família de BRCA, que s'encarrega de reparar els trencaments de doble cadena (DSB). Més específicament, les BRCA reparen els danys de doble cadena mitjançant

recombinació homòloga, en la qual es necessita “consultar” la informació que conté la cromàtida germana. Aquestes proteïnes estan molt presents en els teixits de la mama.

Gràcies a la famosa actriu Angelina Jolie, aquests gens s’han popularitzat. El 14 de maig de 2013, Angelina va anunciar que tenia el gen BRCA1 mutat i que això li conferia un 87% de probabilitats de patir càncer de mama i un 50% de patir-ne d’ovari. Donades les circumstàncies, va decidir que volia disminuir el risc de tenir càncer de mama. Per això, va començar fent un tractament dolorós per conservar els mugrons el 2 de febrer. Més endavant, va fer-se una doble mastectomia preventiva, en la qual li van extreure els dos pits i li van posar implants temporals. Més tard, va acabar el tractament amb la reconstrucció dels pits, on li van posar els implants definitius. Gràcies a això, va baixar el seu risc del 87% al 5% (19).

2.4.1. BRCA1

BRCA1 (breast cancer 1) és un gen que es troba en el cromosoma 17 que codifica per la proteïna BRCA1⁵ (Figura 10). Va ser descobert per Mary-Claire King’s l’any 1990. És un gen supressor de tumors, és a dir, que si funciona correctament, ajuda a que les cèl·lules no creixin més del normal. Es creu que la majoria de modificacions en el genoma que causen càncer són mutacions dels gens supressors. Si els gens supressors no funcionen correctament, els altres gens s’aniran danyant amb el temps. De fet, cal que els dos al·lels d’un gen supressor estiguin mutats per veure un fenotip. Dintre dels gens supressors de tumors, es podria classificar a BRCA1 com un gen “caretaker” (cuidador), que s’encarrega de mantenir la integritat del genoma i a no crear inestabilitat genòmica (20).

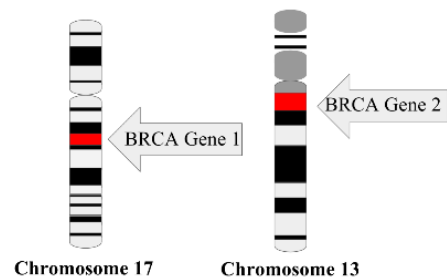


Figura 10. Representació esquemàtica dels cromosomes on es troba el gen de BRCA1 i de BRCA2. Font: https://en.wikipedia.org/wiki/File:BRCA_Genes.svg

La proteïna conté principalment 4 dominis: un dit de zinc RING, el domini de serina, i dos extrems C-terminal. Un dit de zinc és un domini que conté un o més cations⁶ de zinc que ajuden a estabilitzar la forma de la proteïna. Els dits de zinc RING (really interesting new gene) contenen una seqüència definida dels aminoàcids cisteïna i histidina. El domini de serina -un aminoàcid- és el lloc on es fosforila aquesta proteïna i, per tant, per on s’activa. Els dominis C-terminal són els llocs on s’uneix al DNA per reparar-lo. BRCA1 interacciona amb γ -H2AX, una proteïna que també intervé en la reparació de DSB (double-strand breaks) i que és un marcador de dany al DNA de doble cadena (21).

⁵ Per tal de distingir entre gens i proteïnes, els gens s’escriuen en cursiva i les proteïnes, no.

⁶ Ions positius: àtoms que s’han quedat carregats positivament perquè han perdut electrons, els quals tenen càrrega negativa.

2.4.2. BRCA2

BRCA2 (breast cancer 2) també és un gen supressor de tumors, un gen cuidador, que es troba al cromosoma 13 (Figura 10). Va ser descobert l'any 1994 per Michael Stratton i Richard Wooster. Està implicat, igual que *BRCA1*, en la detecció i reparació del dany al DNA, i la proteïna que codifica, *BRCA2*, interacciona amb *RAD51*, una proteïna que intervé en la reparació del DNA. D'aquesta manera, *BRCA2* s'uneix al DNA i activa *RAD51*, qui, per recombinació homòloga, repararà el fragment de DNA. Les lesions poden ser causades tant per agents exògens com endògens.

A més, aquesta proteïna també intervé en la meiosi, el procés de formació de cèl·lules reproductores, i si un organisme no la té, desenvolupa esterilitat. Tot i que les dues proteïnes es troben en cromosomes diferents i tenen una estructura diferent, compleixen funcions similars (21).

2.4.3. Mutacions en les BRCA i càncer

El fet de tenir mutats els gens *BRCA1* i *BRCA2* pot augmentar considerablement les probabilitats de patir càncer de mama. Un 72% de les dones que tinguin *BRCA1* mutat, i un 69% de les dones que tinguin el gen *BRCA2* mutat hauran tingut càncer de mama als 80 anys. D'altra banda, un 44% de les dones que hereten *BRCA1* mutat i un 26% de les que hereten *BRCA2* mutat hauran tingut càncer d'ovari als 80 anys.

A més, les dones que tenen tant *BRCA1* com *BRCA2* mutat tenen un 87% de probabilitats de tenir càncer de mama. A més, també s'augmenta la probabilitat de tenir càncer de trompes de Fal·lopi i de peritonè i, en homes, càncer de pit i de pròstata. Són dades sorprenentment altes, per les quals, les persones que tenen un d'aquests dos gens mutats tenen moltes més probabilitats, en comparació amb la resta de la població, de tenir càncer d'algun dels tipus esmentats anteriorment. La majoria de persones que tenen mutacions en *BRCA1* o *BRCA2* i tenen un càncer de mama, aquest sol ser triple negatiu, que tenen mal pronòstic (22).

Una persona que té antecedents familiars de càncer de mama, ovari, trompes de Fal·lopi o altres en els quals *BRCA1* o *BRCA2* està implicat, pot anar a unitats de consell genètic, en les quals se'ls pot elaborar un arbre genealògic i decidir si val la pena o no veure si els gens estan mutats. A Catalunya, l'Institut Català d'Oncologia (ICO) ofereix un programa de Consell Genètic, en el qual les persones que decideixen anar-hi són informades del que comporta tenir gens mutats i en cas que els tinguin, entren en un protocol individualitzat en el qual es realitza un seguiment del pacient exhaustiu i se li ofereixen solucions per poder prevenir el càncer en qüestió

Si el resultat és positiu, el pacient haurà de fer molts més exàmens (mamografies, ecografies...) a fi de prevenir el tumor. També es pot fer cirurgia profilàctica -la d'Angelina Jolie- fent una doble mastectomia profilàctica i/o una

salpingooforectomia profilàctica⁷. Finalment, es pot fer quimioprofilaxis, és a dir, l'ús de quimioteràpia de forma preventiva. (23).

Últimament s'ha popularitzat força l'ús d'inhibidors de les PARP per a tractar càncers de mama amb *BRCA* mutats. Les PARP, com són també proteïnes encarregades de reparar el DNA danyat, si s'inhibeixen aquestes en càncers on les PARP, en estar mutades, tampoc són funcionals, s'acumularan moltes més mutacions en el DNA, pel que al final les cèl·lules tumorals moriran. Això és el que es coneix com a "synthetic lethality" (Figura 11): si s'inhibeix un gen A (*BRCA*), la cèl·lula no està afectada, si s'inhibeix un gen B (*PARP*), la cèl·lula tampoc està afectada. Però si s'inhibeixen els dos gens, la cèl·lula mor. Per tant, les PARP no funcionen i es formen SSB (single strand breaks) en el DNA, els quals, si no són reparats, es converteixen en DSB (double strand breaks), que en teoria haurien de ser reparats per *BRCA1* i *BRCA2*, però que, en estar mutades, no funcionen correctament i els DSB romanen sense reparar-se, causant així estrès replicatiu i la mort de la cèl·lula (24 i 25).

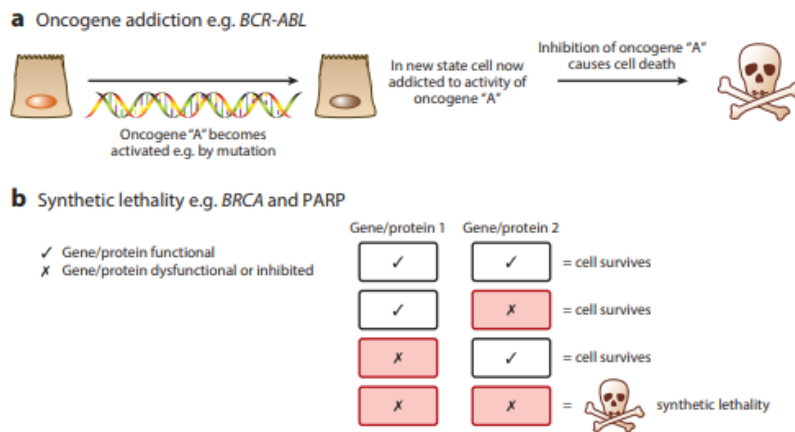


Figura 11. Es resumeixen i s'expliquen de forma gràfica els dos conceptes genètics més importants per al tractament del càncer: l'addicció a oncogenes, on una cèl·lula tumoral depèn d'un oncogen i si aquest s'inhibeix, i la "synthetic lethality", on la combinació de dos gens que, inhibits per separat no causen cap efecte en la cèl·lula, però inhibits simultàniament, provoquen la seva mort. Font: "Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors".

2.5. EL DNA

Les proteïnes TLK1, TLK2, PARP i *BRCA1* formen part del mecanisme de reparació del DNA, la "DDR pathway". Però per què tantes maneres de reparar una molècula? Segurament és perquè el DNA és molt important i qualsevol error en la seva seqüència o en alguns dels seus processos pot resultar fatal per la cèl·lula.

El DNA (deoxyribonucleic acid, àcid desoxiribonucleic) és una de les molècules més imprescindibles per als éssers vius. El seu nom aporta informació de la seva composició i característiques: "àcid" -conté un àcid fosfòric, un grup fosfat-, "desoxiribo-" -conté una desoxiribosa, un sucre que li falta un àtom d'oxigen- i "-nucleic" -es troba al nucli de la cèl·lula-

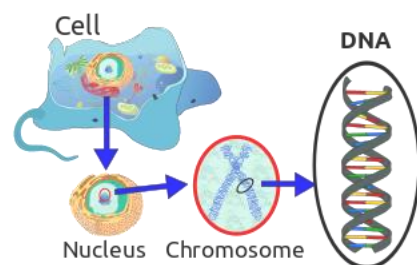


Figura 12. Esquema explicatiu de la localització del DNA. Font: https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Eukaryote_DNA-en.svg

⁷ Extirpació, de forma preventiva, de les trompes de Fal·lopi i dels ovaris.

(Figura 12). Aquesta molècula va ser descoberta l'any 1953 per James Watson, Francis Crick, els quals no ho haguessin pogut fer sense els experiments de Rosalind Franklin i Maurice Wilkins.

El DNA és un polímer, una gran i llarga molècula formada per monòmers, que són els nucleòtids, units entre si per enllaços fosfodièster, que són enllaços covalents, pel que són molt forts i difícils de trencar. Cada monòmer que el constitueix s'anomena "nucleòtid".

El DNA normalment és bicatenari, formant una doble hèlix, amb les dues cadenes antiparal·leles. Les dues cadenes s'uneixen entre elles per ponts d'hidrogen, enllaços molt dèbils que es trenquen contínuament i tenen una vida molt curta. L'adenina sempre s'uneix amb la timina, formant dos enllaços, i la guanina amb la citosina, formant-ne tres.

En el DNA hi ha unes seqüències de nucleòtids, anomenades "gens" que contenen informació molt valuosa. Cada gen conté la informació necessària per a formar una proteïna, que les proteïnes són les macromolècules que formen part de moltes estructures de les cèl·lules, i compleixen funcions específiques en el nostre cos.

La funció principal d'aquesta biomolècula és l'emmagatzematge de la informació hereditària, que es passa dels progenitors a la descendència, la codificació de proteïnes, en els quals intervenen els processos de la transcripció i la traducció (en aquest Treball de Recerca, no em centraré molt en el procés de la traducció), i en l'autoduplicació del DNA, anomenada "replicació del DNA" (26 i 27).

2.5.1. Replicació

El DNA s'ha de duplicar cada cop que la cèl·lula entra en el procés de divisió cel·lular, també anomenat "mitosi". En la mitosi, es generen dues cèl·lules filles idèntiques a la cèl·lula inicial. Per tal de fer això, és necessari que el material genètic es dupliqui durant la fase S del cicle cel·lular: si una cèl·lula humana somàtica⁸ té 46 cromosomes (23 parells de cromosomes homòlegs), i es divideix sense haver duplicat prèviament el seu material genètic, cada cèl·lula filla només tindrà 23 cromosomes, i aquesta no podrà funcionar correctament. Perquè les cèl·lules filles tinguin la mateixa quantitat de material genètic que la inicial, aquesta duplica el nombre de cromosomes que té (de manera que el nucli en conté 92), i quan la cèl·lula es divideixi, cada nova cèl·lula tindrà 46 cromosomes.

Tot el DNA no es pot duplicar sencer d'una sola vegada: el DNA es una molècula massa llarga i el nucli un orgànul cel·lular massa petit com per fer això possible.

⁸ Cèl·lula que té tot el material genètic complet. Les sexuals, en canvi, en tenen la meitat.

El DNA es replica en uns llocs específics, unes seqüències de nucleòtids determinades, anomenades “òrgens de replicació”. En cada origen de replicació es forma una estructura, denominada “forqueta de replicació”, que es forma en obrir les dues cadenes de DNA. Aquesta forqueta de replicació forma una estructura major, anomenada “bombolla de replicació”, la qual anirà avançant per la macromolècula i l’anirà replicant (Figura 13).

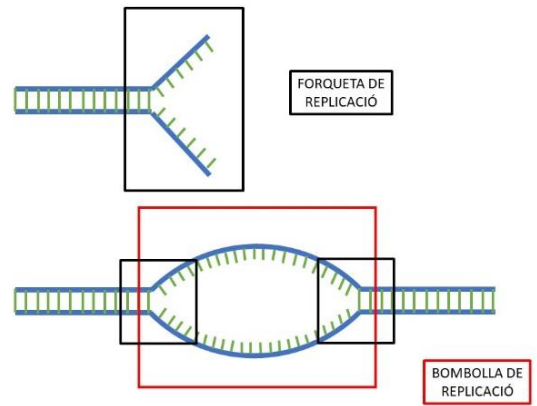


Figura 13. Representació esquemàtica de la forqueta i la bombolla de replicació. Font pròpia.

El replisoma és la maquinària de la transcripció, tot el conjunt d'enzims i altres proteïnes que funcionen com una única unitat amb la finalitat de replicar el DNA. Està format per polimerases, proteïnes d'adhesió a cadena senzilla, l'helicasa, topoisomerases (segons el Dr. Felipe Cortés, n'hi ha de dos tipus: la I i la II), la ligasa, etc. (28 i 29) (Figura 14).

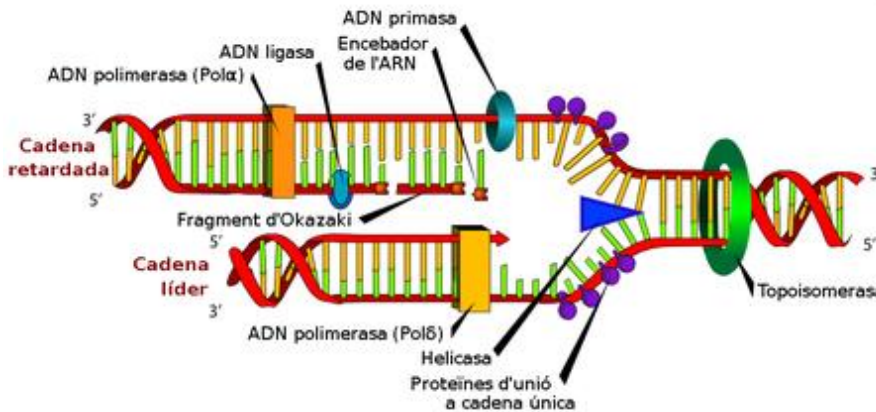


Figura 14. Representació esquemàtica del procés de replicació. Es pot veure com la topoisomerasa desenrotlla el DNA, l'helicasa separa les dues cadenes, les proteïnes d'adhesió a cadena única s'uneixen al DNA, la primasa sintetitza els encebadors, les polimerases sintetitzen les cadenes complementàries i les primases uneixen els fragments d'Okazaki de la cadena retardada. Font:

https://ca.wikipedia.org/wiki/Fitxer:Replicaci%C3%B3_de_%27ADN.PNG Si pitgeu sobre la imatge, podreu veure un vídeo explicatiu que el recomano francament per entendre el procés de la replicació. També el podeu trobar en aquest enllaç: <https://www.youtube.com/watch?v=YqjbrQcyfM>.

2.5.2. Transcripció

Per a què els gens expressin la informació que contenen, el primer pas que cal seguir és que se sintetitzi una molècula missatgera que porti la informació del DNA a l'exterior del nucli. Segons el conegut dogma de la biologia molecular, a partir de DNA, s'obté RNA mitjançant el procés de la transcripció i a partir d'aquest RNA, s'obté una proteïna mitjançant el procés de la traducció.

El DNA es troba en el nucli cel·lular, l'òrgànul més important de la cèl·lula eucariota (controla tota la seva activitat bioquímica), perquè és un òrgànul que, a diferència de molts altres, té una doble membrana, el que confereix més protecció al material que conté. En la doble membrana del nucli hi ha uns petits orificis pels quals circulen molècules que o bé entren o bé surten d'aquest, però la doble cadena de DNA és massa ampla com per cabre per un porus nuclear, de forma que la macromolècula portadora d'informació no pot sortir d'aquest. Aleshores, com pot sortir la informació que conté del nucli i regular tota la cèl·lula? Amb una altra

molècula, similar al DNA, però amb una sola cadena, la qual sí que pot travessar un porus nuclear i sortir del nucli. Aquesta molècula és l'RNA, més específicament, l'mRNA (RNA missatger). L'RNA (àcid ribonucleic) és un altre àcid nucleic, es diferencia amb el DNA en què és monoatenari, té una ribosa en comptes d'una desoxiribosa, i que en comptes de tenir timina, té uracil (30 i 31).

2.5.3. Dany en el DNA

Dia a dia, el DNA de cada una de les cèl·lules del nostre cos és danyat. Aproximadament, cada cèl·lula experimenta entre 10^4 i 10^5 lesions en el DNA cada dia. Tal com em va explicar el Dr. José Antonio Tercero, el dany pot ser causat per molècules molt reactives (ROS, agents alquilants...), agents exògens (llum ultraviolada, radiacions...), errors en la replicació dels cromosomes i l'estrès replicatiu. El fet que es provoquin danys en la cadena de DNA pot afectar greument la funció d'un gen, la compactació del DNA amb les histones o, fins i tot, pot ocasionar estructures cromosòmiques aberrants.

En el DNA, es poden formar dos tipus de lesions força freqüents (Figura 15):

- SSB (single-strand break): un petit tall en una de les dues cadenes del DNA. Es pot reparar fàcilment i no és molt perillós. No confondre amb el ssDNA, el qual és una cadena senzilla de DNA, que es genera en un forqueta aturada, a causa de l'estrès replicatiu.
- DSB (double-strand break): un tall en les dues cadenes del DNA. La macromolècula, per tant, se separa en dos fragments. És la més violenta de les lesions al DNA, i és més difícil de reparar que els SSB. Els double-strand breaks es poden generar de dues maneres diferents:
 - A partir d'un ssDNA en una forqueta aturada, al qual se li ha unit la proteïna RPA i ha passat molt temps sense reparar-se aquesta estructura; al final, es forma un DSB (13).
 - Si dos SSB, un en cada cadena, es troben molt a prop en el DNA: al final es trenca la macromolècula totalment, en forma de DSB (32).

S'ha demostrat que en cèl·lules canceroses hi ha dany al DNA i tenen la via de reparació de danys del DNA activada, tot i que, encara no se sap per què, la resposta de reparació del DNA danyat va disminuint amb el temps, encara que les lesions segueixin existint.

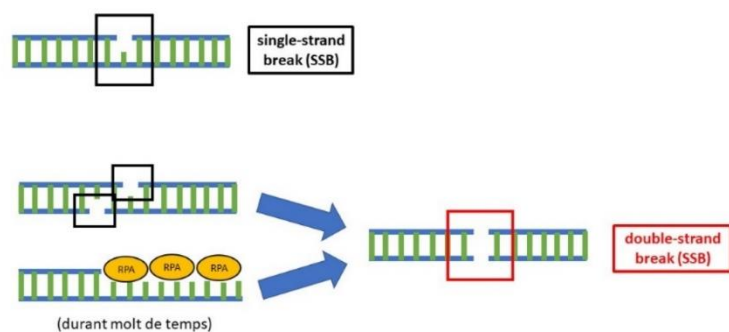


Figura 15. Formació dels SSB i DSB. Font pròpia.

2.6. L'ESTRÈS REPLICATIU

Aquest Treball de Recerca es basa en silenciar o inhibir algunes proteïnes que tenen rols importants en l'estabilitat genòmica. L'estrès replicatiu pot aparèixer si aquesta estabilitat es perd.

Determinades situacions poden afectar el procés de la replicació del DNA: substàncies químiques, proteïnes o processos cel·lulars sencers. Si la replicació no pot finalitzar d'una forma adequada, diem que la cèl·lula està sofrint "estrès replicatiu".

2.6.1. Descripció de l'estrès replicatiu

En ser una situació poc estudiada en relació amb altres aspectes de biologia molecular, i com encara és necessari elucidar molts mecanismes i altres proteïnes que intervenen en aquest tipus d'estrès, la definició del que és encara no és molt clara, però hi ha aproximacions que poden ser útils per entendre què és.

L'estrès replicatiu es pot definir com a aquella situació, aquell estrès que sofreix el DNA quan s'està replicant (en la fase S del cicle cel·lular) i que provoca que no es pugui replicar un gen correctament. Segons Michelle K. Zeman i Karlene A. Cimprich, és el fet que un gen es repliqui molt més lent del normal, o no s'acabi de replicar, i hi hagi un "fork stalling", una aturada de la forqueta de replicació, la qual es queda oberta, esperant a que se solucioni la causa de l'estrès replicatiu.

En canvi, segons Matthias Dobbstein i Claus Storgaard Sørensen, és la replicació del DNA on hi ha "fork stalling" i col·lapse d'aquesta, acompanyada de senyalització de resposta al dany al DNA i/o mitosis prematures (12 i 13). Com hi ha moltes causes diferents d'aquest estrès, cada cop s'està investigant més, perquè molts errors en el DNA se li poden atribuir, i les múltiples causes que té fan que pugui ser un fet molt present en els fets que concerneixen les dificultats de realitzar processos del DNA (32).

2.6.2. Causes de l'estrès replicatiu

L'estrès replicatiu és causat per moltes circumstàncies diferents, que poden ser danys directes en el DNA o no. Els oncogens, gens que faciliten l'aparició d'un càncer, són els causants de gairebé totes les maneres d'aparició de l'estrès replicatiu (lesions en el DNA, desregulació d'orígens de replicació, xocs de maquinàries de replicació i transcripció, etc.), segons la Dra. Neus Agell, que, assegura que els oncogens generen estrès replicatiu, i aquest, dany en el DNA. Les més importants i significatives són les següents:

- Talls, forats buits o seqüències allargades de DNA: molts mecanismes de reparació del DNA, com NHEJ o MMEJ, creen petits forats en una cadena de DNA. Si la maquinària de replicació troba els petits talls en una sola cadena (SSB), es poden convertir en DBS i generar més estrès replicatiu.

- Lesions en el DNA: tant les produïdes de forma endògena com les de forma exògena poden ser un obstacle per a què la polimerasa avanci, de manera que la replicació s'atura.
- Polimerització amb rNTPs en comptes de dNTPs: tot i que les DNA polimerases són molt més específiques per a dNTPs que per a rNTPs, alguna vegada poden polimeritzar amb els últims, formant-se així estructures aberrants i ssDNA, pel que es produeix estrès replicatiu.
- Formació d'estructures secundàries del DNA i pèrdua d'helicases: quan hi ha seqüències repetitives, es poden formar enllaços entre nucleòtids, que provoquen un canvi en la conformació de doble hèlix que té (Figura 16). Això provoca que el gen s'expandeixi o es contraigui, de manera que no es pot replicar correctament, perquè la polimerasa no pot llegir el DNA. A més, si les helicases que els desfan no funcionen, les estructures continuen existint, per la qual cosa el gen no es podrà replicar correctament.
- Xocs entre el replisoma i la maquinària de transcripció: com són dues maquinàries proteiques que funcionen amb el DNA, és normal que puguin xocar una amb l'altra. Com el replisoma no pot continuar, es forma una "stalled fork" i es genera ssDNA que, si no es repara, pot donar lloc a DSB. Els oncogens, que es repliquen molt, són els principals causants d'aquesta causa d'estrès replicatiu, ja que la maquinària de transcripció està molt activa en les regions del genoma pertanyents als oncogens.
- Iniciació de la replicació en més orígens del compte o en menys orígens del compte: si es limita el nombre d'orígens de replicació, s'incrementarà l'estrès replicatiu -ja que la replicació anirà més lent que de normal-, i hi haurà inestabilitat genòmica. En canvi, la sobreexpressió d'alguns oncogens, com Myc o Ras, provoca un augment del nombre d'orígens a l'hora de replicar. Aleshores, com es comença la replicació per molts punts del genoma a la vegada, les reserves de nucleòtids s'acabaran i la replicació no es podrà acabar, pel que també augmentarà l'estrès replicatiu (Figura 17).

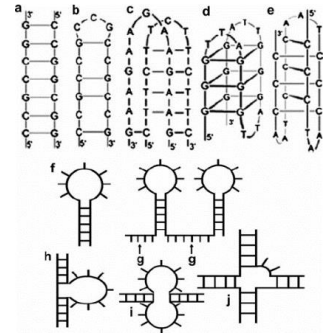


Figura 16. Diferents tipus d'estructures secundàries del DNA. Font: "Pathological implications of nucleic acid interactions with proteins associated with neurodegenerative diseases".



Figura 17. Desregulació de la posada en marxa dels orígens de replicació. En verd, els orígens activats, i en gris, els desactivats. La primera situació és la normal, i la segona, és la que origina estrès replicatiu. Font: "DNA replication stress: from molecular mechanisms to human disease".

- Formació d'R-loops per falta de factors de processament de l'RNA: la pèrdua dels factors de processament de l'RNA disminueix el ritme de la transcripció i dificulta que el replisoma se separi del DNA. Segons el Dr. Pablo Huertas, això pot provocar que, quan un gen s'estigui transcrivint, l'mRNA que s'estigui sintetitzant hibridi amb una de les dues cadenes del DNA, formant així un R-loop. Aquesta estructura conté tres cadenes, una d'RNA que hibrida amb una altra de DNA i una ssDNA.

- Replicació de “llocs comuns fràgils”: quan el replisoma arriba a unes seqüències específiques que són molt sensibles a patir DSB. Es genera estrès replicatiu, però no hi ha una reducció de la velocitat de la forqueta de replicació, sinó que es creu que són causades perquè són gens grans als quals se'ls activen pocs orígens de replicació.
- Compactació de la cromatina: si la cromatina no està descondensada, el replisoma no pot actuar correctament. En l'heterocromatina, que està encara més condensada que l'eucromatina, hi haurà molt més estrès replicatiu (32) (Figura 18).

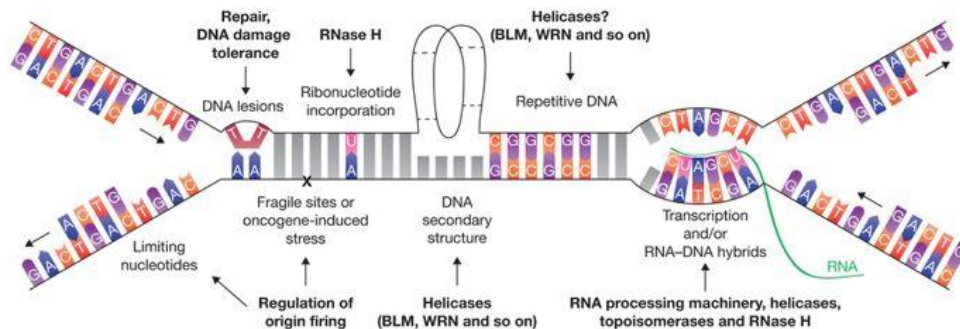


Figura 18. Es mostren les causes de l'estrès replicatiu esmentades anteriorment: lesions del DNA, regulació dels orígens de replicació, incorporació de rNTPs, estructures secundàries del DNA, seqüències repetitives de nucleòtids i R-loops. Font: "Causes and consequences of replication stress".

2.6.3. Conseqüències de l'estrès replicatiu

La conseqüència principal que provoca l'estrès replicatiu en el DNA és dany a aquest, perquè el “fork stalling” és produït per l'estrès replicatiu, per tant, es forma ssDNA que, si no es repara, acabarà transformant-se en DSB.

El col·lapse de les forquetes de replicació, un ritme baix de la replicació del DNA i un canvi en el ritme de la transcripció i els gens que es transcriuen provoquen danys al DNA, mutacions i malalties com el càncer.

La via ATR-Chk1 és la que s'encarrega de detectar aquests danys i reparar-los. Per tal de fer-ho, quan detecta una situació estranya en el metabolisme del DNA, CHK1 fa un arrest del cicle cel·lular, és a dir, que tots els processos que s'estan duent a terme en aquell moment a la cèl·lula s'aturen i aquesta se centra en reparar el DNA, la qual cosa té sentit, perquè sense DNA, la cèl·lula no “sap” fer res.

Els diferents mecanismes de la DDR s'activen, tant els que reparen SSB com els que reparen DSB. Si la reparació no té èxit, la cèl·lula decideix, per no afectar l'organisme, i que aquesta no segueixi creant més mutacions per acabar convertint-se en una cèl·lula cancerosa, entrar en senescència o apoptosi. La senescència és un procés que s'inicia per respondre a l'estrès i el dany que una cèl·lula pot rebre al llarg del cicle cel·lular. Les cèl·lules poden entrar en senescència per tres vies, principalment: un gran nombre de divisions cel·lulars (al final les cèl·lules filles

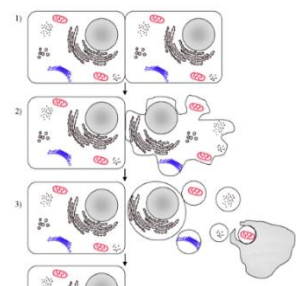


Figura 19. Procés de l'apoptosi. Font: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apoptosis-blank.png>

seran immortals i senescents), exposició a raigs UV (pot generar dany al DNA) i amb inhibidors del cicle cel·lular (no els deixen créixer). Les cèl·lules senescents no es poden dividir, de manera que s'evita que una cèl·lula així pugui crear un tumor, però segueixen metabòlicament actives, pel que segueixen vives (33).

L'apoptosi o mort cel·lular programada es podria entendre com una mena de "suïcidi cel·lular", on la cèl·lula, per tal de no afectar els teixits propers als quals es troba, decideix eliminar-se abans que convertir-se en una cèl·lula cancerosa (Figura 19). Intervenien unes proteïnes, denominades caspases i granzimes, que s'encarreguen de dirigir i controlar tot el procés.

Segons el Dr. Óscar Fernández-Capetillo, el fet que una cèl·lula entri en un estat o un altre depèn de la quantitat del dany al DNA i de l'òrgan al qual pertanyi la cèl·lula. Si, per exemple, una cèl·lula del pulmó ha d'entrar en apoptosi o senescència, entrarà en senescència perquè ajudarà a mantenir la morfologia de l'òrgan. En canvi, una cèl·lula epitelial, la qual no es necessària per mantenir la morfologia del teixit al qual pertany, entrarà en apoptosi (32).

2.6.4. L'estrès replicatiu com a diana per tractar el càncer

L'estrès replicatiu no té per què entendre's com un procés maligne, que assegura la no viabilitat de les cèl·lules i que provocarà danys en l'organisme. De fet, ens podem aprofitar d'ell per tractar certes malalties, com per exemple, el càncer. Molts tractaments que s'utilitzen contra el càncer estan dirigits a les proteïnes o processos que el causen.

Es pot augmentar l'estrès replicatiu d'una cèl·lula, inhibint o silenciant les proteïnes que el controlen o que mantenen l'estabilitat genòmica, de manera que es generin danys en el DNA i la cèl·lula hagi d'entrar en apoptosi o senescència (és a dir, que la cèl·lula esdevingui inactiva). En això es basa el meu Treball de Recerca: en inhibir proteïnes que mantenen l'estabilitat del genoma i que reparen els danys que es generen en aquest (TLK1, TLK2, PARP i BRCA1), per generar estrès replicatiu i que morin per apoptosi o entrin en senescència, de forma que s'aconseguiria una reducció del tumor, i més específicament, d'un tumor de càncer de mama, ja que les proteïnes BRCA1 i PARP estan orientades a un tractament del càncer de mama i les proteïnes TLK1 i TLK2 estan molt expressades en aquest tipus de càncer.

La majoria de tractaments estan pensats perquè les cèl·lules deixin de créixer, però potser són més prometedors aquells que produeixen que les cèl·lules canceroses es divideixin encara més ràpid, perquè d'aquesta manera, si tenen alguna mutació, no serà detectada pels mecanismes de reparació del DNA a temps, i moriran. Molts medicaments, sobretot els compostos amb platí, com el cisplatí, modifiquen el DNA, per tal que la polimerasa no pugui funcionar bé i, d'aquesta manera, es generen "stalled forks" i, conseqüentment, estrès replicatiu (12). Una altra manera més innovadora podria ser inhibir CHK1, participant de la cascada de senyalització de reparació del DNA, ATR-CHK1, de forma que els errors al DNA no es reparin i es generi estrès replicatiu (34).

3. TREBALL DE CAMP

Tot seguit, exposaré les finalitats, que té aquest TR, i part experimental explicada en altres subapartats.

3.1. Objectius

Un dels objectius d'aquest Treball de Recerca és aprendre què és el càncer, les característiques principals d'aquest i què necessita per ser perjudicial per a l'organisme. Més específicament, investigar sobre el càncer de mama, el tipus de càncer en el qual està enfocat aquest Treball de Recerca, ja que la teràpia pensada està dirigit a aquest; i també aprendre quina incidència poblacional té.

Un altre objectiu buscar informació en diferents articles científics sobre les proteïnes amb les quals he treballat (TLK1, TLK2, BRCA1 i PARP), per tenir una idea general de com funcionen. També, hauré d'aprofundir en els processos de la transcripció, la replicació, i en l'estructura bioquímica del DNA. Trobo que serà interessant indagar sobre els danys que es poden produir en aquesta biomolècula i sobre quin paper tenen els oncogenes en la formació i/o propagació del càncer.

Vull aprendre com es reparen les lesions del DNA, i quins mecanismes existeixen que formin part de la DNA Damage Response, tant els que serveixen per reparar SSB com els que reparen DSB. Un altre objectiu d'aquest Treball de Recerca és investigar què és l'estrès replicatiu, què el provoca i quins problemes pot generar, que afectin a una cèl·lula. Explorar les diferents maneres que existeixen per utilitzar l'estrès replicatiu en contra de les cèl·lules canceroses per tractar la malaltia.

L'objectiu principal d'aquest Treball de Recerca és estudiar l'existència d'una possible "synthetic lethality" entre *TLK1*, *TLK2*, *BRCA1* i *PARP*, i veure si pot ser utilitzada com un tractament per a càncer de mama amb el receptor d'estrogens positiu. Per això, volem veure si la inhibició de les proteïnes PARP mitjançant olaparib i de TLK1 i TLK2 mitjançant siTLK1 i siTLK2, en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada⁹ dificulta la proliferació cel·lular, observar si la inhibició de PARP amb olaparib i de TLK1 i TLK2 mitjançant siTLK1 i siTLK2, en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada dificulta la formació de colònies i finalment, també veure, amb la tècnica del Western Blot, si s'activen altres proteïnes de reparació del DNA (pRPA i γ H2AX) quan s'inhibeix PARP amb olaparib, i TLK1 i TLK2 amb siTLK1 i siTLK2, en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada i per tant, si s'ha generat estrès replicatiu.

3.2. Plantejament del treball

Per tal d'observar com les cèl·lules responen al tractament ideat i per veure si funciona tal com s'havia predit, és a dir, causant estrès replicatiu, i aquest dany al DNA, vam fer tres estudis diferents: un estudi de proliferació, un estudi de formació

⁹ Cèl·lules amb les proteïnes BRCA1 i BRCA2 inhibides.

de colònies (per a comprovar la viabilitat) i un Western Blot (per comprovar el dany al DNA amb les proteïnes pRPA i γ H2AX).

Vam tractar les cèl·lules amb olaparib en diferents concentracions, que inhibeix la proteïna PARP, i amb siTLK1 i siTLK2, que inhibeixen la traducció de les proteïnes TLK1 i TLK2, respectivament. Aquesta combinació de synthetic lethality pot ser un possible tractament per als pacients que tenen un càncer de mama amb el receptor d'estrògens positiu, ja que en un nombre elevat de casos, TLK2 està sobreexpressada: si la inhibim, juntament amb les altres proteïnes, estem dificultant la supervivència d'aquestes cèl·lules canceroses, que necessiten TLK2, ja que la sobreexpressen. A més, serà encara més efectiu si aquest pacient té una mutació en els gen BRCA1.

3.2.1. Problema a investigar

- El tractament amb olaparib, siTLK1 i siTLK2 en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada disminuirà el nombre de cèl·lules viables en les plaques de cultiu cel·lular?
- El tractament amb olaparib, siTLK1 i siTLK2 en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada dificultarà la formació de colònies en les plaques de cultiu cel·lular?
- El tractament amb olaparib, siTLK1 i siTLK2 en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada ocasionarà estrès replicatiu, i aquest, dany al DNA, pel que podem observar que les proteïnes pRPA i γ H2AX hi són presents?

3.2.2. Hipòtesi

- Potser el tractament amb olaparib, siTLK1 i siTLK2 en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada provocarà una disminució del nombre de cèl·lules vives en les plaques de cultiu cel·lular, pel que podem observar amb la tinció amb cristall violeta com ha disminuït el nombre de cèl·lules.
- Potser el tractament amb olaparib, siTLK1 i siTLK2 en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada dificultarà la formació de colònies en les plaques de cultiu cel·lular, pel que podem veure un nombre inferior de colònies mitjançant la tinció de cristall violeta.
- Potser el tractament amb olaparib, siTLK1 i siTLK2 en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada ocasionarà estrès replicatiu, i aquest, dany al DNA, pel que mitjançant un estudi amb Western blot podem observar:
 - La proteïna pRPA, que té un pes molecular de 30 kDa¹⁰ i que s'uneix al ssDNA / SSB.
 - La proteïna γ H2AX, el pes molecular de la qual és, aproximadament, 15 kDa, i s'uneix als DSB.

¹⁰ Unitat de pes que s'utilitza amb proteïnes. 1 Da / 1 uma és aproximadament la massa d'un protó. 1 kDa = 1.000 Da.

3.2.3. Disseny experimental

Vam dissenyar tres experiments per complir amb els objectius d'aquest Treball de Recerca:

Proliferació cel·lular:

Vam utilitzar plaques de cultiu cel·lular de 12 pouets les línies cel·lulars MDA-MB-436 i MDA-MB-231 (Figura 20). En cada pou, hi havia 20.000 cèl·lules de la línia cel·lular que pertoqués. És un nombre elevat de cèl·lules, però raonable per a un estudi de proliferació cel·lular, ja que es vol veure el creixement d'aquestes. Vam tractar algunes cèl·lules amb siGFP i algunes altres, amb siTLK1 i siTLK2 (variable independent 1). També vam tractar algunes cèl·lules amb Ø olaparib, olaparib 1 µM, olaparib 500 nM i olaparib 100 nM (variable independent 2). El grup control van ser les cèl·lules tractades amb siGFP, ja que les cèl·lules no tenien GFP i una transfecció causa un cert dany a la cèl·lula (per tant, al control també se l'ha de transfectar), i amb Ø olaparib, és a dir, només amb DMSO (dimetilsulfòxid, el dissolvent utilitzat per dissoldre l'olaparib), i és tòxic per a les cèl·lules, per tant, el control l'ha de tenir. Vam fer tres rèpliques de cada condició, perquè els resultats fossin més fiables. Vam fer tres time-points (0, el dia després de tractar-les, 3, tres dies després i 7, set dies) per veure l'evolució de les cèl·lules i observar la seva resposta al tractament. La variable dependent va ser la proliferació o no de les cèl·lules. Tot el procés el vam fer en les mateixes condicions de pressió, llum, temperatura i humitat, per mantenir constants les variables controlades. Vam tenyir les cèl·lules amb cristall violeta, i al cap d'un temps, se'ls va afegir àcid acètic per quantificar la seva absorbància, és a dir, la quantitat de color que tenen. D'aquesta manera, podríem saber la quantitat de cèl·lules que hi hauria. Amb les dades obtingudes, vam aplicar un Test Anova 2-way per veure si els tractaments són significatius o no.

Formació de colònies

En plaques de cultiu de 6 pouets, vam utilitzar les línies cel·lulars MDA-MB-436 (Figura 21) i MDA-MB-231. A cada pouet hi havia 1000 cèl·lules de la línia cel·lular que pertoqués. És un nombre de cèl·lules força petit, però adequat per a un estudi de formació de colònies, ja que volem veure com, a partir de poques cèl·lules, es formen aglomeracions de cèl·lules que s'han anat dividint contínuament a partir d'una inicial. Vam tractar algunes cèl·lules amb siGFP i d'altres, amb siTLK1 i siTLK2 (variable

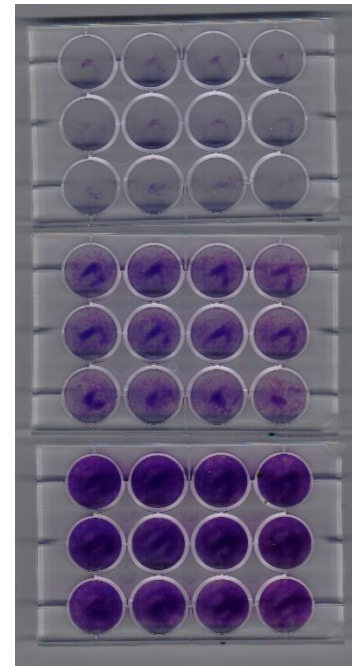


Figura 20. Proliferació cel·lular de MDA-MB-231 amb siGFP, del time-point 0, 3 i 7 (de dalt a baix). Veiem que com més temps passa, més creixen les cèl·lules. Font pròpia.

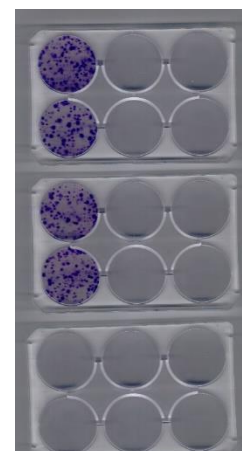


Figura 21. Formació de colònies de MDA-MB-436. Font pròpia.

independent 1). També vam tractar algunes cèl·lules amb Ø olaparib, olaparib 1 µM, olaparib 500 nM i olaparib 100 nM (variable independent 2). El grup control van ser els pouets amb cèl·lules tractades amb siGFP i Ø olaparib. Es van fer duplicats, per tant, dues rèpliques de cada condició, per tal d'obtenir resultats més fiables. La formació o no de colònies va ser la variable dependent. Vam fer tots els processos en les mateixes condicions de pressió, llum, temperatura i humitat, per mantenir constants les variables controlades. Vam utilitzar cristall violeta per tenyir les colònies, i al cap d'un temps, vam afegir àcid acètic per quantificar la seva absorbància, és a dir, la quantitat de color que tenien. D'aquesta manera, podríem saber la quantitat de cèl·lules que hi havia. Amb les dades obtingudes, vam aplicar un Test Anova 2-way per veure si els tractaments són significatius o no.

Western Blot

En plaques de 6 pouets, vam utilitzar les línies cel·lulars MDA-MB-436 i MDA-MB-231. Vam col·locar 300.000 cèl·lules de la línia cel·lular que pertoqués. Aquest és un nombre raonable de cèl·lules per a fer un Western-Blot, ja que no volem observar el seu creixement o si tenen capacitat per formar colònies: simplement volem obtenir una gran quantitat de proteïna, i per això necessitem moltes cèl·lules. Vam tractar algunes cèl·lules amb siGFP i algunes altres, amb siTLK1 i siTLK2 (variable independent 1). Addicionalment, també vam tractades algunes cèl·lules amb Ø olaparib, olaparib 1 µM, olaparib 500 nM i olaparib 100 nM (variable independent 2). El grup control van ser les cèl·lules tractades amb siGFP i Ø olaparib. No vam fer rèpliques, perquè només volíem obtenir proteïna a partir dels lisats de les cèl·lules. L'aparició o no de bandes pertanyents a pRPA i γH2AX en les membranes del Western Blot va ser la variable dependent (Figura 22). Vam fer tot el procés en les mateixes condicions de pressió, llum, temperatura i humitat.

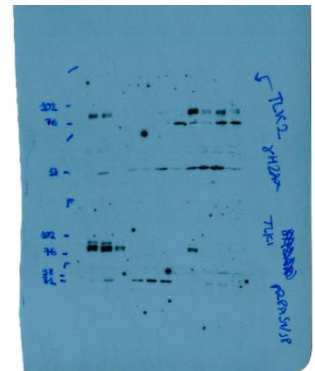


Figura 22. Film revelat del Western Blot. Font pròpia.

Per fer més visual el treball de camp realitzat al laboratori, vam fer aquest quadre temporalitzador:

24/7/2018	25/7/2018	26/7/2018	27/7/2018	30/7/2018
Preparació de medis. Tripsinització, comptatge i plaquejat de cèl·lules.	Silenciament dels gens <i>TLK1</i> i <i>TLK2</i> amb siRNAs.	Tripsinització, comptatge i plaquejat de cèl·lules.	Tractament de les cèl·lules amb olaparib. Tinció amb cristall violeta.	Tinció amb cristall violeta.

1/8/2018	2/8/2018	1/10/2018	2/10/2018
Preparació de mostres per al Western Blot.	Bloqueig, detecció de proteïnes i revelat del Western Blot.	Extracció amb àcid acètic.	Estudi del Western Blot i realització de la figura.
Preparació dels gels d'acrilamida.			
Càrrega, transferència, tinció Ponceau i bloqueig de la membrana.			

3.2.4. Resultats i anàlisi dels resultats

Proliferació cel·lular

A partir de les dades d'absorbància obtingudes, vam aplicar el test estadístic Anova (Analysis of Variance) two-way a aquestes, amb el programa Minitab. Vam escollir aquest test perquè permet veure si l'aplicació de dues variables independents alhora influencien de forma significativa a una variable dependent, en aquest cas, la proliferació cel·lular. És semblant a utilitzar dues proves t d'Student (un test estadístic força utilitzat), però l'Anova two-way no crea tant error. Els gràfics que vam obtenir són els següents:

Cèl·lules MDA-MB-436:

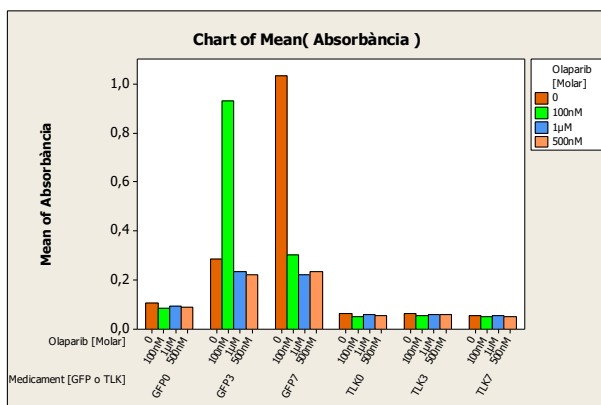


Figura 23. Gràfic de l'Anova 2-way aplicat a la proliferació de les cèl·lules MDA-MB-436. Font pròpia.

Cèl·lules MDA-MB-231:

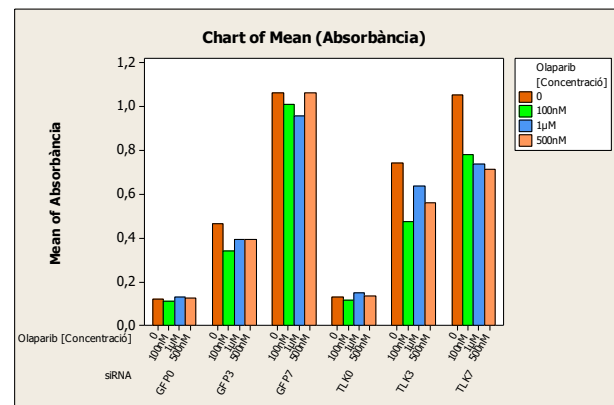


Figura 24. Gràfic del test Anova 2-way aplicat a la proliferació de les cèl·lules MDA-MB-231. Font pròpia.

- Cèl·lules MDA-MB-436:

Podem veure que silenciar les TLK crea resultats significatius, i ho podem comprovar perquè el valor de “p” és 0,000 (si és inferior a 0,05, és significatiu). Utilitzar olaparib en les cèl·lules on s’han silenciat les TLK no provoca una menor absorbància (es pot entendre com la “quantitat de cèl·lules”: major absorbància, més cèl·lules), ja que no és significatiu (el valor de “p” de l’olaparib en aquest cas és 0,258), i les diferències doncs, són atribuïbles a causes naturals.

En les cèl·lules control (siGFP) i sense olaparib, veiem un creixement cel·lular exponencial, el qual és normal. Observem que si utilitzem concentracions altes (1µM o 500 nM) d’olaparib, l’absorbància es redueix, però si utilitzem concentracions més baixes (100 nM), hi ha molta variància, pot ser que hi hagi molta o poca absorbància. Com varia tant, no és significatiu (el valor “p” d’utilitzar olaparib és de 0,258). No obstant, aquesta variància pot haver estat causada per un error en el procediment al laboratori. Per tant, silenciar les TLK disminueix significativament l’absorbància, i l’olaparib no causa cap efecte en aquestes cèl·lules, però sí que el causa en les cèl·lules en què no s’han silenciat TLK, encara que no sigui significatiu (Figura 23).

- Cèl·lules MDA-MB-231:

Veiem que l’absorbància de les cèl·lules amb les TLK silenciades i amb olaparib és menor que les control: el nombre de cèl·lules va augmentant al cap del temps (0 dies, 3 dies, 7 dies). Silenciar només les TLK (tres últimes barres teula), no provoca cap efecte en les cèl·lules, en comparació amb les control GFP (tres primeres barres teula), que són semblants. En canvi, silenciar les TLK i utilitzar olaparib (barres verda, blava i taronja) provoca una disminució significativa de l’absorbància, en comparació amb el control GFP (també verda, blava i taronja).

Tant en el control (GFP) com en les cèl·lules amb TLK silenciades, no utilitzar olaparib permet que les cèl·lules creixin, però quan l’utilitzem, el nombre de cèl·lules decau. En el control, no importa que utilitzem 100 nM, 500 nM o 1µM d’olaparib, són absorbàncies força semblants.

En conclusió, si silenciem TLK i utilitzem olaparib, el ritme de creixement de les cèl·lules és menor al del control. A més, els dos són significatius: els valor “p” de silenciar la TLK és 0,000 i el d’utilitzar olaparib és també de 0,000 (Figura 24).

Formació de colònies

També vam utilitzar el test Anova two-way per veure la significància de les dues variables independents (olaparib i siTLK) sobre una variable dependent (formació de colònies). Els gràfics obtinguts són els següents:

Cèl·lules MDA-MB-436:

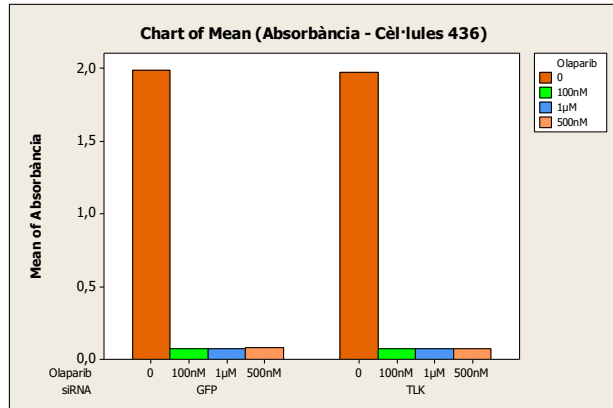


Figura 25. Gràfic de l'Anova 2-way de la formació de colònies de MDA-MB-436. Font pròpia.

Cèl·lules MDA-MB-231:

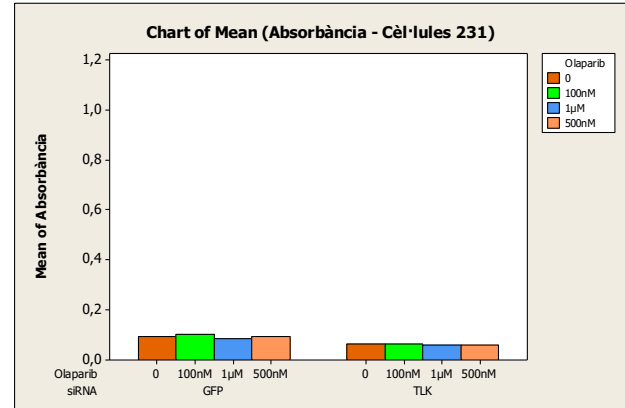


Figura 26. Gràfic del test estadístic Anova 2-way sobre la formació de colònies de la línia cel·lular MDA-MB-231. Font pròpia.

- Cèl·lules MDA-MB-436:

Observem que no hi ha cap diferència entre silenciar TLK o no, és a dir, que no hi ha diferències significatives (el valor "p" de la silenciació és 0,940). En canvi, si utilitzem olaparib, sí que hi ha diferències significatives (valor "p" de l'olaparib de 0,000). Per tant, silenciar les TLK no causa diferències significatives, però utilitzar l'olaparib sí, pel que a les cèl·lules els és més difícil formar colònies. Vam cometre un error en el plaquejat de cèl·lules i, en aquest experiment, es van plaquejar més de les que tocaven, vam cometre un error humà, molt comú en els laboratoris, pel que potser aquests resultats són deguts a això (Figura 25).

- Cèl·lules MDA-MB-231:

Veiem que, per petita que sigui, hi ha diferències significatives entre silenciar les TLK o no (el valor "p" del silenciament és de 0,000). En canvi, l'olaparib no causa diferències significatives: el seu valor "p" és de 0,096, un valor més gran que 0,05, però molt proper. Potser si tinguéssim més mostres es podria demostrar una diferència significativa, però amb les dades que tenim, no ho podem afirmar amb tanta certesa. Per tant, silenciar les TLK dificulta la formació de colònies, però no l'olaparib. Vam fer un petit error en aquest experiment i vam plaquejar menys cèl·lules del que tocava, pel que potser els resultats són deguts a això (Figura 26).

Western Blot

Un cop finalitzat el procés del Western Blot, vam obtenir els resultats següents:

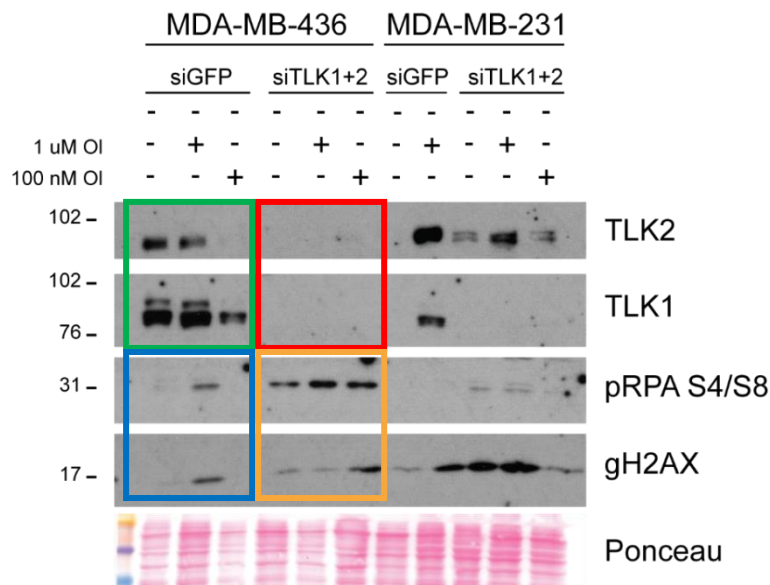


Figura 27. Films del Western Blot escanejats i identificats, amb un temps d'exposició de 30 minuts. A l'esquerra, part superior, es mostren les concentracions d'olaparib (OI), i a la part inferior, el marcador de pesos moleculars coneguts, els quals ens permeten identificar les proteïnes que cerquem. Com ja sabem el pes molecular de les proteïnes que estem estudiant, podem veure si la banda que apareix té un pes similar al que esperem i, conseqüentment, afirmar si es tracta de la nostra proteïna o no. Al centre, part superior, es troben les classificacions de les mostres (línia cel·lular, siRNA utilitzat i la

concentració d'olaparib utilitzada). Els signes positius (+) indiquen que a aquella mostra se li ha aplicat aquella concentració d'olaparib. Per exemple, la primera, és MDA-MB-436, siGFP i no té olaparib, i l'última, és MDA-MB-231, siTLK1+2, i té 100 nM d'olaparib. Hi ha sis mostres diferents de MDA-MB-436 (el que havíem previst fer al principi), però n'hi ha cinc de MDA-MB-231, perquè la mostra que hi hauria d'haver no va produir suficient proteïna com per carregar-la en el gel. Al centre, part inferior, es troben els gels i la tinció Ponceau, que ens permet veure la quantitat de proteïna a cada pou (com més fosc, més proteïna). A la dreta, apareixen els noms de les proteïnes que busquem en el gel. Font pròpia.

Western Blot

Membrana:

- TLK2: té un pes molecular proper als 86 kDa. En les mostres 1, 2, 8, 9, 10 i 11, apareix una banda, pel que està expressada. Segurament l'expressió de les tres últimes es deu a que no s'ha silenciat correctament el gen. Tot i així, són bandes dèbils, excepte les mostres 1, 8 i 10, que sí que són intenses. A més, hauríem d'esperar banda en les mostres 3 i 7, ja que no hem silenciat TLK1 i TLK2.
- TLK1: té un pes molecular d'aproximadament 86 kDa. En les mostres 1, 2, 3 i 8 hi ha una banda, pel que s'ha expressat. Per tant, podem veure que TLK1 s'ha silenciat millor que TLK2. Les bandes més intenses són la 1 i la 2. Les altres també ho són, però en menor grau. A més, hauríem de veure una banda en la mostra 7.
- pRPA S4/S8: els dominis S4/S8 de la proteïna fosforilada (p) RPA tenen un pes molecular de 31 kDa. En les mostres 2, 4, 5 i 6 apareix una banda, pel que la proteïna està expressada. Això demostra que s'ha format ssDNA, com a conseqüència de l'estrès replicatiu, que directament genera aquestes estructures. La proteïna RPA és la primera que s'uneix al ssDNA, i comença la via de la ATR-CHK1. Les bandes més intenses són la 5 i 6, ja que la 2 i la 4 són més lleugeres. Per tant, en les mostres 5 i 6 hi ha hagut més estrès replicatiu que no pas en les 2 i 4.
- γH2AX: el seu pes molecular és de 17 kDa. En les mostres 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 i 11 apareix una banda, pel que la proteïna està present. Això significa

que hi ha hagut DSB en el DNA, ja que γ H2AX és un marcador per a aquest tipus de lesions: si aquestes apareixen, γ H2AX s'hi uneix. Aquests DSB poden estar produïts per l'estrès replicatiu que s'ha generat en inhibir TLK1 i TLK2, i les PARP, en cèl·lules que, a més a més, també els faltava BRCA1. Les bandes més intenses són la 8, 9 i 10.

Quadre verd: no hem silenciats les TLK, pel que té sentit que estiguin expressades (apareixen bandes). **Quadre vermell:** hem silenciats les TLK, pel que té sentit que no estiguin expressades. **Quadre blau:** com una de les causes que genera estrès replicatiu és silenciar les TLK, i aquí no les hem silenciats, té sentit que no estiguin expressades RPA o γ H2AX, ja que són proteïnes marcadores de dany al DNA (generat per estrès replicatiu). Com no hi ha dany al DNA perquè no hem silenciats les TLK, no s'expressen RPA o γ H2AX. **Quadre taronja:** com sí que hem silenciats les TLK, i silenciar-les provoca estrès replicatiu (i aquest, a la vegada, dany al DNA), té sentit que RPA i γ H2AX s'hagin expressat.

Hem pogut comprovar que la silenciació de les TLK i la inhibició de PARP mitjançant olaparib comporta estrès replicatiu, i aquest, dany al DNA, ja que segurament s'han format ssDNA i DSB, als quals se'ls han unit RPA i γ H2AX, respectivament, ja que aquestes estan sobreexpressades. En les cèl·lules 436, les quals tenim en compte, perquè són en les quals s'han silenciats millor les TLK, s'ha expressat significativament la proteïna RPA en les mostres de les cèl·lules amb la silenciació de TLK1 i TLK2 i, en menor grau, γ H2AX seguint el mateix patró. Podem dir llavors que l'estrès replicatiu ha augmentat significativament en no haver-hi les TLK, pel que de forma directa, s'han format un major nombre de ssDNA, als quals se'ls uneix molt ràpidament RPA, per tant, això explica l'augment de l'expressió d'aquesta proteïna. També podem veure que hi ha una bona resposta per part de les cèl·lules a l'estrès replicatiu, ja que han reparat les forquetes aturades amb ssDNA abans que es formessin els DSB: aquest fet demostra perquè hi ha menys quantitat de γ H2AX que de RPA (Figura 27).

Tinció Ponceau:

Podem observar que en els pous 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 i 11 hi ha més quantitat de proteïna que en els pous 1, 3 i 5.

3.3. MATERIAL I MÈTODES

Preparació de medis

Durant la part experimental del Treball de Recerca, vam treballar amb dues línies cel·lulars diferents: MDA-MB-231 i MDA-MB-436. Es van escalfar els medis amb el bany Maria. La primera necessita el medi DMEM (Figura 28), Dulbecco's Modified Eagle's medium, (suplementant amb un 10% de FBS, fetal bovine serum i un 1% de P/S, penicillin/streptomycin) per al seu creixement òptim, i



Figura 28. Medi DMEM (Gibco). Font: <https://www.fishersci.se/shop/products/dmem-high-glucose-pyruvate-4/11594486>

la segona, RPMI, Roswell Park Memorial Institute, (suplementant amb un 10% de FBS i un 1% de P/S).

Tripsinització, comptatge i plaquejat de cèl·lules

Primer de tot, sempre hem d'assegurar-nos que les cèl·lules es troben en bon estat observant-les al microscopi invertit. Després, vam treure el medi (perquè el FBS que conté inhibeix la tripsina) amb una bomba de buit i puntes de vidre, vam rentar les cèl·lules amb PBS (phosphate-buffered saline), vam afegir 1 mL de tripsina amb un pipetejador electrònic i pipetes serològiques, que serveix per desenganxar-les del fons de la placa, i vam col·locar les cèl·lules a l'incubador a 37°C/5% CO₂ durant 5 minuts, perquè la tripsina funcionés. Posteriorment, vam afegir 10 mL del medi corresponent (DMEM o RPMI) a les cèl·lules.



Figura 29. Coulter. Font pròpia.

Després de tripsinitzar les cèl·lules les vam comptar amb un comptador Coulter (Figura 29). Vam posar 100 µL de cèl·lules en 10 mL de solució d'electròlits, és a dir, ions, amb la Dispensette (dilució 1:100). El Coulter té en compte la dilució i calcula automàticament a quin concentració es troben les cèl·lules. Els resultats van ser: MDA-MB-231 (673400 cèl·lules / mL) i MDA-MB-436 (1,44 · 10⁶ cèl·lules / mL). Per saber quin volum de cèl·lules necessitàvem per plaquejar el número de cèl·lules adequat, vam fer els càlculs pertanyents (Annex 6).

Silenciament dels gens *TLK1* i *TLK2* amb siRNAs

Vam preparar Eppendorfs amb 250 µL de medi Opti-MEM. En alguns d'aquests Eppendorfs, vam afegir 5 µL del siRNA adequat amb micropipetes i puntes de plàstic. En els altres, 7,5 µL de lipofectamina RNAiMAX, liposomes que permeten introduir els siRNA a les cèl·lules. Posteriorment, vam afegir els siRNAs a la lipofectamina. Vam donar cops als Eppendorfs perquè les dissolucions es mesclassin bé i els vam deixar reposar durant 5 minuts a temperatura ambient perquè els liposomes es creessin. Després, vam observar les cèl·lules que es van cultivar el dia anterior i, com estaven totes en bon estat, vam seguir el protocol. Vam eliminar tot el medi dels pous amb una bomba de buit i puntes de vidre i vam afegir 500 µL d'Opti-MEM a la paret del pou per tal de no danyar les cèl·lules. Després, vam afegir els 500 µL de la dissolució que contenia els siRNAs amb la lipofectamina als seus pous corresponents, gota a gota, perquè els siRNAs s'introduïssin en les cèl·lules.

Tractament de les cèl·lules amb olaparib

Després d'haver comptat (MDA-MB-231 siGFP: 163900 cèl·lules / mL i siTLK: 271700 cèl·lules / mL, MDA-MB-436 siGFP: 224600 cèl·lules / mL i siTLK: 183900 cèl·lules / mL) i plaquejat les cèl·lules una altra vegada, vam dissoldre l'olaparib en DMSO. Vam afegir DMSO als pouets del grup control, per mantenir el control, ja que en estar l'olaparib dissolt en DMSO, i en ser aquest últim tòxic, és necessari

que al control se li afegeixi. És a dir, si no haguéssim afegit DMSO en els pous no tractats amb olaparib, i haguéssim vist un fenotip¹¹ en les cèl·lules tractades, no se sabia si ha estat perquè es va tractar amb olaparib o perquè es va utilitzar DMSO. Es recomana que s'utilitzi un 0,1% de medicament dissolt en DMSO en relació al medi que s'utilitzarà per a les cèl·lules. Vam preparar tres concentracions d'Olaparib: Ø (no hi ha olaparib), 1 µM, 500 nM i 100 nM¹². Per a l'estudi de proliferació, vam utilitzar 1 mL de dissolució per pouet, i per al Western Blot i el "Colony Formation", 1,5 mL per pouet. En la proliferació, vam dissoldre 2 µL d'olaparib en 20 mL de medi; en el Western Blot, 1,2 µL d'olaparib en 12 mL de medi, i en la formació de colònies, 3,2 µL d'olaparib en 32 mL de medi. Vam pipetejar els mL de medi amb una pipeta serològica i un pipetejador automàtic, i els µL de medicament, amb una micropipeta i puntes de plàstic (veure Annex 6).

Tinció amb cristall violeta

Vam extreure el medi dels pouets perquè no afectés la tinció, amb una bomba de buit i puntes de vidre, vam rentar les cèl·lules amb PBS, el vam retirar mitjançant un pipetejador automàtic i pipetes serològiques i vam afegir cristall violeta amb una pipeta Pasteur, per tenyir els nuclis de les cèl·lules. Després, vam rentar les plaques amb aigua en un vas de precipitats de 4 L, submergint la placa diverses vegades, perquè no quedés cristall violeta. Posteriorment, la vam deixar assecar durant tota la nit.

Preparació de les mostres per al Western Blot

Vam retirar el medi amb una bomba de buit i puntes de vidre, vam rentar les cèl·lules dos cops amb PBS, mitjançant un pipetejador automàtic i pipetes serològiques i les vam congelar a -80°C. El dia que vam preparar els lisats, les vam treure del congelador i les vam deixar descongelar en gel, ja que no és recomanable que les cèl·lules pateixin grans canvis de temperatura. Vam afegir 50 µL d' SDS (dodecilsulfat sòdic) a cada pouet, per desnaturalitzar¹³ les proteïnes que les cèl·lules contenen, mitjançant una micropipeta i puntes de plàstic. Després, vam rascar-les en gel amb un rascador i vam traspasar el lisat de cada pou a un Eppendorf net, sempre en gel. Més endavant, vam sonicar les cèl·lules a 4°C amb un sonicador (programa M2), per acabar de trencar les membranes cel·lulars. Finalment, vam bullir les mostres en un bloc tèrmic durant 10 minuts a 90°C i sense agitació, per eliminar el DNA.

¹¹ Expressió d'un gen que determina un caràcter.

¹² "Molar" és una forma d'expressar la concentració d'un solut dissolt en una dissolució. Es representa amb una "M" majúscula i significa "mols de solut / L de dissolució". Per exemple, "µM" és "micromolar", és a dir, 10⁻⁶ M.

¹³ Procés de canvi de conformació de la proteïna. És necessari que les proteïnes en un Western Blot estiguin desnaturalitzades, perquè la seva estructura terciària o quaternària (estructures de les proteïnes) pot afectar la manera com es desplacen en el gel del Western Blot.

Per tal de quantificar les proteïnes de les cèl·lules, vam fer una dilució 1:10 de les mostres: 3 µL de mostra en 27 µL d'aigua MilliQ. Vam posar 5 µL de les dilucions en una placa de 96 pouets. També vam col·locar 5 µL de mostres de BSA (bovine serum albumin) que estaven a una concentració coneguda (estàndard): 0 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL i 2,5 mg/mL.

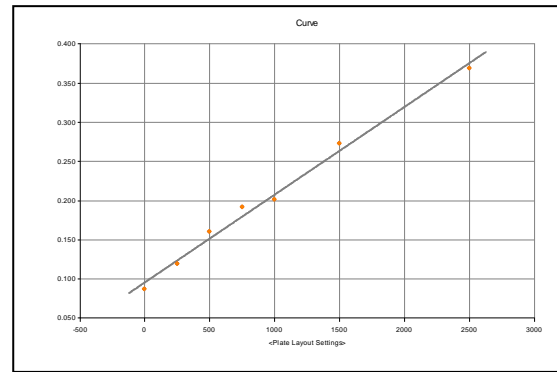


Figura 30. Recta patró elaborada pel lector de plaques. A partir de les mostres amb concentració coneguda, elabora la recta que es pot observar. Després, amb cada mostra a quantificar, calcula la quantitat de llum (absorbància) que té, i utilitza la recta per saber la concentració que li pertoca.). Font pròpia.

Després, a cada pouet vam afegir els reactius necessaris per a què la màquina pogués quantificar proteïnes: A, B i S. Primer, vam fer una solució amb 1 mL de reactiu A i 25 µL de reactiu S. Vam afegir 25 µL a cada pou, seguit de 200 µL de reactiu B. Vam mantenir la placa en la foscor durant 10-30 minuts abans de col·locar-la al lector de plaques. Vam utilitzar el BSA per generar una recta patró (Figura 30). El lector de plaques detecta quanta llum aquestes mostres absorbeixen i genera una recta concentració (x) – absorbància (y). D'aquesta manera podem extrapolar la concentració de les mostres de concentració desconeguda a partir de la seva absorbància.

Vam realitzar els càlculs necessaris per saber els µL de mostra que necessitàvem per tenir 40 µg de proteïna (quantitat suficient com per ser observada en un gel) i els µL d'aigua que necessitàvem per tenir 25 µL totals (Annex 6). Vam agafar tires de tubs i vam afegir a aquests el volum adequat de mostra i d'aigua amb una micropipeta i puntes de plàstic, a més dels 12 µL d'una dissolució de 2X SDS que contenia β-mercaptoetanol, per desnaturalitzar les proteïnes, i blau de bromofenol, com a marcador per indicar en quin punt es trobaven les proteïnes en el gel.

Preparació dels gels d'acrilamida

Per a preparar els gels per córrer proteïnes vam muntar la cubeta, els vidres, els quals vam situar a l'interior dels suports, i els vam tancar tancar. Vam preparar les dissolucions que necessitàvem per fer els gels. Vam preparar 2 gels de gradient (15%-8%).

En un Falcon, vam afegir 2,4 mL d'aigua MilliQ, 5 mL d'acrilamida al 30%, 2,5 mL de Separating buffer (dissolució per separar les proteïnes), 100 µL d'APS (persulfat d'amoni), amb un pipetejador automàtic, i 4 µL de TEMED (tetrametilendiamina), amb una micropipeta i puntes de plàstic, els components necessaris per al gel d'acrilamida. Després, vam barrejar la dissolució i vam afegir aquesta en l'espai que quedava entre els dos vidres. Vam abocar dissolució fins a la meitat de la capacitat del vidre. Després, vam afegir una mica d'isopropanol, per tal que el gel quedés recte. Vam deixar la resta de dissolució en el Falcon per veure quan hauria acabat de polimeritzar.

Quan va acabar de polimeritzar, és a dir, que es va solidificar, vam extreure l'isopropanol, i amb una tira de paper, col·locada entre els vidres, el vam acabar d'assecar. Després, vam preparar el segon gel: el de 8%. Per tal de fer-lo, en un Falcon vam afegir 4,7 mL d'aigua MilliQ, 2,7 mL d'acrilamida al 30%, 2,5 de 4X separating buffer, 100 µL d'APS i 6 µL de TEMED. Vam abocar la dissolució a l'altra meitat del gel (deixant una mica de marge per a l'última dissolució). Vam afegir isopropanol i, quan va polimeritzar el gel, vam extreure l'isopropanol. Finalment, vam preparar, en un tercer Falcon l'Stacking gel, amb els següents compostos: 5,7 mL d'aigua MilliQ, 1,7 mL d'acrilamida al 30%, 2,5 mL d'stacking buffer, 100 µL d'APS i 10 µL de TEMED. Un cop ho vam afegir, vam incorporar la pinta de 15 pouets, intentant que no quedés cap bombolla. Vam deixar que el gel polimeritzés i vam extreure la pinta.

Càrrega, transferència, tinció Ponceau, bloqueig, detecció de proteïnes i revelat del Western Blot

Vam agafar el volum de cada tub, amb una micropipeta i puntes de plàstic, que contenia la mostra preparada per carregar-la al gel, i vam introduir la part fina de la punta en el pouet adient, que es trobava entre els dos vidres. Vam deixar anar el volum lentament, per tal que el pouet pogués incorporar tot el volum, i perquè aquest no sortís a fora. També vam intentar no agafar bombolles, perquè aquestes surten violentament i poden treure part de mostra del pouet. En el primer pou, vam posar el marcador de pes molecular, de manera que si en el gel surt una banda en un lloc determinat, es pugui saber el seu pes molecular aproximat. Es corre¹⁴ el gel a 120 V durant 1h 30 minuts (Figura 31). Aquest procediment s'anomena "electroforesi".



Figura 31. Càrrega del gel electroforètic. Font pròpia.

Per transferir les proteïnes del gel a la membrana, vam col·locar el gel en un "sandwich" (dues peces de plàstic unides per un lateral, i permeten tancar-se fent pressió), en el qual hi havia un suport que permetia que hi hagués contacte en totes les parts que el formaven, una esponja, per amortir la força del suport, dues parets de paper de filtre, el gel electroforètic, la membrana de nitrocel·lulosa, en la qual es quedarien adherides les proteïnes, dues altres capes de paper de filtre i una altra esponja.

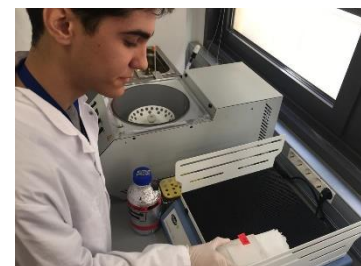


Figura 32. Rentat de la membrana. Font pròpia.

¹⁴ Verb que s'utilitza per indicar que les proteïnes del gel estan sotmeses a un corrent elèctric que provoca el seu desplaçament cap a la part inferior d'aquest.

Vam deixar en remull el “sandwich” en una safata amb el Transfer buffer, durant una hora. Després de transferir la membrana, la vam tenyir amb Ponceau per comprovar si la transferència va funcionar. Vam rentar les membranes amb PBST fins que el color rosat va desaparèixer (Figura 32). Vam bloquejar les membranes amb 5% llet en PBST durant 1 hora en agitació, perquè altres proteïnes que no ens interessaven no s’unissin a les membranes.

Per a la detecció de proteïnes, vam utilitzar dos anticossos. L’anticòs primari s’uneix a la proteïna d’interès. El secundari, s’uneix a l’anticòs primari i conté un enzim que desprèn llum, el que permet posteriorment identificar les proteïnes (Figura 33). Vam deixar els Falcons amb la membrana en la dissolució de l’anticòs primari o/n (overnight, tota la nit), a 4° C, ja que els anticossos funcionen més lentament, i proporcionen resultats més acurats. Vam rentar les membranes amb PBST, 3 rentats de 10 minuts en agitació, per tal que no quedessin restes d’anticòs primari.

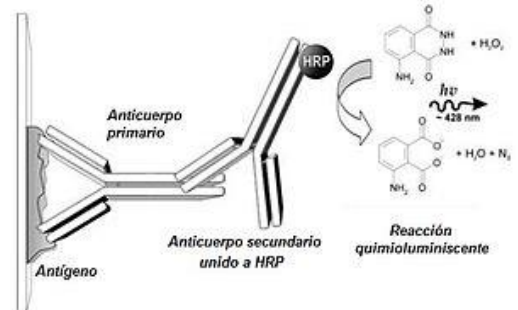


Figura 33. Detecció de proteïnes gràcies a la llum després per la reacció catalitzada per l'enzim que forma part de l'anticòs secundari. Aquest està unit a l'anticòs primari, i aquest altre, a proteïna d'interès. Font: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2e/Dececi%C3%B3n_quimioluminiscente.jpg

Per a membranes de nitrocel·lulosa, la proporció anticòs secundari-dissolució ha de ser 1:15000. Per tant, 1 µL d'anticòs secundari per cada 15 mL de dissolució. Si teníem 40 mL de llet en 2 Falcons, s'havien de posar 2,67 µL d'anticòs en els 40 mL de llet de cada tub Falcon, amb una micropipeta i puntes de plàstic (Figura 34). Un cop fet això, vam aplicar la llet sobre els fragments de membrana i els vam deixar en agitació durant 1 hora (veure Annex 6).

Vam assecar les membranes en paper absorbent. Vam aplicar els reactius per revelar les membranes i els vam repartir entre tots els fragments. Vam situar les membranes, amb els plàstics, en un marc que les mantenia aïllades de la llum (durant 1 minut). Les vam portar a una sala fosca, només amb llum vermella, per no afectar els films. Vam deixar les membranes 3 segons, 10 segons, 5 minuts i 30 minuts amb un film que les cobria, a l'interior del marc fosc, amb diferents temps d'exposició per veure com podríem veure millor les proteïnes desitjades. Els films els vam introduir en un aparell, el qual, automàticament, va anar canviant d'un líquid a un altre per a revelar els films. Quan va acabar el procés, va extreure els films revelats, els quals vam observar i vam distingir les bandes de cada proteïna.



Figura 34. Ús de la micropipeta per agafar volums molt petits. Font pròpia.

Extracció amb àcid acètic

Quan es va assecar el colorant cristall violeta, vam afegir 1 mL d'àcid acètic al 10% a cada pouet, amb un pipetejador automàtic i pipetes serològiques, i les vam deixar a l'agitador, per tal de decolorar les cèl·lules tenyides. Al cap de 15 minuts, les dissolucions de cada pouet tenien un color violeta de diferent intensitat (com més cèl·lules, més intens), i vam utilitzar el lector de plaques perquè ens indiqués l'absorbància (es pot entendre com “la intensitat del color violeta dels pous”).

4. CONCLUSIONS:

Proliferació cel·lular:

- ✓ Silenciar les TLK disminueix significativament el nombre de cèl·lules de MDA-MB-436 i MDA-MB-231, i utilitzar olaparib agreuja més la situació de la segona línia cel·lular. Per tant, podem afirmar un nou model de “synthetic lethality”: la inhibició de BRCA1, PARP, TLK1 i TLK2 en MDA-MB-231.
- ✓ L'ús del test estadístic Anova 2-way permet saber la significança de cada variable, la qual cosa permet entendre millor els resultats.

Formació de colònies:

- ✓ Utilitzar siRNAs per silenciar les TLK permet reduir la capacitat de formar colònies de les cèl·lules MDA-MB-231.
- ✓ Utilitzar olaparib, el qual inhibeix PARP, provoca una disminució del nombre de colònies de la línia cel·lular MDA-MB-436.

Western Blot:

- ✓ Els siRNAs no funcionen en la en la totalitat dels casos, pel que no el podem considerar un mecanisme altament fiable de silenciament gènic.
- ✓ Les cèl·lules MDA-MB-436 són més fiables que les MDA-MB-231, ja que les primeres tenen TLK1 i TLK2 silenciada en un major nombre de mostres, en comparació amb les segones.
- ✓ Silenciar TLK1 i TLK2 provoca estrès replicatiu en les cèl·lules on també s'han inhibit les proteïnes PARP i BRCA1. L'estrès replicatiu ocasiona dany al DNA, en forma de DSB, en major grau i ssDNA en menor grau.
- ✓ Es necessita menys γ H2AX per als DSB que no pas RPA per al ssDNA.

5. DISCUSSIÓ:

Al llarg del Treball de Recerca, m'he documentat, ja sigui de pàgines web, com d'articles de revista o llibres especialitzats, pel que he pogut contrastar molts dels arguments que exposo al llarg del treball, i m'he pogut documentar respecte el càncer, l'estrès replicatiu i les proteïnes de reparació del DNA que he estudiat, els tres "hallmarks" del meu treball.

Arribo a la idea que el càncer no es tracta d'una sola malaltia, sinó d'un grup de malalties, en les quals l'aparició d'un teixit neoplàsic és comuna. Arribo a aquesta conclusió perquè he pogut veure, prenent el càncer de mama com a exemple, que un càncer és molt diferent en funció del pacient que el tingui. L'aparició i la propagació pot dependre de moltes variables, una de les quals poden ser els receptors hormonals, pel que també podem asseverar que no pot existir un únic medicament per tractar un sol tipus de càncer.

Com aquest Treball de Recerca es basa en les proteïnes TLK1, TLK2, BRCA1 i PARP, amb el treball de camp realitzat en el laboratori i la informació a partir de la qual m'he documentat, he pogut extreure conclusions a partir dels resultats obtinguts, i he pogut veure que les proteïnes TLK1 i TLK2, les quals participen en la DDR, tenen un paper molt més important del que sembla en la prevenció del dany al DNA i la reparació d'aquest, donat l'imprescindible rol que TLK1 té en la via ATR-Chk1, que en aquest Treball de Recerca he completat amb la informació de diferents articles científics.

Per una banda, inhibir les dues proteïnes disminueix de forma significativa la proliferació cel·lular de les línies MDA-MB-436 i MDA-MB-231, i utilitzar a més a més olaparib -un fàrmac que, pel que hem vist, sembla que inhibeix correctament PARP, pel que pot ser recomanable per a pacients de càncer de mama-, pot ajudar a la disminució de proliferació (MDA-MB-231) o no (MDA-MB-436).

Per altra banda, hem fet un símil amb la formació de colònies i la capacitat que té un nombre petit de cèl·lules de formar un tumor després d'un tractament. L'ús del siTLK1+siTLK2, els siRNAs utilitzats per silenciar les TLK, dificulta significativament la formació de colònies en MDA-MB-231, però no ho fa en MDA-MB-436. En canvi, l'ús d'olaparib sí que disminueix de forma significativa la formació de colònies amb MDA-MB-436, en contrast amb MDA-MB-231, on això no ocorre.

Com hem pogut observar, la silenciament de les TLK, juntament amb la de PARP, mitjançant olaparib en cèl·lules amb BRCA1 deplecionada, causa estrès replicatiu, el qual, conseqüentment, genera danys en el DNA: SSB i DSB. Per tant, podem concloure que juga un paper molt important en la transmissió de senyals de la DDR i en la reparació dels danys del DNA. Així doncs, la inhibició de TLK1 i TLK2 i l'ús d'olaparib conformen un molt bon exemple de synthetic lethality. Aquest Treball de Recerca està dirigit a la investigació sobre tractaments alternatius a la quimioteràpia, els quals estan enfocats en la generació d'estrès replicatiu per així causar una quantitat de dany al DNA suficientment significativa com per provocar l'entrada de les cèl·lules canceroses en estats d'apoptosi o senescència,

aconseguint així una reducció del tumor. Aquest tractament estaria especialment dirigit a aquells pacients de càncer de mama que tenen *BRCA1* mutat, perquè l'acció de la synthetic lethality s'incrementa, millorant l'eficàcia del tractament.

Després d'haver vist els resultats, penso que els medicaments dirigits a malalties com el càncer haurien d'enfocar-se en el DNA o en els processos en els quals està implicat, com la replicació o la transcripció. Està químicament dissenyat per complir amb totes les funcions que desenvolupa, i la seva estructura li proporciona una gran estabilitat, diversitat i complexitat comparada amb qualsevol altra molècula.

La replicació és un procés essencial per a les cèl·lules i també un procés susceptible a molts errors, que poden donar lloc a l'estrès replicatiu: un estat que, si no es repara, pot comportar greus conseqüències per a la cèl·lula, com l'aparició de dany al DNA. Hem pogut veure que el dany al DNA pot dificultar l'expressió de gens, l'arranjament de cromosomes o fins i tot pot crear aberracions cromosòmiques. És a dir, que l'estrès replicatiu sempre acaba generant lesions en el DNA que poden perillar la viabilitat de la cèl·lula.

Tal com afirma la Dra. Neus Agell, els oncogens (*BRCA*, *PARP*, *TLK* mutats) generen estrès replicatiu, i aquest, dany al DNA (*SSB* i/o *DSB*). Durant tota la redacció del Treball de Recerca he tingut en ment aquesta frase i, ara, després dels articles i llibres llegits, i amb tota la informació de la qual disposo, penso que és una explicació acuradíssima, clara i concisa de l'aparició del dany al DNA originat per l'estrès replicatiu. Malgrat el poc estudi arreu del món de l'estrès replicatiu, l'afirmació explica també perquè no pot ser el procés contrari: alguns oncogens generen les ROS, que poden causar danys al DNA, i aquests, estrès replicatiu, però aquest estrès replicatiu, encara genera més dany en el DNA. Per tant, l'asseveració és correcta. Amb tota la documentació llegida i les explicacions rebudes, puc dir que l'estrès replicatiu és aquella situació, en la replicació del DNA, en la qual hi ha forquetes aturades, perquè la replicació va a un ritme més lent del que li pertocaria, que va acompanyada de l'activació de la DDR i de fases del cicle cel·lular més curtes, i que és causada per oncogens i genera dany en el DNA.

La replicació, el procés pel qual es genera mRNA a partir de DNA, pot ser una de les causes de l'estrès replicatiu, sobretot quan els oncogens, gens potencialment inductors de càncer, se sobreexpressen i comencen a generar un gran nombre de mRNAs, la qual cosa provoca en nombroses ocasions el xoc de la maquinària de transcripció i el replisoma.

Finalment, puc concloure que *TLK1*, *TLK2*, *PARP* i *BRCA1* són proteïnes involucrades en la reparació dels danys en el DNA i la seva absència o mutació ocasiona estrès replicatiu, que genera lesions en el DNA, i això pot afectar la proliferació cel·lular i la formació de colònies, pel que es podria desenvolupar un tractament basat en aquests principis per a aconseguir una acumulació de danys en el DNA de les cèl·lules canceroses, per tal que acabin entrant en apoptosi o senescència, i el pacient tingui un millor pronòstic.

6. VALORACIÓ CRÍTICA

El fet de poder haver realitzat aquest Treball de Recerca ha estat una experiència molt positiva per mi, perquè he pogut aprendre una immensa quantitat de coneixements de biologia molecular, la branca de la biologia que més m'interessa i em motiva, que abans no sabia, i he pogut viure i treballar amb les meves pròpies mans en un laboratori d'un centre de recerca de renom com ho és l'IRB.

Un aspecte que ha resultat una mica complicat ha estat poder coincidir amb la Marina Villamor en els dies per poder fer les pràctiques, atès que vam haver d'esperar a la finalització del curs de 1r de Batxillerat perquè jo pogués comptar amb plena disponibilitat horària. Com ella tenia compromisos d'assistència a algun congrés i temes relacionats amb la seva tesi, vam decidir de fer-ho a finals de juliol i principis d'agost. Ens van quedar un parell d'experiments pendents d'acabar, els quals vam finalitzar a principis d'octubre.

Les pràctiques han estat molt completes i he pogut utilitzar molts estris diferents, he seguit tècniques que mai no havia fet i he treballat amb reactius químics que mai no havia sentit a parlar, pel que el treball de camp ha estat molt profitós.

Crec que el tema és interessantíssim i molt atractiu, tant pel públic científic com pel que no ho és, però té interès per la ciència. En ser un tema tan específic, no ha estat fàcil trobar informació de tot allò que volia investigar, i en molts apartats, he hagut d'extreure informació únicament d'articles científics, relacionar-los i escriure la part de la memòria corresponent. Però crec que això és un aspecte interessant, perquè aporta objectivitat al meu Treball de Recerca. D'altra banda, no està molt investigat arreu del món, pel que no hi ha molts experts en aquest tema. Tot i així, he tingut la gran sort d'haver pogut parlar i intercanviar preguntes amb experts de la Universitat de Barcelona, de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, del CNIO, del CABIMER i del CBM Severo Ochoa.

Penso que sense molta de la gent que ha col·laborat en aquest Treball de Recerca, hauria estat més difícil entendre alguns temes que he tractat, per tant, moltes persones han estat imprescindibles. Crec que tan interessant és realitzar pràctiques experimentals en un laboratori com obtenir informació i parlar amb professionals, ja que t'aporten diferents visions d'un mateix tema, i això pot servir per veure el Treball de Recerca des de diferents punts de vista.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4a ed. Nova York: Garland Science, 2002, 1462 p. (pàgines consultades: 1326, 1333, 267-268, 1340i 1317). ISBN: 0-8153-3218-1.
2. HANAHAN, Douglas i WEINBERG, Robert A. <<Hallmarks of Cancer: The Next Generation>>, *Cell*. vol. 144 (4 de març de 2011), p. 647-674.
3. Instituto Nacional del Cáncer. *Tipos de cáncer de seno* [en línia]. <<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/comprension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno.html>> [Consulta: 12 de juliol de 2018].
4. Instituto Nacional del Cáncer. *Tipos de tratamiento* [en línia]. <<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>> [Consulta: 12 de juliol de 2018].
5. Instituto Nacional del Cáncer. *Terapias dirigidas contra el cáncer* [en línia]. <<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida/hoja-informativa-terapias-dirigidas>> [Consulta: 13 de juliol de 2018].
6. MANNING, G et al. <<The Protein Kinase Complement of the Human Genome>>, *Science*. vol. 298 (2002), p.1912-1914.
7. GONZÁLEZ BURÓN, Helena. <<The role of the Tausled Like Kinases in genome stability and mammalian development>>, UB. (2014), p. 44-46.
8. SEGURA-BAYONA, Sandra et al. <<Differential requirements for Tausled-like kinases 1 and 2 in mammalian development>>, *Cell death and differentiation*. vol. 24 (2017), p. 1872-1882.
9. MORTUZA, Gulnazar B. et al. <<Molecular basis of Tausled-Like Kinase 2 activation>>, *Nature*. vol. 9 (2018), p. 2, 11.
10. IFTODE, Cristina; DANIELY, Yaron i BOROWIEC, James A. <<Replication Protein A (RPA): The Eukaryotic SSB>>, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*,. vol. 34 (1999), p. 142, 151 i 162.
11. NAMIKI, Y i ZOU, L. <<ATRIP associates with replication protein A-coated ssDNA through multiple interactions>>, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,. vol. 103 (2006), p. 582.
12. SORENSEN, Claus Storgaard i DOBBELSTEIN, Matthias. <<Exploiting replicative stress to treat cancer>>, *Nature*, vol. 14 (2015), p. 405-407.
13. LECONA, Emilio i FERNÁNDEZ-CAPETILLO, Oscar. <<Replication stress and cancer: it takes two to tango>>. *Experimental Cell Research*, vol. 329 (2014), p. 26-34.
14. GROTH, A. et al. <<Human Tausled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint>>. *The EMBO Journal*, vol. 22 (2003), p. 1676, 1677, 1684 i 1685.
15. DANA, Hassan et al. <<Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA>>. *International Journal of Biomedical Science*, vol. 13 (2017), p. 49-54.
16. MORALES, Julio C. et al. <<Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases>>. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, vol. 24 (2014), p. 17-21.
17. HERCEG, Z. i WANG, ZQ. <<Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death>>. *Mutation Research*, vol. 477 (2001), p. 98-105.

18. LEDERMANN, Jonathan et al. <<Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer>>. *The New England Journal of Medicine*, vol. 366 (2012), p. 1382 i 1383.
19. New York Times. *My Medical choice* [en línia]. <<https://www.nytimes.com/2013/05/14/opinion/my-medical-choice.html>> [Consulta: 31 de juliol de 2018].
20. LEVITT, Nicola C. i Hickson, Ian D. <<Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity>>. *Cell*, vol. 8 (2002), p. 180 i 181.
21. FARMER, Hannah et al. <<Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy>>. *Nature*, vol. 434 (2005), p. 918 i 919.
22. Instituto Nacional del Cáncer. *Mutaciones en BRCA: riesgo de cáncer y pruebas genéticas* [en línia]. <<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica/hoja-informativa-brca>> [Consulta: 1 d'agost de 2018].
23. Institut Català d'Oncologia. *Consell genètic* [en línia]. <http://ico.gencat.cat/ca/professionals/serveis_i_programes/programa_de_cancer_hereditari/consell-genetic/> [Consulta: 1 d'agost de 2018].
24. WG Jr, Kaelin. <<The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy>>. *Nature*, vol. 5 (2005), p. 690 i 692.
25. LORD, CJ; TUTT, AN i ASHWORTH A. <<Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors>>. *Annual Review of Medicine*, vol. 66 (2015), p. 465 i 467.
26. National Human Genome Research Institute. *Ácido desoxirribonucleico (ADN)* [en línia]. <<https://www.genome.gov/27562614/cido-desoxirribonucleico-adn/>> [Consulta: 2 d'agost de 2018].
27. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. *ADN: estructura molecular* [en línia]. <<http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/DNASpID30001SS.html>> [Consulta: 3 d'agost de 2018].
28. Universidad de la Habana. *Replicación del DNA* [en línia]. <<http://fbio.uh.cu/sites/genmol/confs/conf4/p1.htm>> [Consulta: 4 d'agost de 2018].
29. Universidad de Murcia. *Duplicación del ADN* [en línia]. <<https://www.um.es/molecula/dupli00.htm>> [Consulta: 5 d'agost de 2018].
30. Universidad de Murcia. *Expresión del mensaje genético. Transcripción* [en línia]. <<https://www.um.es/molecula/dupli01.htm>> [Consulta: 7 d'agost de 2018].
31. Universidad Complutense de Madrid. *Procesos genéticos de la síntesis de proteínas: la transcripción* [en línia]. <<https://webs.ucm.es/info/genetica/grupod/Transcripcion/Transcripcion.htm>> [Consulta: 8 d'agost de 2018].
32. ZEMAN, Michelle K. I CIMPRICH, Karlene A. <<Causes and consequences of replication stress>>. *Nature*, vol. 16 (2014), p. 2-5.
33. Document de la sessió de Miguel Rovira al Crazy about Biomedicine.
34. MA, X. Cynthia; JANETKA, James W. I PIWINCA-WORMS, Helen. <<Death by releasing the breaks: CHK1 inhibitors as cancer therapeutics>>. *Cell*, vol. 17 (2010), p. 1471.
35. Instituto Nacional del Cáncer. *Diagnóstico y estadificación* [en línia]. <<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion>> [Consulta: 11 de juliol de 2018].
36. Instituto Nacional del Cáncer. *Estado del receptor hormonal del cáncer de seno* [en línia]. <<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/comprencion-de-un>>

- diagnostico-de-cancer-de-seno/estado-del-receptor-hormonal-del-cancer-de-seno.html> [Consulta: 11 de juliol de 2018].
37. National Cancer Institute. *Cancer stat facts* [en línia]. <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>> [Consulta: 13 de juliol de 2018].
 38. Sociedad Española de Oncología Médica. *Las cifras del cáncer en España 2018* [en línia]. 29 de gener de 2018. <https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf> [Consulta: 13 de juliol de 2018].
 39. World Health Organization. *Cancer Incidence in Five Continents Time Trends* [en línia]. <<http://ci5.iarc.fr/CI5plus/Pages/online.aspx>> [Consulta: 13 de juliol de 2018].
 40. Generalitat de Catalunya. *Estadístiques* [en línia]. <<http://cancer.gencat.cat/web/ca/professionals/estadistiques/2017Mama.pdf>> [Consulta: 13 de juliol de 2018].
 41. Documents cedida pel Dr. José Antonio Tercero en la reunió del dia 10 de juliol de 2018 al CBM.
 42. National Center for Biotechnology Information. *Oncogenes* [en línia]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9840/>> [Consulta: 9 d'agost de 2018].
 43. American Cancer Society. *Oncogenes and tumor supressor genes* [en línia]. <<https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html>> [Consulta: 9 d'agost de 2018].
 44. GIGLIA-Mari, Giuseppina; ZOTTER, Angelika i VERMEULEN, Wim. <<DNA Damage Response>>. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 3 (2011), p. 1-5.
 45. Universitat del País Basc. *Introducción al cultivo celular* [en línia]. <http://www.ehu.eus/biofisica/pdf/cultivo_celular.pdf> [Consulta: 23 d'agost de 2018]
 46. American Type Culture Collection. *MDA-MB-231* [en línia]. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo_country=es> [Consulta: 24 d'agost de 2018]
 47. American Type Culture Collection. *MDA-MB-436* [en línia]. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-130.aspx?geo_country=es> [Consulta: 25 d'agost de 2018]
 48. American Type Culture Collection. *HCC1937* [en línia]. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2336.aspx?geo_country=es> [Consulta: 26 d'agost de 2018]
 49. Ibian Technologies. *Introducción al cultivo celular* [en línia]. <<https://www.ibiantech.com/el-ayer-y-hoy-de-las-tecnicas-y-medios-de-cultivo-celular/>> [Consulta: 27 d'agost de 2018]
 50. Cultek. *El medio de cultivo* [en línia]. <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-cultivos_celulares-protocolos.pdf> [Consulta: 28 d'agost de 2018]
 51. Universidad de Sevilla. *Nivel de organización talofítico* [en línia]. <http://personal.us.es/zarco/PIM-Botanica/Temas/PIM_t2/T2Talofitas.htm> [Consulta: 28 d'agost de 2018]
 52. LOMANTO DÍAZ, David Leonardo et al. <<El ciclo celular>>. *MedUNAB*, vol. 6 (2003), p. 21, 22, 23 i 27.
 53. The University of Queensland. *Western Blotting* [en línia]. <<https://di.uq.edu.au/community-and-alumni/sparq-ed/sparq-ed-services/western-blotting>> [Consulta: 29 d'agost de 2018]

AGRAÏMENTS

Vull agrair l'esforç de la Marina Villamor, estudiant de doctorat a l'IRB, per haver-me ajudat a realitzar el treball de camp d'aquest Treball de Recerca, per la documentació que m'ha facilitat i per haver-me explicat conceptes que he incorporat en la memòria escrita.

Darrere d'aquest Treball de Recerca, hi ha hagut molta gent que ha col·laborat i m'ha ajudat a entendre conceptes i a trobar informació sobre els diferents temes tractats. És per això que voldria agrair a totes i cadascuna d'aquestes persones: al Dr. Octavi Córdoba, per la seva ajuda en orientar l'apartat bibliogràfic del càncer de mama; a la Dra. Rosa Aligué, per haver-me proporcionat articles científics de les TLK, els quals m'han servit molt; a la Dra. Neus Agell, per l'empenta que em va donar amb l'estrès replicatiu el dia que ens vam reunir, ja que ho vaig entendre d'una forma molt més clara, i gràcies també pel llibre "Molecular Biology of the Cell", m'ha estat d'una gran utilitat; al Dr. Óscar Fernández-Capetillo, per la informació proporcionada també sobre les causes de l'estrès replicatiu; al Dr. Pablo Huertas, per haver-me aclarit conceptes de les conseqüències de l'estrès replicatiu i de la reparació del DNA; al Dr. Felipe Cortés, per haver-me ensenyat i resolt dubtes que tenia sobre el dany en el DNA i la reparació d'aquest, i al Dr. Juan Antonio Tercero, per haver-me ensenyat més sobre el dany al DNA i haver-me motivat a indagar més sobre els diferents tipus de dany al DNA que existeixen, quines són les seves causes, i les seves conseqüències.

També voldria agrair al meu tutor del Treball de Recerca i professor de Biologia, el seu esforç i dedicació en aquest projecte, i per orientar-me i donar-me la seva opinió sobre com plantejar el treball. Gràcies!

Agraeixo també a en José Carlos Montañés l'assessorament per escollir el test estadístic adequat per aplicar a les dades obtingudes en l'estudi de proliferació i de formació de colònies, i a en Fernando Unzueta, estudiant de doctorat en el grup d'investigació de la Dra. Neus Agell, que em va ensenyar els experiments que estava duent a terme sobre l'estrès replicatiu.

Finalment, vull agrair als meus pares i al meu germà tota l'ajuda que m'han proporcionat, els ànims i les ganes de treballar que m'han transmès i el suport que m'han donat durant tota la realització del treball.

ANNEXOS

ANNEX 1: AMPLIACIÓ DE CONCEPTES DEL CÀNCER

Genèticament parlant, hi ha tres tipus de gens que, en ser mutats, poden afavorir l'aparició de càncer, ja que, de fet, aquesta és una malaltia genètica.

- Oncogens: gens que provenen d'uns altres gens, anomenats "protooncogens", les funcions dels quals són regular la divisió cel·lular, però que, quan són mutats, es transformen en oncogens. En aquest moment, es desregulen els processos que els protooncogens controlaven i el creixement cel·lular es descontrola. Per exemple, L-myc o K-ras.
- Gens de reparació del DNA: gens que vetllen pel benestar i absència de mutacions en el DNA, fet necessari perquè una cèl·lula funcioni correctament. Una mutació en aquests gens es tradueix en una no identificació i reparació de possibles mutacions que podrien aparèixer en el DNA. Molts factors diferents, tan endògens com exògens, poden danyar el material genètic dia rere dia, i és per això que aquests gens són transcripcionalment molt actius, és a dir, que s'expressen contínuament. Per exemple, el TLK1, TLK2, BRCA1 i PARP.
- Gens supressors de tumors: gens que detecten el dany al DNA i consegüentment, impedeixen el creixement de les cèl·lules. Si hi ha una mutació en aquests gens, hi haurà un augment del nombre de divisions de les cèl·lules, pel que la probabilitat de que es desenvolupi un tumor serà major. Per exemple, MLH i MSH2.

La classificació d'un càncer de mama és essencial per a escollir un tractament adient i per assegurar un bon pronòstic de la malaltia:

- Grau: similaritat que s'estableix entre les cèl·lules canceroses i les cèl·lules del teixit mamari en el qual es desenvolupa. Si les cèl·lules tumorals estan ben diferenciades, és a dir, que s'assemblen al teixit normal, el tumor és de baix grau. Si les cèl·lules canceroses estan poc diferenciades en comparació amb el teixit normal, el tumor es de grau mitjà. I si les cèl·lules del tumor no estan gens diferenciades, el tumor és de grau alt. Com més s'assemblin les cèl·lules canceroses a les cèl·lules del teixit normal, més lentament avançarà el tumor i més bo serà el pronòstic. Valorant tres factors, s'obtenen punts. Si s'obtenen 3-5 punts, el tumor és de grau baix, si se n'obtenen 6-7, és de grau mitjà, i si se n'obtenen 8-9, és de grau alt. Els tres factors són els següents:
 - La formació de conductes normals:
 - Si el 75% del tumor forma conductes galactòfors: 1 punt.
 - Si el 10-70% del tumor forma conductes galactòfors: 2 punts.
 - Si menys del 10% del tumor forma conductes galactòfors: 3 punts.

- Pleomorfirmes (diferents mides, colors i formes de nuclis cel·lulars):
 - Poca variació: 1 punt.
 - Alguna variació: 2 punts.
 - Molta variació: 3 punts.
- Recompte de cèl·lules en mitosi:
 - Poques cèl·lules dividint-se: 1 punt.
 - Bastantes cèl·lules dividint-se: 2 punts.
 - Moltes cèl·lules dividint-se: 3 punts.
- Estadi: se segueix el sistema TNM (mida del tumor, la propagació a nòduls limfàtics i la metàstasi). Com més gran sigui el tumor, més nòduls limfàtics estiguin afectats i més òrgans metastatitzats, pitjor serà el pronòstic. L'estadi 0 és un estadi pretumoral: el tumor encara no està totalment consolidat. En els estadis 1, 2 i 3, el càncer es troba afectant la mama i/o els ganglis limfàtics. En l'estadi 4, hi ha metàstasi i és l'estadi on hi ha pitjor pronòstic (35).
- Estat dels receptors: hi ha principalment tres receptors, la presència dels quals permet classificar un càncer de mama. Aquests són el receptor d'estrógen (ER+ si està present en les cèl·lules o ER- si no ho està), el receptor de progesterona (PR+ si s'expressa en les cèl·lules o PR- si no s'expressa) i el receptor número 2 del factor de creixement epidermal humà (HER2+ si està present o HER2- si no ho està). D'aquesta manera, es pot classificar un càncer de mama, per exemple, en un triple negatiu (ER-, PR- i HER2-), que és molt agressiu, ja que molts tractaments dirigits a aquests receptors no funcionen, ja que aquests no hi són presents, o en un luminal A (ER+) (36).

a. Tractaments

Malgrat pugui semblar que la quimioteràpia es pot resumir en un tractament del càncer que permet eliminar cèl·lules amb una divisió constant, realment existeixen molts tipus de quimioteràpia diferents:

- De manteniment: es proporcionen dosis baixes del medicament i durant un temps llarg, per incrementar la supervivència cronificant el càncer.
- Adjuvant: s'aplica després d'haver fet un tractament principal, com la cirurgia, per assegurar que s'eliminen totes les cèl·lules del tumor, i que no metastatitzi.
- Neoadjuvant: com hi ha una impossibilitat per extirpar el tumor amb cirurgia, bé perquè es danyaria molt la morfologia del pit o bé perquè és molt difícil accedir-hi, primer s'aplica quimioteràpia per reduir el tumor, de manera que ja es pugui tractar amb cirurgia.
- Segona línia: quimioteràpia amb compostos diferents d'una quimioteràpia aplicada anteriorment, a la qual el pacient no ha respost positivament.

- Curativa: té la finalitat de curar la malaltia.
- Pal·liativa: com el tumor és inoperable, es vol maximitzar la supervivència del pacient i millorar la seva qualitat de vida.
- Monoquimioteràpia: utilitzar un sol compost citostàtic (quimioterapèutic, que mata les cèl·lules), en cicles fins que s'aconsegueix controlar la neoplàsia. En leucèmies i limfomes, s'aconsegueix un 30% de reducció del tumor, mentre que amb tumors sòlids, només un 10-15%.
- Poliquimioteràpia: utilitzar un conjunt de compostos diferents, que actuen en unes vies diferenciades, amb la fi que, de forma grupal, s'aconsegueixi un millor efecte que si s'utilitzessin individualment.
- Radioquimioteràpia concomitant: s'administra juntament amb la radioteràpia amb la finalitat de millorar la potència d'aquesta.

De la mateixa manera, en la radioteràpia podem distingir entre:

- Externa: és local, és a dir, que només s'aplica a una zona concreta del cos.
- Interna: es col·loquen partícules que emeten radiació a l'interior del cos. Les partícules poden ser sòlides (braquiteràpia), col·locant-se a prop del tumor a tractar, sent així un tractament local, o poden ser líquides (radioteràpia sistèmica), el qual és un tractament sistèmic ja que arriba a totes les parts del cos, però atacant només a les cèl·lules tumorals. La radioteràpia sistèmica s'aplica mitjançant via oral o intravenosa.

A més, la radioteràpia es pot aplicar abans de la cirurgia (reduint la mida del tumor per a què sigui més fàcil extirpar-lo), durant la cirurgia (radiació intraoperativa, perquè la radiació vagi d'una forma més directa al tumor i no irradiar altres teixits) i després de la cirurgia (per destruir totalment les possibles cèl·lules canceroses que hagin quedat després de la intervenció).

Les tècniques quirúrgiques que es poden utilitzar són també força variades:

- Cirurgia conservadora: s'extirpa només una part de la mama. Pot ser:
 - Tumorectomia: s'extirpa el tumor i una petita part del teixit sense tumor del voltant.
 - Mastectomia parcial: s'extirpa el quart de la mama que conté el tumor.
- Cirurgia radical: s'extirpa tota la mama. Pot ser:
 - Mastectomia radical simple: s'extirpa tota la mama i el mugró, sense incloure els ganglis limfàtics.
 - Mastectomia radical modificada: s'extirpa la mama i els ganglis limfàtics que l'envolten.

Altres tècniques quirúrgiques que no s'utilitzen per curar el càncer però que són importants i es duen a terme en pacients són les següents:

- Biòpsia del gangli sentinella: el gangli sentinella és el que es troba just a sobre de la mama. Si està afectat, es revisen els ganglis de l'aixella i s'extirpa.

- Limfadenectomia axil·lar: s'extirpen els ganglis de l'aixel·la afectats pel càncer. Pot provocar limfedema.
- Reconstrucció de mama: en els casos en què s'ha aplicat una mastectomia, s'utilitza per recuperar la morfologia del pit intervingut. Pot ser una reconstrucció immediata, si es fa després d'haver-se extirpat el tumor, o diferida, si es fa en una altra intervenció posterior. Es pot fer amb parts del cos o amb implants sintètics.

b. Dades a nivell mundial del càncer de mama

El càncer de mama és el més comú dels càncers, tot i que és un dels que més supervivència tenen, ja que un 89,7% dels pacients de càncer de mama sobreviuen al cap de 5 anys d'haver-se diagnosticat.

A l'any 2018, es preveu que es diagnostiquin uns 266.000 pacients i morin uns 41.000. Entre els 55 i els 64 anys és quan més càncers de mama es diagnostiquen (25,9%), seguit de la franja d'edats compresa entre els 65 i els 74 anys (24,1%), sent els 62 anys l'edat mitjana de diagnòstic de càncer de mama (37).

A Espanya, durant l'any 2012 hi va haver, aproximadament, 25.215 nous casos de càncer de mama diagnosticats i 6.075 casos de mortalitat. Es pot observar un creixement respecte la resta d'anys, i això és degut a les noves tècniques de detecció de tumors, que són més precises (38). Al llarg dels anys, la taxa de detecció de nous casos de càncer de mama va fluctuant (Figura 35).

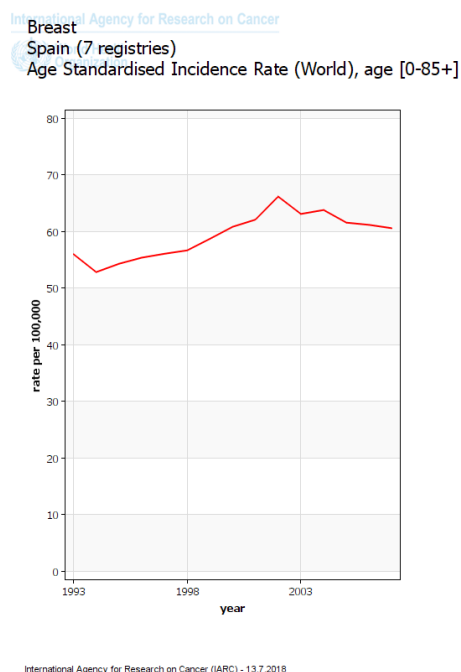


Figura 35. Gràfic que mostra l'evolució al llarg dels anys de la taxa de detecció de nous casos de càncer de mama a Espanya (39).

A Catalunya, en canvi, el 2017 es van trobar 4.563 nous casos de càncer de mama, i van haver-hi 979 defuncions. La supervivència relativa és del 86,5% de pacients al cap de 5 anys d'haver-se diagnosticat la malaltia, més baixa que la mitjana mundial, tot i que cada any, la mortalitat d'aquest càncer disminueix un 2,6% (40).

ANNEX 2: MECANISME DE FUNCIONAMENT DELS SIRNA PER SILENCIAR LES TLK

Per poder sintetitzar seqüències de siRNA, cal una cadena de dsRNA (double strand RNA) llarga, sobre la qual actua l'enzim Dicer, que talla la doble cadena en fragments bicatenaris més petits. Aquests fragments tenen un 2 nucleòtids lliures als extrems 3' i 5', tenint extrems 3' hidroxils i 5' fosfats, i són els siRNA.

Més endavant, els siRNA s'uneixen a RISC (RNA-induced silencing complex), un complex multiproteïc que separa la doble cadena del siRNA i agafa la cadena antisentit (5' 3') per orientar-se a l'mRNA que ha de silenciar. Un cop la cadena antisentit del siRNA hibrida amb l'mRNA específic, la maquinària de RISC s'encarrega de tallar l'mRNA, que, posteriorment, serà degradat, disminuint així l'expressió d'un gen concret.

El complex RISC està format per un conjunt de proteïnes, però l'endonucleasa¹⁵ Argonata és la que s'encarrega de tallar l'mRNA. La cadena antisentit del siRNA s'uneix a Argonata 2, mentre que l'altra cadena, la cadena passatgera, és posteriorment degradada. La cadena guia (antisentit) s'uneix a una butxaca d'Ago2 molt conservada entre espècies, i s'uneix a partir del contacte amb un catió, un ió positiu (15).

Per tal de silenciar les TLK es poden seguir dos mètodes: o bé sintetitzar una doble cadena i introduir-la a les cèl·lules perquè la Dicer i el complex RISC acabin obtenint les cadenes de siRNA, o bé dissenyar les seqüències i encarregar-les a una empresa biotecnològica per després introduir-les en liposomes, els quals poden travessar la membrana plasmàtica de les cèl·lules i alliberar els siRNA a l'interior d'aquesta. El segon mètode és molt més senzill i eficient, pel que si es busca obtenir resultats ràpidament, aquest és el més adequat, malgrat és molt més car que el primer.

¹⁵ Enzim que talla els enllaços fosfodièster, que uneixen els nucleòtids, pel que tallen àcids nucleics, com el DNA o l'RNA.

ANNEX 3: EL DNA

- Desoxiribosa: pentosa¹⁶ que serveix com a base per als nucleòtids. A partir d'aquesta s'uneixen els altres dos components. La seva temperatura de fusió és als 91° i rep aquest nom perquè, en contrast amb l'altre àcid nucleic, l'RNA (ribonucleic acid, àcid ribonucleic), que conté una ribosa, a la desoxiribosa li falta ("des-") un oxigen ("-oxi-").
- Grup fosfat: compost inorgànic que prové de l'àcid fosfòric, però que, en perdre els protons¹⁷, que confereixen el caràcter àcid a la molècula, es converteix en un anió i rep el nom de "grup fosfat". És una molècula amb geometria molecular tetraèdrica i conté un fòsfor al mig de la molècula.
- Base nitrogenada: es podria dir que és la molècula més important del nucleòtid, perquè és la que diferencia un nucleòtid d'un altre. Per al DNA, n'hi ha 4 de diferents: adenina, timina, citosina i guanina. Dues d'elles són púriques (adenina i guanina), ja que tenen dos anells, i les altres dues (timina i citosina), pirimidíniques, ja que en tenen un de sol. Com el seu nom indica, tenen molts àtoms de nitrogen en les seves fórmules.

Quan la cèl·lula no s'està dividint, i es troba en la fase G1, S o G2 (fases del cicle cel·lular), el DNA es troba descondensat en forma de cromatina, ja sigui eucromatina¹⁸ o heterocromatina¹⁹.

Però quan la cèl·lula es troba en la fase M del cicle cel·lular (mitosi), és a dir, quan la cèl·lula s'està dividint, el DNA es condensa gràcies a unes proteïnes, anomenades "histones", al voltant de les quals s'enrotlla per condensar-se molt, i formar els cromosomes. D'aquesta manera, el material genètic es pot repartir amb facilitat entre les dues cèl·lules filles.

a. Procés de replicació del DNA

Primer de tot, la topoisomerasa desenrotlla la doble cadena de DNA i permet que el següent enzim, l'helicasa, actuï. Aquest, separa la doble cadena trencant els ponts d'hidrogen entre bases nitrogenades, i creant així la forqueta de replicació (iniciació). Proteïnes com la RPA, s'uneixen a cadenes senzilles de DNA, com les que s'acaben de formar, per estabilitzar-les. Els encebadors, petites seqüències de nucleòtids necessàries per sintetitzar la cadena complementària, són produïts per la primasa, un enzim, i s'uneixen a la cadena que servirà com a motllo, complementant les bases nitrogenades. Les DNA polimerases (α , δ i ϵ) afegiran nucleòtids en sentit 5' → 3', a partir dels encebadors col·locats a la cadena.

Com només una cadena pot seguir aquest sentit, hi haurà una cadena complementària que se sintetitzarà molt ràpidament i tan bon punt s'obri més la

¹⁶ Glúcid de 5 carbonis.

¹⁷ Ions d'hidrogen, és a dir, àtoms d'hidrogen que han perdut l'electró que tenen. Són els responsables de l'acidesa.

¹⁸ Cromatina descondensada.

¹⁹ Cromatina condensada.

bombolla de replicació, afegirà nucleòtids a la nova cadena -serà una replicació contínua-, i una altra, la cadena retardada, que té el sentit 3' → 5', pel que s'haurà de sintetitzar en petits fragments, anomenats "fragments d'Okazaki", on es col·locaran encebadors tan bon punt s'obri la bombolla, i les DNA polimerases, hauran d'afegir nucleòtids trifosfat. Quan la DNA polimerasa fa contacte amb el fragment d'Okazaki anterior, l'encebador d'aquest s'elimina i els dos fragments són units mitjançant l'enzim ligasa -serà una replicació discontinua- (enlongació). Quan les DNA polimerases trobin una seqüència de terminació²⁰, el replisoma se separa del DNA i les cadenes sintetitzades s'enrotllen (terminació).

b. Procés de transcripció del DNA

En el procés de la transcripció, cal que unes proteïnes, denominades "factors de transcripció" i la RNA polimerasa s'uneixin al promotor, una seqüència que sempre es troba abans que comenci el gen, i indica quan i on s'ha d'expressar el gen. El promotor, la majoria de vegades és TATA (timina-adenina-timina-adenina). Després, la helicasa trenca els ponts d'hidrogen de la seqüència TATA, i forma la bombolla de transcripció, que és similar a la bombolla de replicació, però destinada al procés de transcripció (iniciació). Només una de les dues cadenes del DNA servirà com a motlle per sintetitzar l'mRNA. En els éssers vius amb cèl·lules eucariotes, existeixen tres polimerases (I, II i III). Quan aquestes han fet el primer enllaç fosfodièster entre nucleòtids, se separen del promotor (disgregació del promotor), sintetitzen l'encebador i comencen a afegir nucleòtids trifosfat en sentit 5' → 3' (enlongació). Quan les RNA polimerases arriben a la seqüència de terminació, la polimerització finalitza: tots els components se separen del DNA i aquest recupera la seva estructura habitual.

En els organismes procariotes, la transcripció finalitza aquí. En els eucariotes, però, el producte obtingut en aquests processos s'anomena "pre-mRNA", ja que cal passar per la maduració d'aquest perquè sigui funcional. Primer, es fa el "capping", és a dir, es modifica el primer nucleòtid de l'mRNA (extrem 5'), el qual conté una guanina. Aquesta guanina és metilada¹ en el carboni 7 i la ribosa s'uneix al següent aminoàcid amb un enllaç 5'-5' trifosfat (tota la resta són 3'-5' monofosfat). Més tard, s'afegeix la cua "poli-A" a l'extrem 3': un conjunt de nucleòtids que tots tenen una adenina, per tal d'allargar la vida de l'mRNA en el citoplasma. Finalment, ocorre el procés d'"splicing", on s'eliminen els introns del gen, ja que no tenen informació necessària per a sintetitzar la proteïna.

c. Dany en el DNA

El dany al DNA es diferencia principalment de les mutacions perquè el primer causa canvis en la estructura química del DNA, mentre que el segon és un canvi d'un o més nucleòtids per uns altres, la seva eliminació o l'addició de més.

Principalment, el dany al DNA es pot classificar en dos grans grups: danys endògens, els quals provenen de la pròpia cèl·lula, ja que són metabòlits, més

²⁰ Seqüència de nucleòtids que indica que el gen s'ha acabat.

específicament, espècies reactives d'oxigen (ROS), les quals poden ser molt agressives amb el DNA i oxidar-lo, o la metilació²¹ i la hidròlisi de bases nitrogenades²², la peroxidació de lípids²³ i agents alquilants²⁴; i els danys exògens, els quals provenen de l'exterior de la cèl·lula, i poden ser físics (radiació ultraviolada, raigs X, raigs γ, radiació ionitzant, etc.) o químics (compostos intercalants del DNA, compostos mutàgens, etc.) (41).

d. Oncogens

Actualment és famós el terme “oncogen” degut a la repercussió que ha tingut el descobriment de molts d'ells, ja que tenen una implicació directa amb el procés de formació, progressió i propagació del càncer.

Els proto-oncogens són gens que controlen els processos de creixement de la cèl·lula i la seva divisió. Codifiquen proteïnes -factors de transcripció- que indueixen l'expressió d'altres gens, i altres molècules que regulen el cicle cel·lular. Així doncs, la proteïna que es forma a partir d'aquest compleix amb la funció esperada. Tot i així, quan el proto-oncogen muta, i l'activitat d'aquest no està controlada, de forma que se sobreexpressa i estimula a que la cèl·lula es divideixi contínuament, es forma l'oncogen.

Les senyalitzacions que duen a terme els protooncogens s'inicien amb els factors de creixement que codifiquen, els quals surten de la cèl·lula on s'han sintetitzat i arriben a un receptor específic de membrana. Quan s'hi uneixen, el receptor introdueix un senyal al citoplasma, en forma de modificació de proteïnes -normalment, una fosforilació-, les quals aniran activant altres proteïnes successivament, i es produirà una resposta en forma d'expressió d'un gen que respon a l'estímul o senyal. Si el protooncogen muta i es forma un oncogen, el qual s'expressa molt més, hi haurà una quantitat major de factors de creixement, per tant, una major expressió de gens en forma de resposta, i la cèl·lula experimentarà un creixement molt major. Com els protooncogens tenen la funció de mantenir l'equilibri de les funcions cel·lulars, són gens molt regulats. En el moment en què s'alteren i perden aquesta regulació, són oncogens.

Per tant, es pot afirmar que els oncogens són els responsables que una cèl·lula d'un teixit es converteixi en una cèl·lula cancerosa, provocant una constant estimulació de passar d'una mitosi a una altra, i que un oncogen és una còpia alterada d'un gen que regula la proliferació i la diferenciació cel·lular.

Com els oncogens s'estan contínuament expressant, hi ha una replicació contínua d'aquests (42 i 43).

²¹ Addició d'un grup metil (-CH₃).

²² Reacció química en la qual una molècula d'aigua es trenca i reacciona amb les bases.

²³ Procés de degradació dels lípids.

²⁴ Compostos que s'utilitzen en la quimioteràpia.

ANNEX 4: LA REPARACIÓ DEL DNA (DDR PATHWAY)

Com hem pogut observar, la quantitat de danys al DNA que sorgeixen dia rere dia són extremadament elevats. Però com és que no moren tantes cèl·lules com ens esperaríem, donat que un nombre elevat de lesions del material genètic són un problema per la viabilitat d'aquestes? Perquè hi ha una maquinària complexa, un conjunt de proteïnes i de cascades que s'activen per reparar el DNA quan aquest ho necessita: la DDR pathway (la via de DNA Damage Repair, reparació de danys al DNA).

Aquesta via s'activa davant d'un dany específic de DNA i es pot classificar en diferents tipus depenent de la resposta que executa.

a. Reparació per excisió de bases

La Base Excision Repair (BER) o Reparació per Excisió de Bases actua sobre bases nitrogenades que no afecten l'estructura de doble hèlix del DNA. Podem confirmar, doncs, que es tracta de lesions molt petites que no poden produir danys severes en un gen.

En aquest tipus de DDR, actuen glicosilases, uns enzims que trenquen l'enllaç existent entre la desoxiribosa i la base nitrogenada, creant així un "AP site" (apurinic or apurimidinic site, lloc sense purina o pirimidina). Després, una AP polimerasa talla la el nucleòtid erroni, i una polimerasa específica per a BER sintetitza la seqüència correcta utilitzant l'altra cadena com a motllo. Els SSB són reparats per la SSBR (single-strand break repair), de la qual forma part la proteïna PARP.

b. Reparació per excisió de nucleòtids

Els danys al DNA reparats per aquest tipus de DDR sí que poden causar modificacions en l'estructura de doble cadena del DNA, provocant una desestabilització de la hèlix. La Nucleotide Excision Repair (NER) o Reparació per Excisió de Nucleòtids elimina lesions que es troben en una sola cadena del DNA. També, en ser un dany més gran, és una maquinària de reparació més complexa, on participen més de 25 proteïnes diferents. Dins d'aquest mètode de reparació, trobem dos subtipus, depenen d'on es trobi l'error per sintetitzar DNA:

- TC-NER (Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair): s'eliminen lesions que es troben en forquetes de replicació que s'estan transcrivint, per tal que es pugui reprendre la transcripció quan s'hagi reparat. La recerca del dany al DNA la fa la pròpia RNA polimerasa, col·laborant amb les proteïnes CSA i CSB (Cockayne Syndrome factor A i B).

- GG-NER (Global Genome Nucleotide Excision Repair): es busquen i s'eliminen lesions de qualsevol lloc del genoma. En aquest subtipus de NER hi participen 2 complexos diferents: XPC/hHR23B i UV-DDB.

En els dos mecanismes, TFIIH, un factor de transcripció s'uneix al DNA, les cadenes del qual són separades per una helicasa, aproximadament, uns 30 nucleòtids. Les proteïnes RPA i XPA estableixen les dues cadenes. Aleshores, les endonucleases XPG tallen i eliminen la seqüència errònia. Finalment, les DNA polimerases sintetitzen el fragment que falta i la ligasa uneix els segments.

c. Reparació de DNA double-strand breaks (DSBR)

Els dos mecanismes anteriors servien només per lesions en el DNA que es troben en una de les dues cadenes. Quan dos danys en el DNA en dues cadenes diferents es troben molt a prop, aquestes dues lesions es poden convertir en una més gran i perillosa: una double-strand break (DSB). Aquests danys poden causar greus modificacions de l'estructura del genoma. Així doncs, hi ha un mecanisme, anomenat "Double-strand break repair" que soluciona aquests danys, però és més complicat, ja que no és tan fàcil com sintetitzar una cadena amb l'altra cadena. Existeixen, però, tres subtipus diferents d'aquesta resposta:

- Homologous recombination (HR): necessita una seqüència a partir de la qual fer la reparació que pertoca, per tant, requereix una cromàtida germana²⁵ o un cromosoma homòleg²⁶ on es trobi la mateixa seqüència a ser reparada o una de molt similar. Ocorre d'una manera molt lenta però és molt fiable i té molt poc error. Primer, hi ha un tall a l'extrem 5' del fragment trencat anomenat "resecció", per part del complex MRN-CtIP i EXO1. Després, a aquest filament de cadena senzilla que s'acaba de formar, se li uneix RPA, i s'apropa a la seqüència idèntica per formar la nova cadena que permetrà reparar el dany.
- Non-homologous end joining (NHEJ): no necessita estrictament una seqüència homòloga de la qual copiar la informació per reparar l'error produït. És molt més ràpida que la HR, ja que el que fa és simplement unir els dos fragments tallats, però és molt més fàcil que apareguin mutacions i errors en el procés. El dímer Ku70/Ku80 activa la PI3-kinase DNA-PK i a aquesta se li uneix MRN i Artemis. Després, el complex XRCC4/LigaseIV uneix els dos fragments. Per guiar la reparació, s'utilitzen microhomologies, que són petites seqüències repetitives que es troben en els extrems de cadena senzilla dels talls. Si són compatibles, que succeeix en molt pocs casos, segurament no hi haurà errors. Però si no són compatibles, com en la majoria dels casos, hi haurà alguna mutació.
- Microhomology-mediated end joining (MMEJ): necessita seqüències microhomòlogues que medeixen entre 5 i 25 parells de bases²⁷, i que es

²⁵ Braç d'un cromosoma idèntic a l'altre braç del mateix cromosoma.

²⁶ Cromosoma idèntic a un altre.

²⁷ Dues bases nitrogenades complementàries.

troben als extrems. Com també uneix els extrems del DNA danyat, és ràpida, però provoca deleccions²⁸ i altres mutacions en el DNA. La proteïna Ku i la DNA-PK. Si hi ha nucleòtids que sobren, s'eliminen, i si en falten, s'afegeixen posteriorment: per tal que les dues seqüències s'alineïn, a vegades ha d'eliminar parells de bases creant així deleccions (44).

²⁸ Mutació que elimina un o més nucleòtids.

ANNEX 5: CÈL·LULES EN EL LABORATORI

En els laboratoris en els quals s'estudien camps de la biologia, i més específicament, en els que s'estudia la biologia molecular o biomedicina, la branca de la biologia que estudia la vida des de les molècules, com el DNA o les proteïnes, se solen utilitzar cèl·lules. D'aquesta manera, en un laboratori d'oncologia, en el qual es busquen noves maneres i medicaments per tractar el càncer, es pot experimentar amb cèl·lules per veure si són útils o no.

a. Cultius cel·lulars

Els cultius cel·lulars són els processos realitzats en un laboratori en un laboratori en els quals es donen les condicions òptimes (llum, concentració de gasos, temperatura, humitat, pressió, nutrients, etc.) per a què cèl·lules eucariotes o procariotes creixin.

Primer, és necessari aïllar les cèl·lules d'un teixit inicial o es poden comprar a companyies biotecnològiques que les venen. Es poden cultivar en plaques contínuament, fins a immortalitzar-les.

Normalment, la temperatura a la qual es mantenen les cèl·lules és de 37° i la concentració de gasos, 5% de CO₂ i 95% de O₂. Els medis solen tenir els nutrients necessaris, com glucosa o aminoàcids, i factors de creixement. El medi es va canviant al cap de dies perquè no s'esgotin els nutrients necessaris.

Hi ha dos tipus de cèl·lules: les que es mantenen en suspensió, a les quals, per canviar-li el medi cal centrifugar la placa perquè totes les cèl·lules vagin al fons i poder extreure el medi, i les adherents, a les quals se'ls pot aspirar el medi directament.

Per a passar cèl·lules d'un recipient a un altre, cal agafar un petit volum de la dissolució amb cèl·lules en suspensió, i tripsinitzar les cèl·lules i agafar una mica de dissolució amb cèl·lules d'adhesió.

Com que les cèl·lules s'estan dividint contínuament, és habitual que les cèl·lules vagin creixent fins a ocupar tot el volum del recipient. Les manipulacions es fan amb guants, bata, casquet i peücs en una campana de flux laminar (45).

b. Línia cel·lular

Per fer estudis que requereixin l'ús de cèl·lules són imprescindibles les línies de cultiu cel·lular. Aquestes són cèl·lules clòniques, és a dir, que són exactament iguals, les quals parteixen d'una inicial que es va aïllar en un determinat moment perquè es va considerar interessant. Com totes són iguals, es manté el control de l'experiment i es poden aportar resultats fiables.

i. MDA-MB-231

És una línia cel·lular molt utilitzada per estudiar el càncer de mama. Provenen d'un vessament pleural d'una pacient amb càncer de mama, i van ser immortalitzades per Cailleu i el seu equip d'investigadors. La pacient va morir en l'Anderson Hospital.

Aquestes cèl·lules creixen molt ràpidament gràcies a que elles mateixes secreten factors de creixement que necessiten (46).

ii. MDA-MB-436

També és una línia cel·lular utilitzada per investigar el càncer de mama, però molt menys utilitzades que les esmentades anteriorment, ja que tenen un creixement molt més lent. Provenen d'una metàstasi al pulmó, provocant un vessament pleural. Són pleomòrfiques²⁹ i multinucleades³⁰.

La pacient de la qual provenen tenia un adenocarcinoma, 43 anys i era caucàsica (47).

iii. HCC1937 -/-

Aquesta línia està formada per limfoblasts i cèl·lules epitelials. Les cèl·lules provenen d'un carcinoma ductal d'una dona de 23 anys caucàsica. A més, el tumor era de grau 3.

Se li ha incorporat una mutació de perquè no tingui la proteïna BRCA1. Això s'indica amb el -/-: no té cap dels dos al·lells dels gens.

iv. HCC1937 +/+

La línia cel·lular HCC1937 és idèntica que l'anterior: limfoblasts i cèl·lules epitelials de carcinoma ductal de grau 3 provinent d'una pacient caucàsica de 23 anys.

Aquesta línia sempre conté la proteïna BRCA1. El +/+ indica que conté els dos al·lells del gen que codifica la proteïna (48).

c. Medi de cultiu

Quan es treballa amb cèl·lules en un laboratori, cal mantenir-les en recipients que continguin tot el que necessitin per viure: glucosa, aminoàcids, sals, aigua, potassi, fòsfor, nitrogen, sofre, magnesi, etc. Aquesta substància és el medi de cultiu i pot ser força diferent depenent del tipus de cèl·lules amb que es treballa.

Amb cèl·lules procariotes, normalment s'utilitza un medi sòlid, format per LB agar³¹, i després, si es vol augmentar el nombre de cèl·lules considerablement, es passa a un medi líquid.

²⁹ Que poden adoptar diferents formes.

³⁰ Que tenen més d'un nucli.

³¹ L'agar és un polisacàrid format per galactoses, que és gelatinós i s'obté de les algues. L'LB és un líquid molt nutritiu i adient per a cultivar bacteris.

Si es treballa amb cèl·lules eucariotes, normalment s'utilitzen medis líquids, com l'RPMI o el DMEM.

Segons l'ús que poden tenir, els medis es poden classificar en molts tipus diferents, sent els més importants els següents:

- General: creixen tot tipus de microorganismes
- Medi selectiu: només poden créixer un tipus d'organismes.
- Medi diferencial: permet identificar una espècie determinada (49).

d. Plaques

Tant el medi com les cèl·lules han d'estar en un recipient que les contingui. Aquest recipient són les plaques de cultiu, les quals són estèrils i generalment estan compostes per plàstic.

Per a les cèl·lules procariotes, se solen utilitzar les plaques de Petri de plàstic, a les quals se'ls afegeix l'LB Agar.

Per a les cèl·lules eucariotes, també es poden utilitzar plaques de petri, però les que més s'utilitzen són plaques amb 6 pouets. També s'utilitzen força les de 12 o de 96 (50).

e. Colònies de cèl·lules

Una colònia es basa en una agrupació d'organismes d'una mateixa espècie que viuen cooperant els uns amb els altres, de manera que aconsegueixen ser més forts en defensa o en atac a altres organismes. fins al punt que uns organismes s'especialitzen en una funció determinada.

Les colònies poden ser d'organismes pluricel·lulars o unicel·lulars. En el primer cas, els organismes s'especialitzen en una funció determinada i formen una societat molt ben estructurada. En el segon, una cèl·lula inicial es reproduïx clònicament fins que forma una aglomeració, observable a ull nu, d'organismes idèntics que treballen conjuntament. En aquesta colònia, els organismes estan molt a prop físicament.

Per a l'estudi de colònies que hem fet en aquest Treball de Recerca s'han utilitzat poques cèl·lules en cada pouet de la placa, per veure si amb el tractament són capaces de dividir-se múltiples vegades com per formar un conjunt d'organismes idèntics, la qual confereix força a aquests, o si el tractament és suficientment efectiu com per evitar aquestes poblacions (51).

f. Proliferació cel·lular

Tota cèl·lula, en un determinat moment de la seva vida, haurà de dividir-se per donar lloc a noves cèl·lules filles. Les cèl·lules es divideixen d'una forma diferent depenent del teixit en el qual es trobin, però totes passen pels mateixos processos

per arribar a la mitosi, la divisió cel·lular. En totes les cèl·lules, hi haurà un augment de la massa cel·lular i una especialització dels orgànuls per complir amb totes les funcions necessàries. Aquest conjunt de “passos” pels quals les cèl·lules han de passar, i conformen la vida completa d'una cèl·lula s'anomena “cicle cel·lular”.

El cicle cel·lular és una seqüència de processos de forma ordenada i no és reversible. La cèl·lula pot estar en interfase (el 90% del temps) o en divisió, ja sigui mitosi o meiosi (el 10% del temps).

Interfase:

- Fase G1 (gap, interval 1): s'expressen la gran majoria dels gens i se sintetitzen totes les proteïnes necessàries. Dura entre 6 i 12 hores i s'incrementa molt la mida de la cèl·lula.
- Fase S (synthesis, síntesi 1): es replica el DNA. És en aquesta fase en la que prestem més atenció en aquest Treball de Recerca, ja que l'estrès replicatiu apareix en la replicació de l'àcid nucleic bicatenari. Dura entre 10 i 12 hores.
- Fase G2 (gap, interval 2): s'acaben de sintetitzar les proteïnes necessàries per a la mitosi. Dura entre 3 i 4 hores.

Fase M:

És el procés de divisió cel·lular i ocupa un 10% de la vida de la cèl·lula. Pot ser una mitosi, que és el procés de divisió de les cèl·lules somàtiques i consta de profase, metafase, anafase, telofase i citocinesi, i la meiosi, que és la divisió que permet originar cèl·lules sexuals, i està basada en la profase I, metafase I, anafase I, telofase I, profase II, metafase II, anafase II i telofase II. Dura uns 30 minuts.

En les cèl·lules eucariotes, la proliferació consisteix en un augment del nombre de cèl·lules que hi ha en un mateix recipient. Per tant, en aquest Treball de Recerca vam fer un estudi de proliferació, observant la viabilitat de les cèl·lules després d'haver estat tractades amb la inhibició de TLK1 i TLK2 amb siRNAs i de PARP amb olaparib. D'aquesta manera, amb el colorant cristall violeta, es podrà observar com ha variat el nombre de cèl·lules dels pouets tractats respecte els pouets control (52).

g. Anàlisi de les proteïnes: Western Blot

En una mostra de lisat³² de cèl·lules en les quals es vol saber quines proteïnes hi ha i, en cas que n'hi hagi, en quina quantitat aproximadament es troba, s'utilitza un Western Blot.

³² Substància que es forma en trencar la membrana plasmàtica de les cèl·lules.

En un Western Blot, es realitza una electroforesi amb un gel d'acrilamida³³, el qual es pot comprar o es pot preparar al laboratori. En el gel, es carreguen les diferents mostres, reservant sempre el primer pouet per a carregar el marcador, el qual conté proteïnes amb pesos moleculars coneguts, i ens permetrà saber quin pes té, aproximadament, la proteïna que busquem. Les proteïnes són desnaturalitzades³⁴, pel que la seva estructura tridimensional no afecta al resultat en el gel i són carregades negativament. L'electroforesi és una tècnica que es basa en l'aplicació d'un camp elèctric per desplaçar unes mostres d'una banda a l'altra del gel. Les mostres es col·loquen al costat de l'ànode (elèctrode negatiu), perquè corrin cap al càtode (elèctrode positiu), pel qual se senten atretes per forces electrostàtiques.

Per saber la quantitat de mostra que hem de posar en el pou, necessitem calcular la seva concentració, és a dir, quantificar les mostres. Per fer-ho, el lector de plaques fa una recta patró absorbància (eix y)-concentració (eix x) i, a partir d'unes mostres amb concentració coneguda, calcula l'absorbància d'aquestes i extrapola els resultats per calcular les concentracions de les nostres mostres (Figura 36).

La R^2 (coeficient de determinació, indica com de fiables són els resultats, i per sobre de 0,98 és correcte) de 0,991.

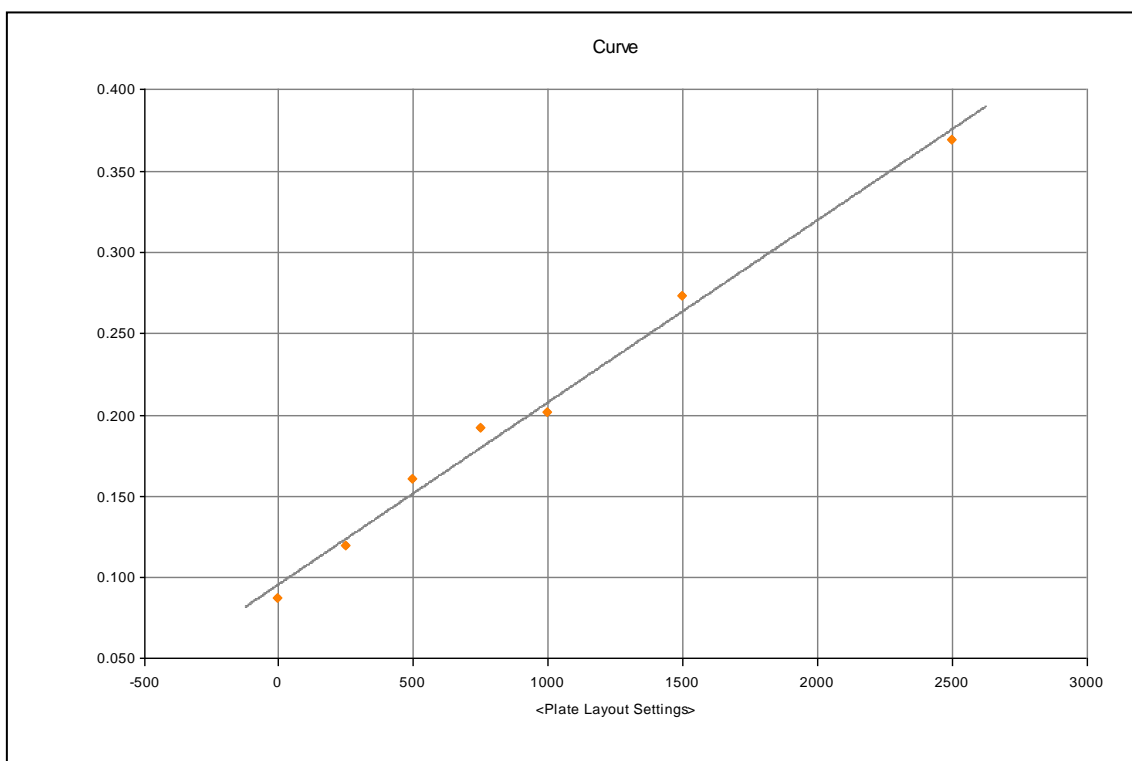


Figura 36. Recta patró elaborada pel lector de plaques. A partir de les mostres amb concentració coneguda, elabora la recta que es pot observar. Després, amb cada mostra a quantificar, calcula la quantitat de llum (absorbància) que té, i utilitza la recta per saber la concentració que li pertoca.

³³ Compost que quan polimeritza forma gels que s'utilitzen per estudiar les proteïnes.

³⁴ Que tenen una estructura diferent de l'habitual.

Després, es transfereix el gel a una membrana, que pot ser de nitrocel·lulosa o de PVDF, amb un “sandwich” que conté una esponja, dos papers de filtre, el gel, la membrana, dos altres papers de filtre i una altra esponja. Es deixa reposar en una solució tamponada i les proteïnes es transfereixen.

Més endavant, s’han de bloquejar les proteïnes amb llet en pols, de manera que altres proteïnes no afectin els resultats. També s’utilitzen dos anticossos per a detectar les proteïnes d’interès: un anticòs primari, que està dirigit a la proteïna d’interès, i un anticòs secundari, que reconeix l’anticòs primari, i conté un enzim que emet llum.

Finalment, s’apliquen els reactius necessaris a la membrana perquè emeti llum, i els resultats es revelen en films que, en ser tractats amb una màquina, es poden observar les bandes que s’han format, i cada una d’aquestes pertany a una proteïna determinada (53).

ANNEX 6: MATERIAL I MÈTODES

Material:

- Eines:
 - Bomba de buit
 - Puntetes de vidre
 - Micropipetes
 - Puntetes de plàstic
 - Pipetejador automàtic
 - Pipetes serològiques
 - Plaques de cultiu cel·lular
 - Microscopi invertit
 - Campana de cultius
 - Bany Maria
 - Incubador
 - Dispensette
 - Coulter
 - Falcons
 - Eppendorfs
 - Pipeta Pasteur
 - Vas de precipitats
 - Congelador (-80°C)
 - Rascador
 - Sonicador
 - Bloc tèrmic
 - Lector de plaques
 - Tires de tubs
 - Cubeta
 - “Sandwich”
 - Safata
 - Esponges
 - Papers de filtre
 - Agitador
 - Marc fosc
 - Film
 - Màquina reveladora de films

- Químics:
 - DMEM
 - RPMI
 - FBS
 - P/S
 - PBS
 - Opti-MEM
 - siTLK

- siGFP
- Lipofectamina RNAiMAX
- Olaparib
- DMSO
- SDS
- Aigua MilliQ
- BSA
- Reactiu A
- Reactiu B
- Reactiu S
- β-mercaptoetanol
- Blau de bromofenol
- Separating buffer
- TEMED
- APS
- Isopropanol
- Transfer buffer
- Gel d'acrilamida
- Colorant Ponceau
- PBST
- Llet en pols
- Anticòs primari
- Anticòs secundari

- Biològics:
 - Cèl·lules MDA-MB-231
 - Cèl·lules MDA-MB-436

Càlculs:

- Plaquejat de cèl·lules (abans del silenciament amb siRNAs):
Cèl·lules MDA-MB-231:

S'han de plaquejar 400000 cèl·lules / mL.

Volem plaquejar-ho en 7 pous (es calcula per a un més per si no n'hi ha suficient).

Volem plaquejar 3 mL de volum total en cada pou.

$$400000 \cdot 7 = 2800000 \text{ cèl·lules}$$

$$\frac{2800000}{673400} = 4,16 \text{ mL cèl·lules}$$

$$21 \text{ (volum total que volem: } 7 \text{ pous} \cdot 3 \text{ mL} = 21 \text{ mL)} - 4,16 = 16,84 \text{ mL medi}$$

$$4,16 \text{ mL cèl·lules} + 16,84 \text{ mL medi} = 21 \text{ mL totals} \rightarrow 3 \text{ mL / pou}$$

Línia cel·lular	Cèl·lules que necessitem per mL	Cèl·lules que necessitem per mL en els 7 pous	Cèl·lules comptades (cèl·lules/mL)	mL de cèl·lules	mL medi (21 mL totals – mL cèl·lules)
MDA-MB-231	400000	2800000	673400	4,16	16,84
MDA-MB-436	400000	2800000	$1,44 \cdot 10^6$	1,94	19,06

- Plaquejat de cèl·lules (abans del tractament amb olaparib):
Proliferació cel·lular:

Necessitem 20000 cèl·lules

Tenim 3 plaques de 12 pous: $3 \cdot 12 = 36 \approx 40$ pous (en fem uns quants més per assegurar els resultats).

Volem col·locar 1 mL de volum total en cada pou.

Hem de posar 20000 cèl·lules per mL.

Cèl·lules totals que necessitem (en els 40 pous) = $20000 \cdot 40 = 800000$ cèl·lules

mL cèl·lules per a l'estudi de Proliferació: $\frac{800000}{163900} = 4,88$ mL cèl·lules

mL medi per a Proliferació: 40 (40 pous \cdot 1 mL de volum = 40 mL) – $4,88 = 35,12$ mL medi

$4,88$ mL cèl·lules + $35,12$ mL medi = 40 mL totals \rightarrow 1 mL / pou

Línia cel·lular	Cèl·lules que necessitem per mL	Cèl·lules totals que necessitem en els 40 pous	Cèl·lules comptades (cèl·lules/mL)	mL de cèl·lules que necessitem per a l'estudi de Proliferació	mL de medi per a l'estudi de Proliferació
231 amb siGFP	20000	800000	163900	4,88	35,12
231 amb siTLK	20000	800000	271700	2,94	37,06
436 amb siGFP	20000	800000	212300	7,54	32,46
436 amb siTLK	20000	800000	224600	7,12	32,88

Formació de colònies:

Per cada línia i condició, tenim 8 pous \approx 10 pous (per assegurar).

Volem col·locar 3 mL de volum total en cada pou.

Hem de posar 500 cèl·lules per pou en les cèl·lules 231 i 1000 cèl·lules per pou en les 436.

Cèl·lules totals que necessitem (en els 10 pous de 231 amb siGFP, per exemple) = $500 \cdot 10 = 5000$ cèl·lules

mL cèl·lules per a l'estudi de Formació de Colònies: $\frac{5000}{163900} = 0,030$ mL cèl·lules = 30 μ L cèl·lules

mL medi per a Formació de Colònies: 30 (10 pous \cdot 3 mL de volum = 30 mL) – $0,030 = 29,97$ mL medi \approx 30 mL medi

$0,030$ mL cèl·lules + 30 mL medi = $30,03 \approx 30$ mL totals \rightarrow 3 mL / pou

Línia cel·lular	Cèl·lules que necessitem per pou	Cèl·lules totals que necessitem en els 10 pous	Cèl·lules comptades (cèl·lules/mL)	μ L de cèl·lules que necessitem per a l'estudi de Formació de Colònies	mL de medi per a l'estudi de Formació de Colònies
231 amb siGFP	500	5000	163900	30	30
231 amb siTLK	500	5000	271700	18	30
436 amb siGFP	1000	10000	212300	47	30
436 amb siTLK	1000	10000	224600	45	30

Western Blot:

Per cada línia i condició, tenim 4 pous \approx 5 pous (per assegurar).

Volem col·locar 3 mL de volum total en cada pou.

Hem de posar 60000 cèl·lules per pou.

Cèl·lules totals que necessitem = $60000 \cdot 5 = 300000$ cèl·lules

mL cèl·lules per a l'estudi de Western Blot: $\frac{300000}{163900} = 1,8$ mL cèl·lules

mL medi per a Western Blot: 15 (5 pous \cdot 3 mL de volum = 15 mL) – $1,8 = 13,2$ mL medi

$1,8$ mL cèl·lules + 13,2 mL medi = 15 mL totals \rightarrow 3 mL / pou

Línia cel·lular	Cèl·lules que necessitem per pou	Cèl·lules totals que necessitem en els 5 pous	Cèl·lules comptades (cèl·lules/mL)	mL de cèl·lules que necessitem per a l'estudi de Western Blot	mL de medi per a l'estudi de Western Blot
231 amb siGFP	60000	300000	163900	1,8	13,2
231 amb siTLK	60000	300000	271700	1,1	13,9
436 amb siGFP	60000	300000	212300	1,4	13,6
436 amb siTLK	60000	300000	224600	1,3	13,7

- Tractament de les cèl·lules amb olaparib:

Vam col·locar 1 mL de dissolució per pouet en l'estudi de proliferació cel·lular, i 1,5 mL per pouet per al Western Blot i l'estudi de formació de colònies. Vam dissoldre 2 µL d'olaparib en 20 mL de medi, per a l'estudi de proliferació cel·lular, i 3,2 µL d'olaparib en 32 mL de medi per al Western Blot i l'estudi de formació de colònies. Teníem 3 stocks (dissolucions): una molt concentrada 10 mM, una poc concentrada 5 mM i una molt poc concentrada 1 mM. Vam utilitzar la fórmula ($V_F \cdot C_F = V_I \cdot C_I$) per calcular els µL de dissolució de cada stock necessaris per aconseguir les 3 concentracions desitjades per tractar les cèl·lules: 1 µM, 500 nM i 100 nM.

1 µM

$$V_F \cdot C_F = V_I \cdot C_I$$

$$1 \text{ mL} \cdot 1 \text{ µM} = x \cdot 10 \text{ mM (1r stock)}$$

$$1000 \text{ µL} \cdot 1 \text{ µM} = x \cdot 10000 \text{ µM (1r stock)}$$

$$x = \frac{1000 \cdot 1}{10000} = 0,1 \text{ µL d'stock 10 mM}$$

$\frac{0,1 \text{ µL stock}}{1 \text{ mL dissolució total}} = 0,0001 \text{ \% de DMSO (el recomanable és que no sigui superior al 0,1\%). Com tenim un resultat molt inferior, és millor).}$

Com tenim 20 pous:

$$0,1 \text{ µL} \cdot 20 = 2 \text{ µL}$$

$$1 \text{ mL de dissolució final} \cdot 20 = 20 \text{ mL}$$

Per tant, 2 µL d'olaparib en 20 mL de dissolució final.

Concentració que volem aconseguir	Stock inicial	μL d'olaparib en mL de dissolució final
1 μM	10 mM	0,1 μL de l'stock 10 mM en 1 mL de dissolució final (0,001 % DMSO)
500 nM	5 mM	0,1 μL de l'stock 5 mM en 1 mL de dissolució final (0,001 % DMSO)
100 nM	1 mM	0,1 μL de l'stock 1 mM en 1 mL de dissolució final (0,001 % DMSO)

Com per a l'estudi de proliferació necessitàvem 1 mL de dissolució final (medicament dissolt en DMSO i medi) / pou, i teníem 18 pous per a cada concentració (20 aproximadament, sempre es calcula per una mica més), i havíem calculat que necessitàvem 0,1 μL de medicament per cada 1 mL de dissolució final a cada pouet, si teníem 20 pouets, necessitaríem 2 μL de medicament en 20 mL de dissolució final.

Per a l'estudi de Western Blot, necessitàvem 1,5 mL de dissolució final / pou. Teníem 8 pous, i com havíem de posar 1,5 mL a cada pou, necessitàvem 12 mL de dissolució final, en els quals hi hagués 1,2 μL de medicament.

Finalment, per a l'estudi de formació de colònies, també necessitàvem 1,5 mL de dissolució final / pou. Teníem 16 pous, i com havíem de posar 1,5 mL a cada pou, necessitàvem 24 mL, però com s'ha de calcular per una mica més, 32 mL, en els quals hi havia 3,2 μL de medicament.

Si ens fixem en els càlculs, podem veure que els 3 donen 0,1 μL de dissolució. Llavors, com podem tenir les tres concentracions diferents? Doncs perquè agafem 0,1 μL de dissolució, però no sempre de la mateixa dissolució inicial (stock). Per a la dissolució més concentrada (1 μM), vam agafar 0,1 μL de l'stock més concentrat (10 mM). Per a la dissolució mitjanament concentrada (500 nM), vam agafar 0,1 μL , però de l'stock mitjanament concentrat (5 mM). Per a la dissolució poc concentrada (100 nM), vam agafar 0,1 μL , però de l'stock menys concentrat (1 mM).

Finalment, també ens podem preguntar: perquè fem tres stocks diferents, i no agafem directament d'un stock superconcentrat? Es podria fer així, però s'haurien

d'agafar diferents volums de dissolució (per al més concentrat, s'haurien d'agafar molts µL; per al mitjanament concentrat, s'haurien d'agafar bastants µL; i per al superpoc concentrat, s'haurien d'agafar molt pocs µL). Justament això és el que no volem: agafar diferents volums de dissolució, perquè el medicament està dissolt en DMSO, el qual és tòxic, i si agafem el mateix volum de dissolució (0,1 µL), el control es manté. Per tant, el que volem és agafar sempre el mateix volum de dissolució (0,1 µL), i per tal de fer-ho, és necessari fer 3 stocks diferents, els quals tenen concentracions diferents de medicament.

- Preparació de les mostres per al Western Blot:

Vam posar la placa en el lector, i vam obtenir els següents resultats:

Well ID	Name	Well	Conc/Dil	Read 750:750	Conc	Count	Mean	Std Dev	CV (%)
SPL1		G1	10	0,139	382,452	1	382,452	?????	?????
SPL2		G2	10	0,125	257,406	1	257,406	?????	?????
SPL3		G3	10	0,13	302,066	1	302,066	?????	?????
SPL4		G4	10	0,129	293,134	1	293,134	?????	?????
SPL5		G5	10	0,127	275,27	1	275,27	?????	?????
SPL6		G6	10	0,117	185,952	1	185,952	?????	?????
SPL7		H7	10	0,115	168,088	1	168,088	?????	?????
SPL8		H8	10	0,15	480,703	1	480,703	?????	?????
SPL9		H9	10	0,107	96,633	1	96,633	?????	?????
SPL10		H10	10	0,228	1177,387	1	1177,387	?????	?????
SPL11		H11	10	0,121	221,679	1	221,679	?????	?????
SPL12		H12	10	0,127	275,27	1	275,27	?????	?????

A partir de la concentració calculada pel lector de plaques, vam fer una altra taula per saber com hauríem de preparar les nostres mostres per al gel d'acrilamida:

MDA-MD-436 GFP Ø:

$$\text{Concentració: } \frac{382,45}{100} = 3,82 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

µL de mostra que hem d'agafar per tenir 40 µg de proteïna:

$$40 \mu\text{g} \cdot \frac{1 \mu\text{L}}{3,82 \mu\text{g}} = 10,46 \mu\text{L de mostra (conté 40 } \mu\text{g de proteïna)}$$

µL d'aigua que hem d'afegir per tenir 25 µL totals: 25 µL – 10,46 µL de mostra = 14,54 µL d'aigua

Sempre s'afegiran 12 µL de 2X SDS

	Concentració	Concentració en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Volem 40 μg . Resultat en μL	Ajustar el volum a 25 μL	2X SDS (μL)
MDA-MD-436 GFP \emptyset	382,45	3,82	10,46	14,54	12,00
MDA-MD-436 GFP 1 μM	257,41	2,57	15,54	9,46	12,00
MDA-MD-436 GFP 100 nM	302,07	3,02	13,24	11,76	12,00
MDA-MD-436 TLK \emptyset	293,13	2,93	13,65	11,35	12,00
MDA-MD-436 TLK 1 μM	275,27	2,75	14,53	10,47	12,00
MDA-MD-231 TLK 100 Nm	185,95	1,86	21,51	3,49	12,00
MDA-MD-231 GFP \emptyset	168,09	1,68	23,80	1,20	12,00
MDA-MD-231 GFP 1 μM	480,70	4,81	8,32	16,68	12,00
MDA-MD-231 GFP 100 nM	96,63	0,97	41,39	-16,39	12,00
MDA-MD-231 TLK \emptyset	1177,39	11,77	3,40	21,60	12,00
MDA-MD-231 TLK 1 μM	221,68	2,22	18,04	6,96	12,00
MDA-MD-231 TLK 100 nM	275,27	2,75	14,53	10,47	12,00

En la primera columna hi ha la concentració de les mostres donada per l'aparell; en la segona, la concentració d'aquestes en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; en la tercera, els μL de mostra que necessitem per tenir 40 μg de proteïna (quantitat suficient com per ser observada en un gel); en la quarta columna, els μL d'aigua que necessitem per tenir 25 μL totals, i en la cinquena, els μL de 2X SDS que necessitem per a les mostres. Vam agafar tires de tubs i vam afegir a aquests el volum adequat de mostra i d'aigua, a més dels 12 μL de 2X SDS, que contenia β -mercaptoetanol, per desnaturalitzar les proteïnes, i blau de bromofenol, com a marcador per indicar en quin punt es troben les proteïnes en el gel. La fila de MDA-MD-231 GFP 100 nM està en vermell perquè no va produir una quantitat suficient de proteïna com per ser observada en el Western Blot, per tant, vam descartar aquesta mostra i vam decidir no carregar-la al gel d'acrilamida.

- Detecció de proteïnes:

En el Western Blot, vam utilitzar membranes de nitrocel·lulosa, on la proporció anticòs-dissolució ha de ser 1:15000. Per tant, 1 µL d'anticòs secundari per cada 15 mL de dissolució. Si teníem 40 mL de llet en 2 Falcons:

$$40 \text{ mL llet} \cdot \frac{1 \mu\text{L anticòs}}{15 \text{ mL llet}} = 2,67 \mu\text{L anticòs}$$

S'havien de posar 2,67 µL d'anticòs en els 40 mL de llet de cada tub Falcon.

ANNEX 7: INFORMACIÓ SOBRE ELS INVESTIGADORS CONSULTATS

DRA. NEUS AGELL JANÉ

Llicenciada en Química per la Universitat de Barcelona. El grau de doctor en Biologia el va obtenir també a la Universitat de Barcelona (UB) l'any 1986.

És Catedràtica del Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències a la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la UB (Campus Clínic) i Vicedegana de Recerca de la Facultat de Medicina.



Té experiència docent tant en assignatures de la llicenciatura i del grau de Medicina (Biologia Cel·lular, Biologia del Desenvolupament, i Biologia Molecular i Cel·lular del Càncer), com dels antics programes de doctorat.

És coordinadora i professora del nou Màster Oficial de Biomedicina de la UB adaptat a l'Espai Europeu.

Actualment forma part de la comissió coordinadora del Programa de doctorat de Biomedicina de la UB.

Té nombroses publicacions en revistes científiques de reconegut prestigi i participa habitualment en congressos, seminaris i activitats de divulgació científica.

Ha dirigit diverses tesis doctorals.

DRA. ROSA MARIA ALIGUÉ ALEMANY

Llicenciada en Biologia per la Universitat de Barcelona l'any 1987. Va obtenir el grau de doctor en Biologia a la Universitat de Barcelona (UB) l'any 1991.

És Professora Titular del Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències a la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la UB (Campus Clínic) i Coordinadora de l'assignatura "Biologia Cel·lular i del Desenvolupament" de 1r curs del grau de Medicina.



Té experiència docent en assignatures troncal:

- 6 anys d'experiència docent impartint "Biologia Cel·lular" al primer curs de la llicenciatura de Medicina. UB. Campus Bellvitge. (1997-2003).
- 6 anys d'experiència docent impartint "Biologia Cel·lular" al primer curs de la llicenciatura d'Odontologia. UB. Campus Bellvitge. (1997-2003).
- 6 anys d'experiència docent impartint "Biologia Cel·lular" al primer curs de la llicenciatura de Farmàcia. UB. (2004-2009).
- 8 anys d'experiència docent impartint "Biologia Cel·lular i del Desenvolupament" al primer curs de la llicenciatura/grau de Medicina. UB. Campus Clínic. (2010-2018).

Membre del grups d'experts ANEP (2010 - 2011).

DR. OCTAVI CÓRDOBA CARDONA

Llicenciat en Medicina i Cirurgia per la Universitat de Barcelona. El grau de doctor el va obtenir a la Universitat Autònoma de Barcelona amb la seva tesi "Càncer de mama y embarazo".



És ginecòleg especialitzat en càncer de mama.

Va ser professor associat a la Universitat Rovira i Virgili entre els anys 2004 i 2008. Des de l'any 2010 fins el 2017, va ser professor associat clínic a la Universitat Autònoma de Barcelona.

És tutor de residents de ginecologia des de l'any 2007. Ha fet múltiples cursos formatius per millorar l'avaluació i motivació dels residents.

Actualment treballa com a Cap del Servei d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital Universitari Son Espases de Palma de Mallorca des de l'any 2017.

Anteriorment ha treballat a la Unitat de Patologia Mamària de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron des de l'any 2004 fins al 2017, com a especialista en cirurgia de la mama.

Desenvolupa tasques com investigador principal en un projecte de recerca centrat en l'efecte de l'exposició a la quimioteràpia rebuda durant el desenvolupament fetal. Aquest projecte ha rebut una beca FIS. També col·labora com investigador principal en diferents estudis internacionals.

Ha publicat el resultat de la seva recerca en múltiples articles en revistes internacionals.

Ha fet multitud de presentacions, pòsters i ponències en cursos i congressos nacionals i internacionals.

És membre de la junta de la secció de ginecologia oncològica i patologia mamària de la Societat Catalana de Ginecologia i Obstetrícia.

DR. FELIPE CORTÉS LEDESMA

Llicenciat en Biologia per la Universitat de Sevilla l'any 2000. El grau de doctor en Biologia molecular i cel·lular el va obtenir també a la Universitat de Sevilla l'any 2006.

És investigador principal del “Departamento de Células Troncales” al Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) a Sevilla.



També és científic titular al “Consejo Superior de Investigaciones Científicas” (CSIC).

Beques obtingudes:

- ✓ Investigador postdoctoral CABIMER – Sevilla, juliol 2006 - gener 2007
- ✓ “EMBO long-term” fellow GDSC (University of Sussex) gener 2007- juny 2008
- ✓ “Marie Curie” fellow GD SC (University of Sussex, UK) juliol 2008 - juny 2010
- ✓ “Ramón y Cajal” fellow Junior Group Leader Lecturer CABIMER - Sevilla, juliol 2010 - juny 2014

Premis:

- ✓ EMBO Jove Investigador (2014)
- ✓ Premi Investigador Jove SEBBM - Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (2014)
- ✓ Premi a la Excelencia de los Jóvenes Investigadores Sevillanos. Ayuntamiento de Sevilla-CSIC (2013)
- ✓ Premio Jóvenes Investigadores de la Real Maestranza de Caballería de Sevilla (2010)
- ✓ Premio extraordinario de Licenciatura (2000)

Té nombroses publicacions en revistes científiques de reconegut prestigi i participa habitualment en congressos, seminaris i activitats de divulgació científica.

DR. ÓSCAR FERNÁNDEZ-CAPETILLO

Llicenciat en Bioquímica per la Universitat del País Basc. El grau de doctor en Bioquímica el va obtenir també a la Universitat del País Basc l'any 2001.

Va continuar la seva formació a l'Institut Nacional del Càncer d'EEUU, en el laboratori del Dr. André Nussenzweig (2001-2004).



És investigador del “Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas” (CNIO) a Madrid des de 2005 i actualment ocupa també el lloc de Vice-director.

Entre les seves investigacions destaca la relació existent entre una font de dany en l'ADN anomenat estrès replicatiu amb el càncer i l'envelliment.

Des de 2015 també és catedràtic de "Cancer Therapy" en l'Institut Karolinska d'Estocolm.

Ha obtingut els següents premis:

- ✓ 2015 - Premio de Investigación de la Fundación Carmen y Severo Ochoa.
- ✓ 2014 - ERC Consolidator Grant.
- ✓ 2011 - Premio de la Fundación Banc de Sabadell.
- ✓ 2011 - International Early Career Scientist, Howard Hughes Medical Institute.
- ✓ 2009 - Eppendorf-Nature Award for Young Investigators.
- ✓ 2008 - ERC Starting Grant.
- ✓ 2005 - Premio Swiss Bridge.

Té nombroses publicacions en revistes científiques de reconegut prestigi i participa habitualment en congressos, seminaris i activitats de divulgació científica.

DR. PABLO HUERTAS SÁNCHEZ

Llicenciat en Biologia per la Universitat de Sevilla l'any 1998. El grau de doctor en Biologia molecular i cel·lular el va obtenir també a la Universitat de Sevilla l'any 2004.

És investigador principal del "Departament de Biologia genòmica" al Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) a Sevilla.



Anteriorment va fer un postdoctorat a la Universitat de Cambridge (UK) com a investigador associat a "Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute" de 2004 a 2010.

Es professor titular de la Universitat de Sevilla, on ha estat responsable dels següents projectes:

- ✓ "Mechanistic analysis of DNA damage signaling and bypass upon replication of damaged DNA template in human cells".
- ✓ "Regulación de la recombinación en el contexto celular".
- ✓ "Regulación del procesamiento de los cortes de doble cadena en el ADN y su implicación en el desarrollo tumoral".
- ✓ "Relación del daño en fase S y los defectos de segregación en mitosis en los síndromes recesivos con microcefalia".
- ✓ "Relevance of double strand break repair pathway choice in human disease and cancer".
- ✓ "Modulación en el contexto del ciclo celular del tipo de reparación de cortes de doble cadena en el DNA en eucariotas superiores".

Té nombroses publicacions en revistes científiques de reconegut prestigi i participa habitualment en congressos, seminaris i activitats de divulgació científica.

L'any 2015 va esser l'únic jove científic espanyol destacat per l'Organització Europea de Biologia Molecular.

DR. JOSÉ ANTONIO TERCERO ORDUÑA

Llicenciat en Biologia per la Universitat Autònoma de Madrid. El grau de doctor en Biologia molecular i cel·lular el va obtenir també a la Universitat Autònoma de Madrid l'any 1992.



Des de fa anys és investigador principal del grup de treball “Replicación cromosómica y estabilidad del genoma” que pertany al Departament de “Dinámica y Función del Genoma” del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), adscrit al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

És professor del Departament de Biologia Molecular a la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Madrid.

Té nombroses publicacions en revistes científiques de reconegut prestigi i participa habitualment en congressos, seminaris i activitats de divulgació científica.

Ha dirigit diverses tesis doctorals.

ANNEX 8: RESUM DE LES REUNIONS CELEBRADES AMB ELS INVESTIGADORS CONSULTATS

RESUM DE LA CONVERSA AMB LA DRA. NEUS AGELL

Facultat de Medicina - Barcelona, 22 de maig de 2018

Plantejament de la necessitat de comptar amb referències bibliogràfiques que fonamentin el treball experimental realitzat durant la fase empírica desenvolupada a l'IRB.

Especialitat del grup de treball (Figures 37 i 38): estrès replicatiu i càncer.

La primera qüestió és la quantitat de vegades que hem de replicar les cèl·lules i el seu DNA. Hi ha càlculs que diuen que hem de replicar al llarg de la vida 130.000 vegades la distància entre el Sol i la Terra, de forma que la quantitat d'errors en cèl·lules és important i depèn d'on es produeix l'error pot representar danys en el DNA.

A la cèl·lula tenim 3GB de DNA, si cada cromosoma tingués un únic origen, es trigaria moltíssim a fer la replicació. Però no tots els orígens s'activen a la vegada, sinó de forma seqüencial. El moment en què s'activa l'origen determina que el DNA tindrà unes implicacions epigenètiques concretes, el que repercutirà en l'activitat transcripcional. No només s'ha d'activar bé el DNA sinó replicar correctament, és a dir, s'han de copiar bé les marques epigenètiques, perquè sinó es canviarien les cèl·lules.

A la forqueta de replicació és important comprovar que la replicació es fa correctament.

El replisoma es pot trobar amb problemes, com pot ser un tros de DNA que s'ha transcrit malament, etc. i pot fer que la forqueta s'aturi i la replicació es trobi amb dificultats, de forma que la cèl·lula aturi la replicació. En aquest moment en què s'ha produït l'estrès replicatiu, la cèl·lula té fórmules per sortir del problema i reparar l'obstacle. Si no pot fer-ho, la cèl·lula activarà un altre sistema dels que té en el seu backup. Així doncs, la cèl·lula activa la resposta, que és el checkpoint, per aturar el cicle, reparar i solucionar el problema. Quan no es soluciona el problema, es produeix apoptosi o senescència de la cèl·lula.

En relació al càncer, el primer que cal dir és que les cèl·lules tumorals són inestables genèticament. No és que tinguin errors, sinó que cada vegada que es divideixen, adquireixen més errors. Algunes de les marques que tenen fan pensar que han patit errors en la replicació, i per tant, tenen estrès replicatiu. La resposta al dany del DNA és una barrera per a la tumorigenèsi. Quan hi ha dany al DNA s'activen els checkpoints i les cèl·lules l'intenten reparar. Un teixit normal té els

checkpoints poc activats, un teixit tumoral té molt actius els checkpoints, i quan el dany està molt avançat, han desaparegut els checkpoints.

Les cèl·lules tumorals tenen més estrès replicatiu. Abans es deia que com proliferen més, tenen més dany, però no és veritat, perquè també hi ha cèl·lules que proliferen molt i no són tumorals.

Les cèl·lules tumorals tenen dany en el DNA i el van acumulant. S'activa el checkpoint, però al cap d'un temps, es desactiva: la cèl·lula no el pot reparar. Però d'on ve aquest dany en el DNA? Es creu que es genera per l'estrès replicatiu. Les cèl·lules tumorals, quan es repliquen, en certa manera, tenen més estrès replicatiu que una cèl·lula normal. Per què les cèl·lules tumorals tenen més estrès que una cèl·lula normal? Les cèl·lules tumorals, el primer que fan és adquirir mutació independent a les senyals externes, és a dir, els oncogens. I el segon, és evadir la barrera a la tumorigènesi. Però per què tenen més dany? Els oncogens no produeixen dany directament en el DNA, els oncogens produeixen estrès replicatiu i l'estrès replicatiu produeix el dany. Hi ha alguns oncogens que, per la seva manera de funcionar, produeixen ROS, i aquest ROS pot produir dany directament en el DNA, però com produeixen dany, en fer dany, estan produint estrès replicatiu, i aquest estrès replicatiu, després genera més dany.

Els oncogens fan que la fase S sigui més curta: la cèl·lula no té temps de fabricar tot el material necessari per entrar a la fase S i ja hi està entrant. Per tant, entrarà a la fase S i tindrà pocs nucleòtids, per tant, la cèl·lula tindrà més estrès replicatiu, perquè la cèl·lula no tindrà suficients elements bàsics per fer la síntesi de DNA. Alguns oncogens fan que s'activin més orígens dels que normalment s'activarien, per tant, necessites molts nucleòtids per sintetitzar DNA en aquests orígens i també te'n falten, per tant, pot generar estrès replicatiu. Activen molt la transcripció, i així, hi ha més probabilitats de que xoquin les maquinàries replicativa i transcripcional. Tot això són teories de que realment, els oncogens produeixen estrès replicatiu, i aquest estrès replicatiu acaba causant dany. La cèl·lula continua replicant i a partir d'aquí ho fa malament.

Nosaltres el que estudiem és: si generem estrès replicatiu sever en les cèl·lules, aquestes cèl·lules se'n van a senescència. En canvi, les cèl·lules tumorals reutilitzen forquetes o activen nous orígens que en un principi no s'haurien d'haver utilitzat. Les cèl·lules normals se'n van a senescència, però les tumorals es recuperen, però es recuperen malament, perquè quan mirem marques d'instabilitat, en tenen, per tant, ho estan fent malament. Les cèl·lules tumorals, els mecanismes que tenen per reparar-ho són error-prone, per tant, tenen molts errors. En canvi, les normals, veuen que si no els és útil, se'n van a senescència.

Les preguntes a plantejar-se són: D'on ve aquest dany, per què les cèl·lules tumorals tenen més dany? Per què proliferen més? No és cert. Hi ha una teoria força acceptada a nivell científic i és que el dany que tenen les cèl·lules tumorals és perquè tenen més estrès replicatiu. Quan existeix un oncogen en una cèl·lula, tenim més danys? Són els oncogens els que produeixen el dany? Ara no es pensa així, el que produeixen els oncogens és estrès replicatiu.

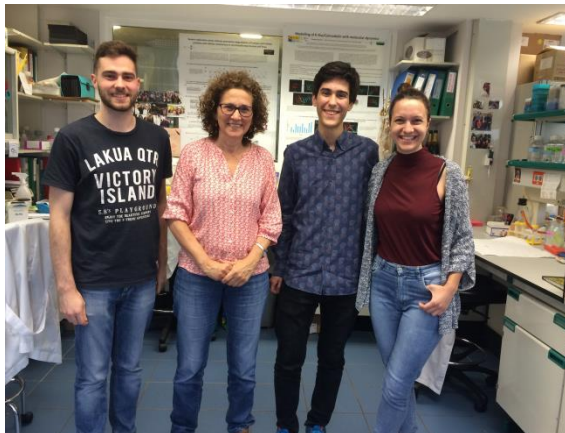


Figura 37. Amb la Dra. Neus Agell al seu laboratori i amb els estudiants de doctorat Sra. Sònia Feu i Sr. Fernando Unzueta el dia 16 de maig de 2018.



Figura 38. Amb Fernando Unzueta el dia 22 de novembre 2018 als laboratoris de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

RESUM DE LES CONVERSES AMB LA DRA. ROSA MARIA ALIGUÉ

Facultat de Medicina - Barcelona, 16 de maig de 2018

Relació entre l'estrès replicatiu i el càncer.

Quan hi ha l'estrès replicatiu, tots els checkpoints, totes les cinases que han de reparar el dany causat o com a mínim, aturar-lo, s'activen. La maquinària és general per a qualsevol tipus d'estrès replicatiu i en qualsevol tipus de cèl·lula. Això dels checkpoints, per exemple, amb radioteràpia, s'emet radiació i s'afecten els checkpoints fins a un punt que ja no hi ha dubte que pot matar a la cèl·lula, però quan es van començar a descobrir els checkpoints, van ser com una gran incògnita, perquè aquests checkpoints volen dir que, quan tu fas un dany, s'activen perquè la cèl·lula no es mori. Però segons el dany que hi ha i el tipus de mutacions que es creen, tu el que no vols és que aquests checkpoints actuïn molt bé, perquè no vols que es propagui el que s'ha malmès, la mutació.

Per això hi va haver una temporada que no se sabia si fer més dany era més important o no. S'ha de fer una combinació de les teràpies que existeixen, i es vol bloquejar els checkpoints perquè la cèl·lula pugui morir-se.

RESUM DE LES CONVERSES AMB EL DR. OCTAVI CÓRDOBA

Palma de Mallorca – Barcelona (via Skype), 26,27 i 28 de març de 2018

Davant el càncer de mama, quins tractaments existeixen?

El càncer de mama es pot entendre com una malaltia local i sistèmica. Existeixen diferents formes de tractar-lo.

Els tractaments diana són els que abasten els tractaments hormonals [...] el tamoxifèn va ser la primera substància específica per al tractament hormonal, i provoca la inhibició competitiva dels receptors d'hormones (estrògens) i desplaça els estrògens. Hi ha un tipus de tumor que expressen els receptors hormonals, en el nucli se'ls pot bloquejar amb tamoxifèn, però té una acció que algunes vegades dona un resultat negatiu perquè els receptors hormonals estan en tot el cos i existeix un risc de trombosi. A més, hi ha tumors que no responen bé.

Altres tractaments són inhibidors que impedeixin la fabricació d'estrògens i és per a dones menopàusiques o a qui se'ls provoca, perquè no tenen producció d'estrògens, aquesta és la segona generació de tractaments hormonals.

A més, l'altre tractament diana en marxa és el tractament anti-HER2. La proteïna HER2 es troba a la membrana de la cèl·lula i quan està sobreexpressada, fa que es repliquin més ràpidament. Els tumors HER2 sobreexpressen aquesta proteïna i tenim tractaments específics: el Herceptin o el Lapatinib, que el que fan és bloquejar aquesta proteïna.

Un dels tractaments habituals és la quimioteràpia estàndard, però comporta problemàtica derivada i efectes secundaris, perquè el tractament és absolutament indiscriminat, ja que ataca les cèl·lules que es repliquen ràpidament: les cèl·lules intestinals (provoca nàusees), les del cabell (provoca pèrdua de pèl), la medul·la òssia (provoca anèmia), etc.

S'intenta ajustar a quines dones es dona un tractament o un altre en funció dels factors que es preveuen que tindran pitjor pronòstic.

RESUM DE LA CONVERSA AMB EL DR. FELIPE CORTÉS LEDESMA

CABIMER - Sevilla, 9 de juliol de 2018

Relación entre el estrés replicativo y el cáncer: visita al CABIMER (Figura 39) y reunión con el Dr. Felipe Cortés (Figura 40).

Las topoisomerasas de ADN 1 y 2, quitan el enredamiento, desanudan y desencadenan las moléculas y en cualquier proceso que se toque el ADN intervienen en la replicación, reparación, etc. ¿Cómo funcionan las topoisomerasas? Se unen al ADN, lo cortan para cambiar la topología del ADN y catalizan el cambio topológico, para finalmente sellar el ADN. Para ello es muy importante este intermediario que se llama complejo de rotura en que la topoisomerasa se queda covalentemente unida a un extremo del ADN, convirtiéndose en una tiroxina que ataca y rompe el enlace y crea un enlace consigo misma y permanece allí solucionando el problema existente. No obstante, puede ser también una fuente de rotura del ADN, que a pesar de ser irreversibles, se puedan reparar. Son muy características porque al degradar la enzima no se puede romper el enlace, entonces la situación es que queda un trozo de proteína unido covalentemente y resulta peculiar comprobar las maneras específicas que tiene la célula de lidiar con dichas roturas.

La diferencia entre las topoisomerasas se halla en que la topoisomerasa 1 corta una sola cadena y cambia el estado topológico mientras que la topoisomerasa 2 es un polímero en el que cada una de las unidades corta una de las cadenas, se genera una doble rotura de cadena.

Las roturas pueden ser espontáneas pero hay compuestos que pueden inducir roturas y muchos de ellos se usan como agentes antitumorales. Las células tumorales tienen mucha más actividad y, por tanto, se va a provocar más problemas a las células tumorales. El Dr. Cortés descubrió en su etapa de investigación en Gran Bretaña una enzima específica de esta actividad que corta el enlace fosfodiéster, demostrando que las roturas se pueden limpiar de forma directa, sin degradación, gracias a la acción de la proteína ZATT, que tiene la capacidad de reestructurar y modificar los extremos para facilitar la actividad de TDP2.

Respecto a si RSR forma parte de la DDR, considera que son nomenclaturas, no está tan aceptado, las dos técnicas tienen parte de la maquinaria de señalización en común, de forma que en ocasiones disparan por la misma vía, pero responden a señales diferentes, aunque es cierto que comparten algunas características.



Figura 39. A l'entrada al CABIMER el dia 9 de juliol de 2018.



Figura 40. Amb el Dr. Felipe Cortés a la seu del CABIMER el dia 9 de juliol de 2018.

RESUM DE LES CONVERSA AMB EL DR. ÓSCAR FERNÁNDEZ CAPETILLO

Madrid – Barcelona (Via Skype), 6 de juny de 2018

- **¿Los “checkpoints” solamente se encargan de asegurar el buen funcionamiento de toda la maquinaria de replicación del DNA? ¿Puede ser que se active una y las otras dos no, o viceversa?**

Una cosa son las proteínas checkpoint 1 i 2 y la otra los cycle checkpoints que engloban todo el mecanismo, que son completamente distintas (es una propiedad biológica). Son pathways que integran proteínas diferentes porque se descubrieron como mutantes de levaduras pero engloban muchas.

- **¿El daño al DNA causa estrés replicativo o el estrés replicativo causa daño al DNA?**

Las dos cosas son ciertas. El daño es que la horquilla replicativa no puede progresar y ello provoca que la horquilla no pueda moverse si tienes un cromosoma partido. Ello sucede si tienes daño en tu ADN y también puede derivar en estrés replicativo. Lo otro también sucede, el estrés replicativo puede derivar en daño, pero puedes tener una horquilla replicativa parada mucho rato y que vuelva a andar.

En el laboratorio se consigue mediante hidroxiurea, se puede provocar estrés replicativo sin que se parta un cromosoma, pero si el estrés replicativo continua en el tiempo, mediante la mitosis no se puede inhibir bien el cromosoma y se acaba partiendo.

- **¿En qué manera los oncógenes actúan dificultando la replicación, y así, causando estrés replicativo?**

No hay una sola manera y es uno de los campos de debate más activo en nuestros círculos de investigación conseguir entender cómo funciona. En ocasiones se produce porque algunos oncogenes disparan un número excesivo de replications, de forma espaciada y desde un origen diferente. Otros oncogenes disparan demasiado y se consume muy rápidamente los recursos, por ejemplo, los nucleótidos, de forma que la célula no tiene recursos para poder replicar.

Otra forma muy reciente es que los oncogenes pueden disparar en zonas donde no debería existir la replicación. La célula ha seleccionado que replicación y transcripción no suelen coincidir a la vez para evitar conflictos. Sin embargo, los algunos oncogenes lían a la célula y se transcriben zonas que no deberían transcribirse y entra en colisión con un replisoma o se disparan orígenes de replicación dentro de un gen que se está transcribiendo. La alteración de la transcripción puede causar una un problema en la progresión de la horquilla.

• **¿Es cierto que los tumores tienen un nivel de estrés replicativo superior a las células normales?**

Esta afirmación debe matizarse. Un par de grupos de investigación publicaron esta afirmación proponen que ello es cierto, pero no coinciden plenamente el resto de científicos. Lo prioritario es que se intenta buscar terapias tóxicas para estas células, siendo lo más importante identificar, porque no todos los tumores tienen mucho.

Los estudios de genómica permiten ver traslocaciones de los tumores conviven en un elevado porcentaje con niveles superiores de estrés replicativo. Cuando se ven las cicatrices de las traslocaciones parece que es fácil comprobar esta afirmación.

• **Generalmente, el estrés replicativo acaba provocando que la célula entre en senescencia o apoptosis, pero ¿hay otros estados en los que una célula puede entrar por tener estrés replicativo?**

Sí, no depende solo de estrés replicativo, cualquier checkpoint celular influye en apagar los motores de las células activas. En función del tipo que sea, se pueden volver senescentes y que dejen de crecer y en otras las mata, todo depende del tipo de tejido de que se trate. Ejemplo la sangre o médula ósea, se vuelve senescente porque las elimina o el hígado o pulmón, órganos en los que las células maltrechas, en vez de morir, entran en senescencia para mantenerse en el órgano y contribuir a su funcionamiento.

Al final es lo mismo, la célula puede perder su capacidad de crecimiento, ya sea mediante la senescencia o mediante la apoptosis.

• **¿Los “checkpoints” actúan de forma separada al DDR pathway o forman parte de este?**

El DDR pathway es una batería de proteínas que responden al daño en el ADN y hacen dos cosas:

- disparar los checkpoints para controlar que la célula no se expanda, ya sea matándola o que entre en senescencia
- ayuda a la reparación.

El DDR es todo, es la respuesta al daño y tiene un componente de checkpoint y un componente de reparación.

RESUM DE LA CONVERSA AMB EL DR. PABLO HUERTAS SÁNCHEZ

CABIMER - Sevilla, 9 de juliol de 2018

Relación entre el estrés replicativo y el cáncer: visita al CABIMER y reunión con el Dr. Pablo Huertas (Figura 41).

La definición del estrés replicativo sería cualquier cosa que hace que las horquillas de replicación no vayan funciones: cualquier cosa que ponga dificultades a la replicación. DNA se rompe y se le une ATR, fosforila muchas proteínas, entre ellas, CHK1, amplificando así la señal. A ATR lo activa un trozo de DNA de cadena sencilla junto a un trozo de DNA de cadena doble. ATM puede unirse a una horquilla de replicación cuando hay una inversión de las horquillas de replicación. En los “chicken foot” se puede unir ATM, ATR y ATRIP.

Cuando tú estás transcribiendo, tienes la RNA polimerasa, va saliendo un RNA, como un RNA es complementario al DNA, en algunas circunstancias, se puede quedar pegado, y esta estructura se llama “R-loop”. Es un problema porque estas estructuras son muy estables, un RNA unido a un DNA es más estable que dos DNAs unidos. Hasta que no elimines el r-loop, la RNA polimerasa no podrá pasar.

Si tienes muchos r-loop, y oncogenes activados, habrá más dificultades para la RNA polimerasa para avanzar.



Figura 41. Amb el Dr. Pablo Huertas a la seu del CABIMER el dia 9 de juliol de 2018.

RESUM DE LA CONVERSA AMB EL DR. JOSÉ ANTONIO TERCERO ORDUÑA
CBM Severo Ochoa – Madrid, 10 de juliol de 2018

Daño en el DNA e inestabilidad genómica: visita al CBM Severo Ochoa (Figura 42) y reunión con el Dr. José Antonio Tercero (Figura 43).

Ver como crecen las células en situaciones difíciles a causa de daño en el DNA y el estrés replicativo derivado.

Idea de inestabilidad genómica: muerte celular y cáncer, envejecimiento prematuro y desarrollo de anomalías.

Daño en el DNA: causa principal que produce inestabilidad y que puede ser:

- ✓ Errores en la replicación cromosómica
- ✓ Estrés replicativo
- ✓ ROS, peroxidación lipídica, agentes alquilantes
- ✓ Agentes genotóxicos exógenos

En un día, una célula sufre 20.000 roturas, 10.000 depuraciones y entre 10 a 20 roturas de cadena del DNA, situaciones todas ellas que pueden comportar inestabilidad genómica.

Si se produce un error en el DNA, se puede reparar o bien continuar sin haberse reparado, de forma que más adelante, para poderlo reparar, se utiliza un “parche” que es un mecanismo de tolerancia del DNA.

La resolución de Holliday Junction se basa en deshacer los nudos producidos (dissolution) y en cortar mediante enzimas (nucleolytic cleavage).

El estrés replicativo consiste en cualquier situación que provoque que la replicación no se realice correctamente.



Figura 42. A l'entrada del CBM Severo Ochoa el dia 10 de juliol de 2018.



Figura 43. Amb el Dr. José Antonio Tercero el dia 10 de juliol de 2018.