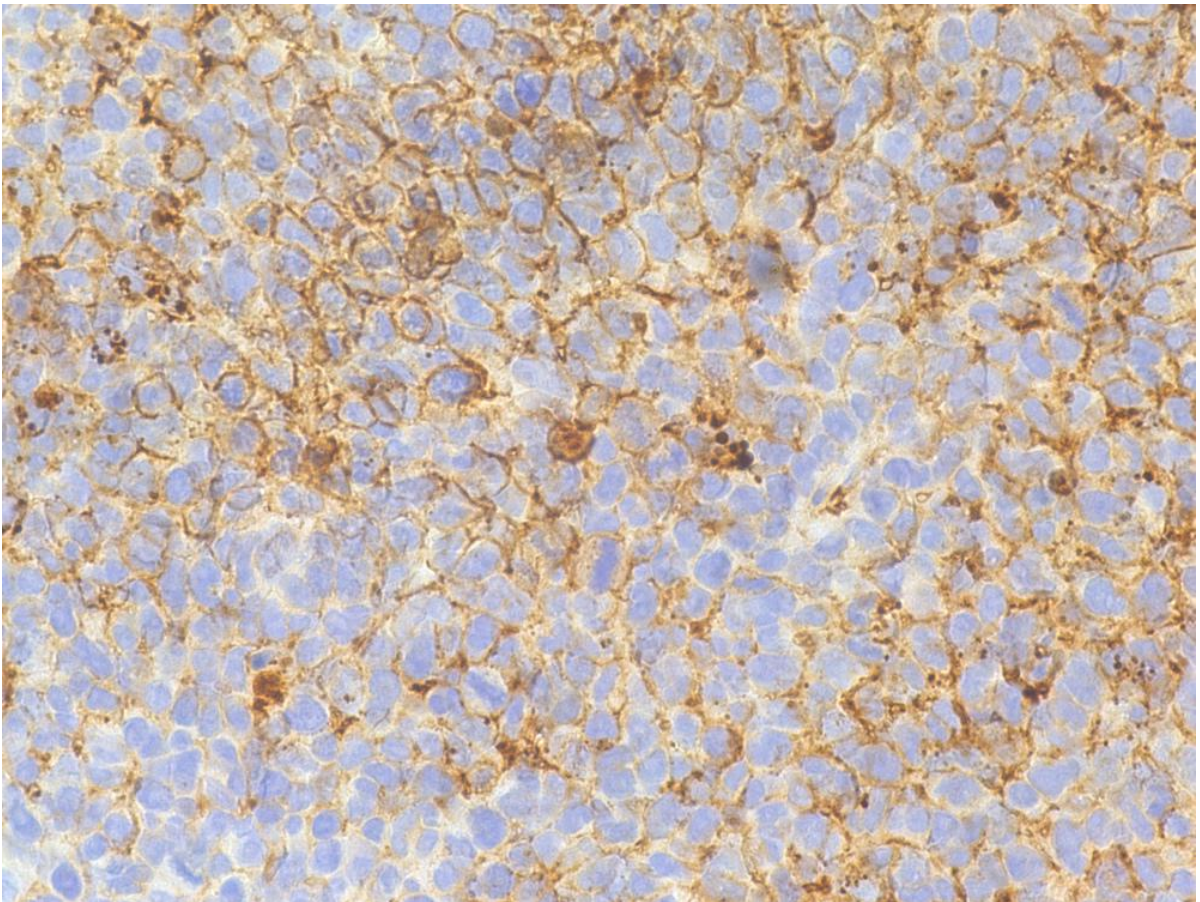

*Estudi del receptor de glucosa
GLUT-1 en tumors sòlids pediàtrics
i la seva implicació en la captació
de micel·les glicosilades.*



ÍNDEX

1. Llistat d'abreviatures	5
2. Síntesi introductòria.....	6
3. Introducció, objectius i hipòtesi	7
4. Informació bàsica.....	10
4.1. El càncer	10
4.1.1.Generalitats.....	10
4.1.2. Tractaments	12
4.1.3. Tumors pediàtrics	14
4.1.3.1. Rabdomiosarcoma.....	16
4.1.3.2. Neuroblastoma.....	18
4.1.3.3. Ewing Sarcoma.....	20
4.1.3.4. Osteosarcoma.....	21
4.2. Receptor de glucosa GLUT-1	23
4.3. El fàrmac.....	25
4.3.1. Dasatinib.....	25
4.3.2. Les Micel·les polimèriques.....	26
5. Metodologia.....	28
5.1. Extracció de mostres.....	28
5.2. Immunohistoquímica	30
5.3. RT-qPCR	33
5.3.1. Cultiu de cèl·lules	33
5.3.2. Extracció d'RNA.....	37
5.3.3. RT-qPCR.....	40
5.3.3.1. RT.....	40
5.3.3.2. qPCR.....	41
5.3.3.3. Processament de dades i càlcul de l'expressió de RNA.....	42
5.4. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	44
5.4.1. Preparació de les mostres	44
5.4.2. Anàlisi de les mostres per HPLC.....	46
6. Resultats.....	49
6.1. Immunohistoquímica	49
6.2. RT-qPCR	55
6.3. HPLC	61
7. Discussió de resultats.....	74

7.1. Expressió de GLUT-1 en models PDX, xenoempelt i cèl·lules Rh30.....	74
7.2. Concentració de Dasatinib en mostres de ratolins tractats amb diferents vies d'administració	77
8. Conclusions	79
9. Glossari.....	80
10. Bibliografia	82

1. LLISTAT D'ABREVIATURES

18 F-FDG: 18 F-fluorodesoxiglucosa

aRMS: Rabdomiosarcoma alveolar

cDNA: Àcid deoxiribonucleic complementari

EFS: En anglès, *Event Free Survival*. En català, Supervivència lliure d'esdeveniments.

eRMS: Rabdomiosarcoma embrionari.

IHC: En anglès, *immunohistochemistry*. En català, immunohistoquímica,

IMC: Índex de massa corporal.

mRNA: Àcid ribonucleic missatger

NB: Neuroblastoma

OS: Osteosarcoma

ES: Ewing sarcoma

IV: (via) intravenosa

RMS: Rabdomiosarcoma

PDX: En anglès, *Patient-Derived Xenograft*. En català, xenoempelt derivat d'un pacient.

PET: En anglès, *Positron Emission Tomography*. En català, tomografia per emissió de positrons.

RT-qPCR: En anglès, *Reverse Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction*. En català, transcripció inversa -reacció en cadena de la polimerasa quantitativa.

TKI: En anglès, *Tyrosine Kinase Inhibitor*. En català, iinhibidor de la tirosina quinasa.

IGF: En anglès, Insuline Growth Factor. En català, Factors de creixement insulínic.

HSJD: Hospital Sant Joan de Déu.

2. SÍNTESI INTRODUCTÒRIA

Aquest treball forma part de l'estudi "Glucosylated nanomicelles to target glucose-avid pediatric sarcomas" realitzat per l'equip de recerca del Dr. Ángel M. Carcaboso, de l'hospital Sant Joan de Déu, i l'equip del Prof. A. Sosnik, del Technion-Israel institute of Technology. Tenint present l'elevada taxa metabòlica de les cèl·lules tumorals, la qual es tradueix a una alta captació de glucosa, es va desenvolupar una formulació del fàrmac dasatinib, encapsulant el fàrmac en micel·les glucosilades, per a tractar tumors d'una línia cel·lular de rabdomiosarcoma de forma específica. Es coneix que els tumors de rabdomiosarcoma tenen una quantitat elevada de receptors de glucosa, però és la primera vegada que dasatinib s'utilitza combinat amb micel·les. Un dels primers resultats que havia obtingut l'estudi és que ratolins amb tumors de la línia cel·lular Rh30, que es van tractar posteriorment amb micel·les glicosilades, van obtenir una acumulació de fàrmac major en els tumors que no els tractats amb altres vies i formulacions de d'aquest. En aquest treball es tractarà una part de l'estudi global mencionat anteriorment que correspon a analitzar els receptors de glucosa GLUT-1 en diferents teixits i la farmacocinètica del fàrmac en diferents vies i formulacions.

Per tant, els **objectius** del treball són els següents:

- 1- Fer una comparativa de la presència de receptors GLUT-1 entre diferents teixits tumorals entre ells, i comparar-los amb teixits sans, mitjançant RT-qPCR (*reverse transcription- quantitative polymerase chain reaction*) i immunohistoquímica.
- 2- Utilitzant la tècnica d'HPLC (*high performance liquid chromatography*), quantificar la concentració de dasatinib present en els teixits dels ratolins malalts i posteriorment tractats amb el fàrmac encapsulat en micel·les glicosilades i no glicosilades i pur.

Essent així, la hipòtesis plantejada és que els tumors, i en especial els rabdomiosarcomes, tindran més expressió de receptors GLUT-1 que altres teixits i com a conseqüència seran capaços de captar més micel·les glucosilades amb dasatinib per mitjà de *targeting* actiu.

Aquest treball té **transcendència clínica** perquè, com ja hem apuntat, s'engloba dins de l'estudi "Glucosylated nanomicelles to target glucose-avid pediatric sarcomas", enviat i pendent de publicar. L'autoria és compartida, com s'ha dit, amb professionals de dos centres de recerca influents, la Fundació Sant Joan de Déu i el Technion-Israel Institute of Technology. La investigació té com a objectiu principal buscar especificitat alhora de tractar tumors sòlids, i més concretament rabdomiosarcomes, la qual cosa implicaria un tractament menys invasiu, és a dir, amb menys efectes secundaris i amb una actuació específica i punyent en els teixits tumorals.

3. INTRODUCCIÓ, OBJECTIUS I HIPÒTESI

Els grups de recerca del Doctor Ángel Montero de l'hospital Sant Joan de Déu de Barcelona i del Professor Alejandro Sosnik del *Technion-Israel Institute of Technology*, van treballar per primera vegada en un sistema de distribució dels fàrmacs amb nano-medicina basat en nano-micel·les polimèriques glicosilades, en un estudi amb el nom de "Glucosylated nanomicelles to target glucose-avid pediatric sarcomas" que s'ha enviat a diverses revistes però que encara no està publicat. L'objectiu principal de l'estudi era generar especificitat al fàrmac inhibidor de la tirosina quinasa^[1], dasatinib, per tractar tumors sòlids pediàtrics, i en concret rhabdomiosarcomes. Per aconseguir-ho es va encapsular en micel·les polimèriques glicosilades.

Els tumors es caracteritzen per una taxa metabòlica molt elevada a causa del desmesurat ritme de proliferació que presenten^[2]. Aquest fet requereix una àvida captació de glucosa, i per tant, les cèl·lules tumorals, per assegurar-se'n un abundant subministrament, exposen una quantitat rellevant de receptors de glucosa^[3]. Aquesta característica dels teixits tumorals, de fet, permet la detecció i seguiment dels tumors mitjançant una tècnica molt habitual anomenada PET (positron-emission tomography). Després d'ingerir glucosa radioactiva, per exemple, 18 F-fluorodesoxiglucosa (18 F-FDG), es realitzen imatges globals del cos de com aquesta s'ha distribuït per *targeting* arreu de l'organisme. Generalment, en les imatges del PET, sempre surten marcats els teixits o òrgans amb més demanda de glucosa: el tumor i també el cervell^[4]. Els sarcomes pediàtrics, que representen aproximadament un 10% dels tumors sòlids pediàtrics, es qualifiquen com a tumors amb un alt consum de sucres, de tal manera que sobreexposen els receptors de glucosa (GLUTs), concretament GLUT-1^[5]. El rhabdomiosarcoma s'inclou dins d'aquesta tipologia de tumors, correspon a un sarcoma de les cèl·lules musculars. En tumors de rhabdomiosarcoma GLUT-1, GLUT-3 i GLUT-4 s'hi troben sobreexposats^[6]. Dels casos de rhabdomiosarcoma, tot i tractaments intensius, encara un 25% presenten un pronòstic desfavorable^[7]. La situació implica, doncs, amb urgència, el desenvolupament de teràpies específiques^[8]. Per tant, les micel·les en les que es va encapsular el fàrmac es van decorar amb molècules de glucosa, per tal de realitzar *targeting* actiu amb el tumor i augmentar l'especificitat del dasatinib. Es van introduir cèl·lules d'Rh30, una línia cel·lular de rhabdomiosarcoma, a ratolins (*mouse musculus*), de manera que desenvolupessin tumors. Aquests ratolins malalts posteriorment van ser tractats amb dasatinib en tres conformacions possibles i dos tipus d'administració diferents: per via intravenosa, encapsulat en micel·les glicosilades i encapsulat en micel·les no glicosilades, i per via oral, pur en dissolució en àcid.

Entre molts altres anàlisis, aquest treball forma part de l'estudi global "Glucosylated nanomicelles to target glucose-avid pediatric sarcomas". Concretament es compon de dues parts diferenciades, que al mateix temps estan relacionades. La primera correspon a un anàlisi dels receptors de glucosa GLUT-1. Tot i

que es coneixen 14 GLUTs, només es va fer un estudi exhaustiu de GLUT-1, ja que era del nostre interès per la captació del fàrmac perquè es localitza en les membranes cel·lulars^[3]. Es va dur a terme mitjançant immunohistoquímica i RT-qPCR i es va fer un anàlisi bàsicament qualitatiu de l'expressió de GLUT-1 en diferents teixits tumorals obtinguts de models PDX: d'osteosarcoma, neuroblastoma, Ewing sarcoma i rabdomiosarcoma; també d'un xenoempelt d'Rh30 i de teixits sans.

Anteriorment, per aquest mateix estudi, al laboratori del Dr. Ángel Montero es va realitzar un experiment *in vitro*, en el qual es va introduir en cultius de cèl·lules d'Rh30 -un amb medi amb glucosa i l'altre amb medi sense glucosa- dasatinib en micel·les glicosilades. Es va obtenir que l'acumulació intracel·lular de dasatinib era major en les que se'ls havia privat la glucosa^[9]. Així doncs, es va voler comprovar, mitjançant RT-qPCR, si quan es privava de glucosa a les cèl·lules, l'expressió de GLUT-1 augmentava de forma destacable en comparació a les que no patien pel subministrament de glucosa.

El segon i l'últim apartat correspon a un estudi de la farmacocinètica de dasatinib depenent de la formulació i el tipus d'administració. Als ratolins (*mouse musculus*) que havien desenvolupat tumors d'Rh30 i posteriorment se'ls havia tractat amb dasatinib, se'ls van extreure mostres de teixits sans i del tumor. En aquest treball només es va analitzar la concentració de Dasatinib acumulat en els diferents teixits sans, per fer-ho es va utilitzar la tècnica d'HPLC.

Per tant, els **objectius** plantejats van ser:

1. Mitjançant immunohistoquímica i RT-qPCR, identificar la presència del receptor de glucosa GLUT-1 en models PDX de rabdomiosarcoma, neuroblastoma, Ewing sarcoma i osteosarcoma, i en xenoempelts de la línia cel·lular Rh30, així com també en teixits control humans sans i contrastar les diferències d'expressió entre els diferents teixits tumorals. Comprovar, també, si els receptors abunden més en els tumors que en els teixits sans.
 - 1.1. Reafirmar els resultats obtinguts en experiments anteriors del laboratori del Dr. Ángel Montero. Comprovar, per mitjà de RT-qPCR, que la presència d'ARNm codificant per a GLUT-1 a les cèl·lules de la línia cel·lular Rh30 cultivades en un medi sense glucosa és major que en cèl·lules cultivades en un medi amb glucosa.
2. Utilitzant la tècnica de HPLC quantificar la presència de fàrmac en teixits normals (fetge, ronyó, mel·sa, múscul i cervell) de ratolins tractats de tres maneres diferents: per via intravenosa amb micel·les glicosilades, també per via intravenosa amb micel·les no glicosilades o per via oral amb una dilució del fàrmac pur. I una vegada realitzat l'anàlisi contrastar els resultats amb els obtinguts anteriorment en

experiments del laboratori del Dr. Ángel Montero en teixits tumorals, xenoempelts d'Rh30 extirpats dels ratolins.

La **hipòtesi** que es va proposar pel primer objectiu són que GLUT-1 s'expressaria molt més àmpliament als teixits tumorals en comparació als teixits sans, i que d'entre els teixits tumorals els rabdomiosarcomes serien els que manifestarien més abundància de receptors GLUT-1. A més es proposa que les cèl·lules que es cultivessin amb medi sense glucosa presentarien més transportadors de glucosa GLUT-1 ja que es creia que la desesperada necessitat de glucosa per a la supervivència faria activar encara més la síntesi de receptors. Al respecte a l'últim objectiu, se suposava que al ser elevada l'expressió de GLUT-1 en rabdomiosarcomes, les micel·les glicosilades farien augmentar la concentració en els tumors i per tant, l'acumulació de fàrmac a la resta d'òrgans seria baixa. Amb la resta de formulacions del fàrmac, la seva acció no seria tan específica.

El treball té **importància clínica** sobretot perquè s'engloba dins d'un estudi realitzat per professionals de centres influents – Fundació per la recerca de Sant Joan de Déu i Technion-Israel Institute of Technology - , de manera que té transcendència en el context de la investigació pel tractament del càncer. Amb aquest estudi es vol aconseguir una teràpia específica per tractar tumors infantils de rabdomiosarcoma, de tal manera que es redueixin els efectes secundaris dels tractaments poc específics i provocar una actuació més agressiva en el tumor.

4. INFORMACIÓ BÀSICA

4.1 EL CÀNCER

4.1.1. Generalitats

El càncer és una malaltia causada per la proliferació descontrolada de les cèl·lules. Les cèl·lules normals tenen la capacitat de morir i reproduir-se de manera molt regulada, per tal de que tots els processos que es duguin a terme siguin positius per l'organisme. Les cèl·lules tumorals no posseeixen aquesta capacitat, i el motiu és degut a mutacions al material genètic. La causa de les mutacions no acaba de ser definida però sovint s'atribueix a factors ambientals, com l'estil de vida^[10]. Les mutacions però, també es poden transmetre de forma hereditària, com és el cas del retinoblastoma. Per motius també hereditaris hi ha persones que tenen més predisposició a desenvolupar un càncer degut a la possessió d'uns gens anomenats oncogens que al activar-se poden donar lloc a una reproducció descontrolada de les cèl·lules^[11].

Tot i així, un tumor no és només una massa de cèl·lules que va creixent indefinidament, sinó que es tracta d'un teixit complex amb cèl·lules poc diferenciades que per créixer desenvolupen diferents processos bàsics (Fig. 1). Un dels trets fonamentals de les cèl·lules tumorals és la seva habilitat de sostenir una proliferació crònica, assegurant l'homeòstasi del número de cèl·lules. Les cèl·lules tumorals te-

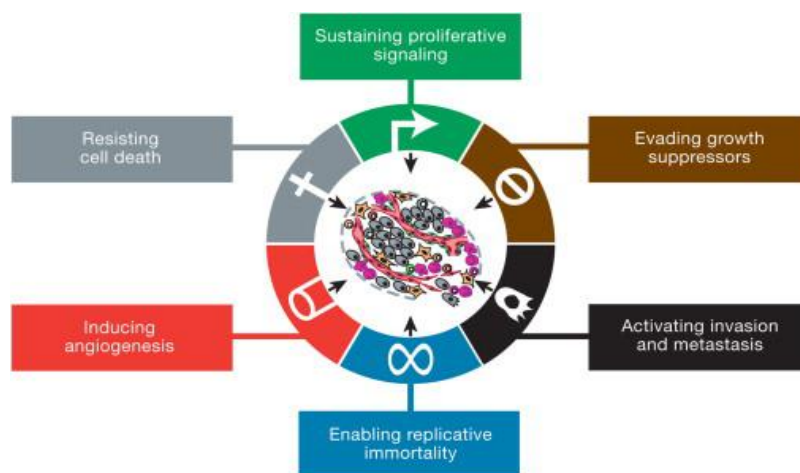


Figura 1. Processos fonamentals pel desenvolupament d'un tumor establerts l'any 2000.

nen vies diverses de controlar la reproducció. S'asseguren de que la proliferació sigui extensa mitjançant senyals que van d'una cèl·lula a una altra, a partir de mecanismes de senyalització de receptor-ligand, i les cèl·lules tumorals estimulants les normals^[12].

Perquè tots aquests processos es puguin dur a terme, les cèl·lules tumorals han d'activar mètodes de supervivència a l'interior de l'organisme. La cèl·lula sana de per sí contenen supressors que regulen la reproducció cel·lular, les cèl·lules tumorals, en canvi, activen mecanismes per tal d'evadir-se d'aquests supressors.

Com una barrera natural al desenvolupament del càncer les pròpies cèl·lules es programen la mort cel·lular, durant la formació del càncer moltes cèl·lules activen l'apoptosi per tal d'evitar el creixement de tumors. Aquest procés queda atenuat en els tumors que han aconseguit formar-se. Normalment, un llinatge de cèl·lules normals té la capacitat de créixer i reproduir-se un cert nombre de cicles a causa de la senescència. Excepcionalment algunes cèl·lules emergeixen de la població ja en envelliment i es continuen reproduint il·limitadament. Aquesta transició s'ha anomenat "immortalització". Així doncs, les cèl·lules cancerígenes, per tenir la capacitat de reproduir-se indefinidament han d'assumir la immortalitat abans.

Com tots els teixits, els tumors també necessiten sostenir-se en nutrients i oxigen, així com també tenir la capacitat d'evacuar residus del metabolisme i diòxid de carboni. Per tal de que això sigui possible s'han de produir vasos sanguinis de forma contínua mitjançant angiogènesi. Després de la embriogènesi la vasculatura està majoritàriament inactiva. En canvi, en els teixits tumorals es produeix de forma continuada, no es deixa mai de crear vasos nous.

Els tumors capaços de proliferar sovint activen llavors processos d'invasió i metàstasi. S'han realitzat estudis al respecte i s'ha assimilat que hi ha una estreta relació entre aquests processos i les molècules d'adhesió intercel·lulars, com E-cadherin. i amb les molècules d'adhesió responsables de la migració cel·lular, com N-cadherin. Per tant, tenint en compte que la metàstasi consisteix en la migració d'una representació del tumor d'una zona de l'organisme a un altre, les cèl·lules tumorals presentarien baixos nivells d'E-cadherin i una gran expressió d'N-cadherin^[12].

Hi ha diferents tipologies de càncer, que es classifiquen segons el teixit a partir del qual s'ha iniciat la proliferació del tumor: els carcinomes, que s'inicien a la pell o als teixits que envolten els òrgans interns; els sarcomes, que comencen als ossos, als cartílags, al greix, als vasos sanguinis, etc. és a dir, en teixits connectius o de suport; la leucèmia, que s'origina en la medul·la òssia, concretament en el procés de diferenciació de les cèl·lules sanguínies; els limfomes i mielomes, que afecten les cèl·lules del sistema immunitari; i finalment, els càncers del sistema nerviós central, que s'inicien en els teixits del cervell i a la medul·la òssia. A part també hi ha blastomes, que són càncers originats en el procés de diferenciació dels blasts, unes cèl·lules que es troben en fases de diferenciació encara molt preliminars. Aquest fet explica que els blastomes es manifestin majoritàriament en infants^[13].

4.1.2. Tractaments

Un tumor, segons el tipus de càncer de què es tracti, i del cos on s'hagi desenvolupat, requereix emprar uns tractaments o uns altres. Actualment, hi ha múltiples tractaments possibles. Els més comuns són: la cirurgia, la quimioteràpia, la immunoteràpia, la radioteràpia i les teràpies específiques (*targeted therapies*)^[14].

La **cirurgia** pot ser utilitzada per varis motius, i poques vegades s'usa com a tractament únic, normalment sempre s'acompanya d'altres teràpies. S'utilitza per diagnosticar càncer a partir de biòpsies, ja que a vegades és la única manera de determinar-ne la seva presència. També s'usa per valorar l'estat del tumor, la rapidesa en què creix, com n'estan de danyats els òrgans i vasos propers, etc. I a partir de la informació extreta a la intervenció, es poden considerar els tractaments adequats per a tractar-lo. En casos de coneixement de la localització del tumor en una zona concreta, s'empra una cirurgia curativa com a teràpia majoritària, a vegades fins i tot com a únic tractament. A vegades però, no es pot extirpar tot el tumor sencer per evitar malmetre teixit sa. També s'utilitza com a cura pal·liativa, és a dir, amb l'objectiu d'atenuar el dolor. En casos així i en molts d'altres, la cirurgia és un bon recurs per al tractament del càncer^[15].

La **quimioteràpia** o farmacoteràpia correspon al tractament del càncer amb medicaments. Els fàrmacs usats en quimioteràpia produeixen efectes citotòxics en les cèl·lules en divisió. Com s'ha esmentat anteriorment, les cèl·lules cancerígenes proliferen amb una taxa molt major que les cèl·lules sanes, de manera que la possibilitat de que els fàrmacs actuïn en les tumorals és molt alta. Tot i així, les cèl·lules del cos amb més velocitat de duplicació, com per exemple les de les ungles i els cabells, reben l'efecte del fàrmac, igual que les cèl·lules cancerígenes. Les dosis i els cicles en què s'aplica la quimioteràpia, doncs, han d'estar adequadament controlats ja que els medicaments, com s'ha dit, poden operar en qualsevol cèl·lula del cos que estigui en fase de reproducció, de tal manera que els efectes secundaris d'aquest tractament poden ser molt importants, i les cèl·lules sanes en poden resultar greument afectades. Hi ha més de 100 fàrmacs diferents, que s'empren depenent de l'edat, el tipus de tumor, l'estadi en què es troba, etc. I es poden administrar per mitjà de diferents vies: per via oral, intravenosa, injectant-lo directament al tumor, etc. En cas de metàstasi, la quimioteràpia és un tractament molt adequat, ja que té repercussió per tot el cos, de la mateixa manera que ho fa un tumor que s'expandeix en metàstasi, en aquest cas, la inespecificitat dels medicaments, és positiva^[16].

La **immunoteràpia** s'utilitza en pacients amb tumors sòlids. Consisteix en activar el sistema immunitari dels malalts de manera que el propi cos pugui realitzar l'eliminació del tumor. Tot i que el cos actua amb més eficàcia en virus i altres patògens, s'ha comprovat que és també perfectament capaç d'eliminar

cèl·lules cancerígenes. La dificultat que suposa pel cos operar en cèl·lules tumorals és deguda a que el tumor interfereix en el desenvolupament de la resposta immunitària^[17]. La immunoteràpia s'efectua estímulant el sistema immunitari per tal de que generi anticossos contra els antígens de les cèl·lules tumorals o bé administrant directament anticossos, sintetitzats al laboratori, que ajudin a actuar en l'eliminació de cèl·lules cancerígenes^[18].

La **radioteràpia** generalment és una teràpia que implica l'emissió de radiacions ionitzants a la zona específica del tumor. La radiació fractura els filaments de DNA de les cèl·lules, causant-els-hi la mort, de manera que ja no es puguin seguir reproduint. També existeix un tipus de radioteràpia sistèmica, que com la quimioteràpia, afecta tot el cos; consisteix en ingerir medicaments que contenen substàncies radioactives, sovint enllaçades a anticossos monoclonals, que s'uneixen als antígens de les cèl·lules tumorals, facilitant així l'acció dels radioactius en les zones cancerígenes.^[19]

Les **teràpies específiques o dirigides** (en anglès, *targeted therapies*), són teràpies que busquen ser el màxim de precises possible a l'hora de tractar un tumor. Perquè sigui així, el fàrmac ha de respondre a característiques úniques i pròpies de les cèl·lules tumorals, o almenys que siguin poc compartides amb les cèl·lules normals. Les teràpies amb fàrmacs utilitzats per a la curació de tumors, s'inclourien dins de la quimioteràpia, però els medicaments de les teràpies específiques no segueixen l'estàndard dels de la quimioteràpia, ja que aquests tots tenen en comú que actuen en les cèl·lules que estiguin reproduint-se, sense tenir en compte altres peculiaritats. Els efectes secundaris de la quimioteràpia i de les teràpies dirigides, per tant, també són diferents. Per exemple, en el cas d'aquest estudi, s'ha tingut en compte a l'hora de dirigir el fàrmac, la capacitat i els mètodes que tenen les cèl·lules cancerígenes per captar glucosa, molts més que les cèl·lules normals, perquè tenen un ritme de proliferació molt elevat.^[20]

A part d'aquests cinc tractaments esmentats hi ha altres mètodes alternatius, que sovint es complementen amb altres teràpies, i que tot i que amb menys freqüència, també s'utilitzen. En són exemples el transplantament de cèl·lules mare, que es duu a terme en determinats tipus de càncer, sobretot en els que afecten la sang i el sistema immunitari; també la hipertèrmia, de forma moderada, però pot ser útil, ja que les altes temperatures poden provocar la mort cel·lular; així com també la teràpia fotodinàmica que utilitza medicació especial que només s'activa amb la llum, de manera que al aplicar-se llum sobre l'àrea afectada el fàrmac actua de forma específica sobre aquesta, sense afectar exageradament altres zones del cos; també a vegades és necessària una transfusió de sang; finalment, la teràpia amb làsers també té la seva utilitat, ja que a diferència de la llum solar o de bombeta, té una sola longitud d'ona i es pot focalitzar estretament en l'àrea desitjada. Així doncs hi ha molts tractaments que es poden dur a terme per a la guarició del càncer, els anteriorment explicats i bastants d'altres. La gran varietat de càncers i de individus impliquen varietat a l'hora d'aplicar uns tractaments o bé una altres^[14].

4.1.3. Tumors pediàtrics

La pediatria és la branca de la medicina que té cura dels infants, dels nens ja més grans i dels adolescents. La característica fonamental que defineix aquests tres estadis és el creixement. El període de gestació del fetus es caracteritza per la hiperplàsia, és a dir, per la divisió cel·lular i la proliferació cel·lular. Seguidament, passades les 28 setmanes de gestació es dóna lloc a l'hipertrofia, és a dir, la divisió cel·lular s'atura en gran part. Just després del naixement del nadó, però, el cos continua creixent fins a aconseguir la maduresa física del cos adult. Tot i així, els diferents teixits i òrgans es desenvolupen en moments diferents i de forma molt distinta els uns dels altres, de tal manera que el desenvolupament adult s'assoleix de manera periòdica^[21].

Les diferents etapes de creixement provoquen una necessària diferenciació entre els individus que les viuen: l'infant a la primera etapa de la infància, que engloba des de la segona meitat de l'embaràs fins als 2-3 anys; el nen a la segona etapa de la infància, que va des dels 3 anys fins a l'inici de la pubertat; i finalment l'adolescent a l'adolescència, que s'inicia a la pubertat i finalitza per les noies als 19 anys i els nois entre els 21 i 25 anys. El creixement en aquestes etapes pot determinar els tipus de càncers que s'hi puguin desenvolupar^[21]. El càncer infantil majoritàriament es deu al creixement, el càncer d'adult, en canvi, generalment sorgeix a causa de l'acció de factors ambientals com l'estil de vida^[22].

El creixement i desenvolupament són característiques de les diferents etapes assenyalades. Els tumors rars que apareixen com a conseqüència de desviacions dels processos normals de diferenciació i creixement, s'anomenen càncers del desenvolupament (Fig.2). Se'n diferencien dos tipus.

El primer són els tumors embrionaris, tumors que proliferen a partir de teixits immadurs, poc diferenciats, que creixen sovint durant el desenvolupament fetal i postnatal. Se solen diagnosticar fins als cinc anys de vida. Les cèl·lules tumorals que en deriven, sovint s'assemblen als

teixits a partir del qual s'han desenvolupat, per tant, hi ha una estreta relació entre els tumors embrionaris i els òrgans que derivarien de la diferenciació de les cèl·lules immadures amb les que s'ha format el tumor. En són exemples alguns blastomes (retinoblastoma, neuroblastoma, medul·loblastoma...) i el rabdomiosarcoma. Els tumors embrionaris no són gaire freqüents a l'etapa adulta perquè es formen a partir

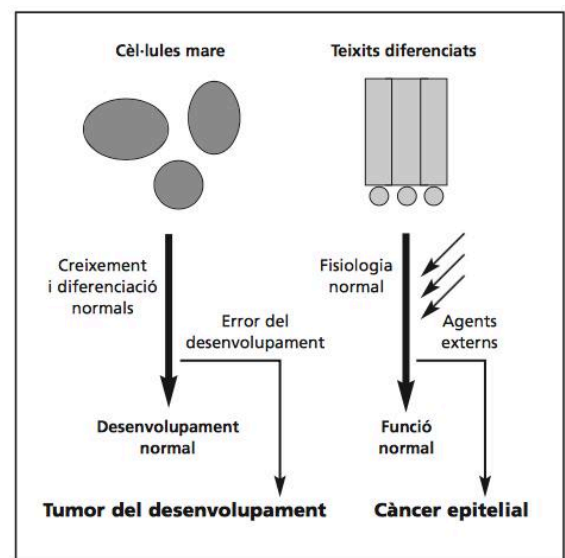


Figura 2. Gènesi de tumors del desenvolupament.

de cèl·lules indiferenciades i les cèl·lules indiferenciades o cèl·lules mare pateixen grans processos de diferenciació sobretot en les etapes de desenvolupament.

El segon tipus són aquells càncers sorgits a partir dels 10 anys fins a l'edat adulta, que es relacionen amb el desenvolupament puberal i el creixement accelerat dels teixits en resposta a l'estímul hormonal, en són alguns exemples el rhabdomiosarcoma alveolar, l'osteosarcoma i el sarcoma d'Ewing^[23].

Els tumors en la primera etapa, la de la infància (fins als 2-3 anys), la gran part es defineixen com aquells que creixen de les poblacions cel·lulars que encara no han acabat els processos de diferenciació. El càncer majoritàriament es deu a que la velocitat de divisió cel·lular és molt alta en els primers anys de vida. Les característiques fisiològiques pròpies d'aquest període defineixen la majoria de trets importants dels càncers desenvolupats en aquesta etapa. Aquests càncers creixen molt ràpidament, molts són causats per condicions congènites, i a més a més, sovint tendeixen al retrocés. La gran part de blastomes es produeixen en aquesta etapa, són causats per malformacions congènites causades en els processos de diferenciació. El neuroblastoma infantil n'és un exemple; quan es troba en estadi 4S, sovint, espontàniament, es redueix responant a senyals de diferenciació, la qual cosa implica un millor pronòstic dels casos de neuroblastoma al llarg de la primera etapa de la infància que de la resta de casos detectats en altres etapes^[21].

El càncer desenvolupat al llarg de la segona etapa de la infància (dels 3 anys fins a la pubertat) es defineix com aquell que sorgeix de poblacions cel·lulars que encara no han acabat els processos de diferenciació, però la hiperplàsia ja deriva a hipertrofia. La diferenciació cel·lular es va aturant a mesura que es van formant els òrgans. Aquest període de creixement depèn en gran part de les hormones de creixement (GH). El càncer més freqüent en aquesta etapa és la leucèmia i seguidament l'astrocitoma (càncer del cervell que afecte les cèl·lules glies), i també altres tumors freqüents d'aquest període serien el nefroblastoma (tumor en el ronyó), el neuroblastoma i el rhabdomiosarcoma embrionari^[21].

Finalment hi ha els càncers originats a l'adolescència (de la pubertat als 19 anys, en el cas de les noies, o 21-25 anys en el cas dels nois) es defineixen com aquells que es desenvolupen en mig de la pubertat, la qual es caracteritza per l'acceleració de la taxa de creixement i la maduració dels òrgans sexuals. Els càncers més freqüents en aquesta edat són el tumor de cèl·lules sexuals (es manifesta a les gònades), el limfoma de Hodgkin, sarcomes als ossos (Ewing sarcoma i osteosarcoma) i tumors cerebrals^[21].

El seguiment d'un nen o nena amb càncer és diferent del que se li faria a un adult, ja que s'ha de tenir en compte que un infant encara ha de créixer i una malaltia d'aquest nivell podria suposar impediments a l'hora de desenvolupar-se a més les seqüeles posteriors podrien ser molt significatives^[24].

Entre tots els càncers cal fer una distinció. El càncer pot desenvolupar-se de manera compacte o bé de forma difusa, com en els casos de càncers hematològics. Quan s'origina una massa de cèl·lules que creix amb un comportament anormal, es parla de tumors. Un tumor pot ser benigne o maligne, quan és maligne llavors és quan es tracte d'un càncer. Els tumors són benignes quan no poden envair altres parts del cos^[25].

4.1.3.1. Rabdomiosarcoma

El rabdomiosarcoma és un càncer que majoritàriament afecta als infants. S'origina a les cèl·lules del teixit mesenquimàtic, un teixit connectiu que per mitjà de la diferenciació sovint deriva a teixit muscular estriat (rabdo: múscul; mio: estriat; sarcoma: tumor maligna del teixit conjuntiu). Tot i així, no sempre es manifesta als músculs estriats, perquè la mutació que provoca el desenvolupament del càncer es produeix a cèl·lules del teixit mesenquimàtic, que són cèl·lules poc diferenciades provinents del mesoderma, i podrien esdevenir altres teixits diferents al muscular estriat^[26]. Sovint es presenta a la regió del coll i el cap (25%), en el sistema genitourinari (22%), a les extremitats (18%), que són zones més comunes en adults, i en altres llocs com la regió anal/peritoneal i a l'abdomen. En els últims anys, les taxes de supervivència al rabdomiosarcoma infantil després de 5 anys del diagnòstic han augmentat, essent ara un 67% d'infants menors de 15 anys i un 51% d'adolescents entre 15 i 19 anys els que sobreviuen de la malaltia. Aproximadament, un 3,5% dels casos d'infants amb càncer i un 2% dels adolescents amb càncer pateixen rabdomiosarcoma. La incidència és de 4,5 casos per cada milió d'infants, i el 50% dels casos es diagnostiquen durant la primera dècada de vida^[27].

Les causes que originen la transformació neoplàstica no són clares, ja que moltes vegades succeeixen esporàdicament, en algunes excepcions, però, hi ha factors de risc que predisposen la persona a desenvolupar un càncer: algunes condicions genètiques que es relacionen amb el rabdomiosarcoma, i un pes i alçada elevats del nadó al néixer s'han relacionat amb el desenvolupament del rabdomiosarcoma^[28].

Pel que fa a les condicions genètiques, es coneixen sis condicions que podrien augmentar els riscos d'originar un tumor: el síndrome de Fi-Fraumeni, un blastoma pleuropulmonar, diverses RASopaties i el síndrome de Beckwith-Wiedemann^[27]. El síndrome Li-Fraumeni, implica una mutació al gen supressor tumoral TP53, localitzat al cromosoma 17. Si la transcripció del gen no mutats i posterior traducció fos correcte impediria que es produís la divisió de la cèl·lula en cas de una duplicació defectuosa^[29]. Un infant amb un blastoma pleuropulmonar, un càncer que s'origina als pulmons o a la cavitat pleural, amb mutacions al gen DICER 1, també podria ser propens a patir rabdomiosarcoma, ja que el gen mutat codifica per a una proteïna que juga un paper important alhora regular l'expressió d'altres gens, degut a que participa en la producció de cadenes de microRNA, i les molècules de microRNA controlen la transcripció de

l'mRNA^[30]. Les RASopaties, que es defineixen clínicament com a un grup de síndromes genètics causats per mutacions germinals en gens que codifiquen per a components o reguladors de la via RAS/MAPK (mitogen-activated protein kinase), també podrien facilitar el desenvolupament del rabdomiosarcoma^[31]. Aquesta via té com a funció integrar senyals externs i coordinar una resposta adequada mitjançant un posterior control del creixement cel·lular, de la supervivència i de la diferenciació cel·lular. Les RASopaties que podrien provocar rabdomiosarcoma són la neurofibromatosi de tipus1, el síndrome Costello i el síndrome de Noonan^[27]. Finalment hi ha una altra malaltia genètica anomenada, síndrome de Beckwith-Wiedemann, que també podria influir en el desenvolupament del rabdomiosarcoma. Consisteix en un síndrome de sobrecreixement, que significa que els infants afectats són considerablement més grans del que seria normal (macrosomia) i solen ser més alts que els altres infants^[32].

El creixement accelerat intrauterí i l'alçada i el pes elevats d'un nadó al néixer també són factors de risc. Es considera que és un causant del rabdomiosarcoma embrionari, pel que fa al rabdomiosarcoma alveolar no hi ha estudis suficients encara com per establir-hi una relació. L'estadística indica que hi ha hagut un creixement de la mida dels nadons al néixer en les últimes dècades, la qual cosa s'atribueix a l'augment de l'IMC maternal pre-embaràs, a l'augment de pes al llarg de la gestació i a la diabetis més freqüent. Aquests canvis en el cos matern afecten directament les taxes metabòliques del propi organisme. Augmenta el factor de creixement insulínic-1 (IGF-1), que està estretament lligat al creixement i desenvolupament del fetus, les seves propietats mitòtiques i anti-apoptòtiques podrien facilitar el creixement d'un tumor. Per tant, s'estableix una relació entre una mida gran del cos dels infants al moment de néixer i el desenvolupament de càncer. Fins i tot, s'ha associat directament l'IGF-2 com una causa del rabdomiosarcoma embrionari. Delecions cromosòmiques afecten àrees de gens que es transcriuen, que inclouen el gen IGF-2, el qual, mutat, comporta expressions anormals de l'hormona. De fet, el síndrome Beckwith-Wiedemann s'associa amb un sobrecreixement del fetus, com a resultat d'una deficient expressió d'IGF-2, per això es diu que aquest síndrome incrementa el risc d'RMS^[33].

Hi ha dos tipus de rabdomiosarcoma: el rabdomiosarcoma embrionari, que és el subtipus més freqüentment observat, i el rabdomiosarcoma alveolar, del qual, la majoria dels casos tenen més mal pronòstic. A part d'aquests dos tipus principals també hi ha altres tipologies d'RMS més minoritàries.

El rabdomiosarcoma embrionari té incidència majoritàriament entre els 0 i 4 anys d'edat i poc sovint en adolescents. Afecta aproximadament a 4 casos per cada milió d'infants, i a uns 1,5 casos per cada milió d'adolescents. Representen entre un 60 i un 70% dels casos de rabdomiosarcomes. Els pacients amb eRMS són majoritàriament del sexe masculí, però no està clar perquè la incidència recau més en els mascles^[26]. Tot i que un tumor d'eRMS pot créixer a qualsevol lloc de l'organisme és freqüent que es localitzi al cap, a la regió del coll i a la via genitourinària. Els tumors d'eRMS sovint mostren pèrdua de gens al

cromosoma 11p15 (Fig.3) i guanys al cromosoma 8. Sovint, els gens mutats codifiquen per enzims que formen part de la via RAS. El rabdomiosarcoma embrionari té una taxa de mutació major al rabdomiosarcoma alveolar.

Alguns casos de rabdomiosarcoma embrionari mostren anaplàsia, és a dir, regressió de les cèl·lules a una forma més primitiva i indiferenciada^[34], es presenta en cas de mutació en el gen TP53, i per tant, l'anaplàsia podria ser una característica dels tumors d'infants amb Fi-Fraumeni^[27].

Hi ha una altra variant del rabdomiosarcoma embrionari, es tracte de rabdomiosarcoma de cèl·lules fusiformes, comunament localitzat a la zona paratesticular, 10 de cada 11 pacients amb aquests tipus de tumors contenen translocacions cromosòmiques. Es considera com un tercer subtipus de rabdomiosarcoma. Els casos afectats tenen un pronòstic favorable^[26].

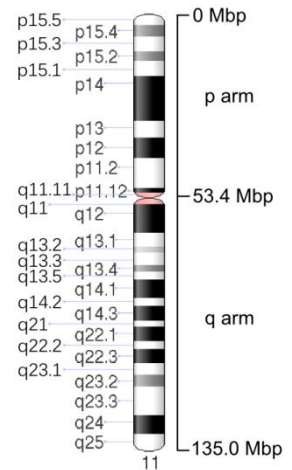


Figura 3. Cromosoma 11

Aproximadament un 30% dels infants amb RMS pateixen rabdomiosarcoma alveolar. El rabdomiosarcoma alveolar és menys propici que l'embrionari i incideix sobretot en adolescents. Es manifesta sovint a les extremitats, al tronc i a la regió perianal. Un 80% dels pacients amb aRMS tenen una o dues fusions de gens: PAX3 (cromosoma 2) o PAX7 (cromosoma 1) amb FOXO1 (cromosoma 13), també són possibles altres translocacions rares com PAX3-NCOA1 i PAX3-INO80D. Els pacients sense fusions tenen pronòstics semblants als de pacients amb eRMS. Les translocacions que involucren el gen PAX3 apareixen en un 59% dels aRMS, en canvi en un 19% dels casos hi està involucrat el gen PAX7. La histologia alveolar que s'associa amb el gen PAX7 apareix a les edats més joves i es relaciona amb un EFS (event-free survival), més llarg, és a dir, el temps que transcorre després del primer diagnòstic en absència de complicacions és més prolongada que els pacients amb histologia alveolar on el gen PAX3 hi està implicat, aquests incideixen en persones més grans i els tumors que proliferen són més invasius. Al voltant d'un 22% dels casos que desenvolupen rabdomiosarcoma alveolar no manifesten translocacions amb els gens PAX.

S'ha comprovat que hi ha una majoria de pacients que presenten rabdomiosarcoma sense translocacions, per tant, eRMS i aRMS sense fusió de gens, i una minoria que exposa mutacions però no presenta cap translocació. Aquests darrers tenen més bon pronòstic^[26].

4.1.3.2. Osteosarcoma

L'osteosarcoma és un tumor originat a les cèl·lules del teixit mesenquimàtic que deriven a osteoides. És el tumor d'ossos amb més incidència^[35]. Aquest tipus de càncer predomina en adolescents i adults joves. La taxa de supervivència DE L'OSTEOSARCOMA és d'un 76% en nens menors de 15 anys i d'un 66% en adolescents entre 15 i 19 anys. Es diagnostiquen aproximadament 4,4 casos d'osteosarcoma per cada milió

nens i adults joves entre 0 i 24 anys. Representa un 5% dels tumors infantils. En nens i adolescents, més d'un 50% d'osteosarcomes apareixen als ossos llargs al voltant del genoll^[36]. En els pacients més joves l'osteosarcoma se sol desenvolupar en zones on el creixement de l'os és ràpid. La incidència és més alta en nois que noies, i el pic coincideix amb el període de la pubertat^[37].

Les causes que desencadenen l'osteosarcoma no són clares, moltes vegades no hi ha predisposició, però els pics d'incidència porten a relacionar l'etiologia amb factors perinatals, de creixement i desenvolupament. A més a més, persones amb uns síndromes i malalties determinades estan més predisposats al desenvolupament d'osteosarcoma. En estudis també s'ha associat l'altura amb aquest tipus de tumor^[37].

Els síndromes i malalties correlacionats amb l'osteosarcoma són la malaltia de Paget, el síndrome de Fi-Fraumeni, el retinoblastoma, l'anèmia Diamond Blackfan, i el síndrome Rothmund-Thomson. La malaltia de Paget és un desordre del metabolisme dels ossos, el qual inclou destrucció i creixement del teixit ossi. Les causes que la provoquen són encara totalment desconegudes, però segurament responen a un factor genètic o bé a una infecció viral durant els primers anys de vida^[38]. El síndrome de Fi-Fraumeni pot ocasionar osteosarcoma perquè implica una mutació en el gen supressor tumoral TP53, un dels gens que al ser mutat és un dels principals causants de la proliferació d'un osteosarcoma. El retinoblastoma, un càncer infantil que es desenvolupa a la retina, és causat per una mutació hereditària en el gen RB1, que codifica per un supressor tumoral, la mutació d'aquest gen doncs, també podria fer desenvolupar el creixement d'altres tipologies de càncer com seria en aquest cas l'osteosarcoma. L'anèmia de Diamond Blackfan és causada per una mutació, a vegades hereditària, que provoca una producció deficient de cèl·lules sanguínies per part de la medul·la òssia, situada a l'interior dels ossos^[39]. Finalment, també es relaciona el síndrome de Rothmund-Thomson amb l'osteosarcoma. És una malaltia que provoca un desordre metabòlic a tot el cos, tot i que la pell i els ossos són els principals afectats. Dos terços dels casos que pateixen el síndrome contenen una mutació al gen RECQL4, que és un al·lel recessiu, la mutació s'hereta dels progenitors. Aquest gen no mutat codifica per uns enzims anomenats helicases que participen en el procés de duplicació del DNA^[40].

Degut a la situació dels pics d'incidència de l'osteosarcoma al llarg de la vida, s'associa el creixement amb l'osteosarcoma. El creixement accelerat es relaciona directament amb l'augment de possibilitats de carcinogènesi. El pic més important coincideix amb la pubertat; durant aquest període les hormones sexuals endògenes, les hormones del creixement i l'IGF1 es troben als seus nivells més elevats, els factors de creixement similars a la insulina juguen un paper important a més a més amb la carcinogènesi. Com en el rabdomiosarcoma l'IGF-2 s'ha descobert que està involucrada en alguns casos amb la proliferació de l'osteosarcoma. L'alçada i el pes al moment de néixer també es consideren una causa de l'osteosarcoma^[37].

L'osteosarcoma es distingeix dels altres tipus de càncers infantils pel panorama genòmic que presenta. Es caracteritza per un gran nombre de mutacions genòmiques, una alta densitat de translocacions intra i intercromosòmiques, i una quantitat relativament petita de mutacions gèniques, la situació és contrària a altres càncers infantils com el rabdomiosarcoma i el sarcoma d'Ewing. El número de mutacions per genoma d'osteosarcoma que afecten la seqüència d'una proteïna són aproximadament unes 25 per genoma. Les mutacions del gen TP53, RB1, d'altres, com per exemple ATRX, DLG3 i PTEN (que forma part de la via metabòlica PI3K//blanc), alteren el control de la duplicació del DNA, ja que tots aquests gens estan relacionats aquest procés. Com que no es tracte d'oncogens, sinó de la pèrdua de gens supressors tumorals, no es proporcionen dianes terapèutiques evidents, la qual cosa dificulta el tractament de l'osteosarcoma^[36].

4.1.3.3. Sarcoma d'Ewing

El sarcoma d'Ewing és la segona tipologia de càncers d'ossos més incident. Se sol manifestar en cèl·lules dels ossos de les cames, braços, peus, mans, pit, pelvis, a la columna vertebral i al crani, també es pot localitzar en teixit tou del tronc, dels braços, de les cames, del cap, del coll, i de la cavitat abdominal. Normalment els pics d'incidència són al llarg de la infantesa, adolescència i adults joves, però més d'un 50% dels pacients són adolescents, i la majoria són mascles^[41]. El tumor es compon de cèl·lules rodones i petites i fa molt pocs anys que se'n coneix el seu origen. Hi ha hagut diferents estudis que han demostrat que té un origen neurogènic, és a dir, que sorgeix a partir de teixit nerviós^[42]. La histologia de les cèl·lules tumorals d'ES està determinada pel seu origen neurogènic ja que contenen alguns marcadors neurals. Més concretament, s'origina a les cèl·lules de la cresta neuronal, les quals són un component transitori de l'ectoderma, i a partir d'aquesta es desenvolupen les neurones i cèl·lules glies del sistema nerviós autònom (SNA), alguns elements del sistema esquelètic, tendons i múscul llis; condrocits, osteòcits, melanòcits, etc. També es proposa el teixit mesenquimàtic com a origen del desenvolupament d'ES^[43]. Als estats units té una incidència de 2,1 casos per milió de nens significat el 2% dels càncers infantils^[35].

L'ES té una situació genòmica menys complexa que la gran majoria de tumors infantils. El gen EWS-FLI1 es manifesta en un 85% de sarcomes d'Ewing i sorgeix degut a una fusió causada per t(11;22)(q24;q12) (Fig. 4). Una altra translocació que origina EWS-ERG, t(21;22)(q22;q12), es manifesta en un 10% dels casos. Altres translocacions menys freqüents són EWS-ETV1, EWS-ETV4 i EWS-

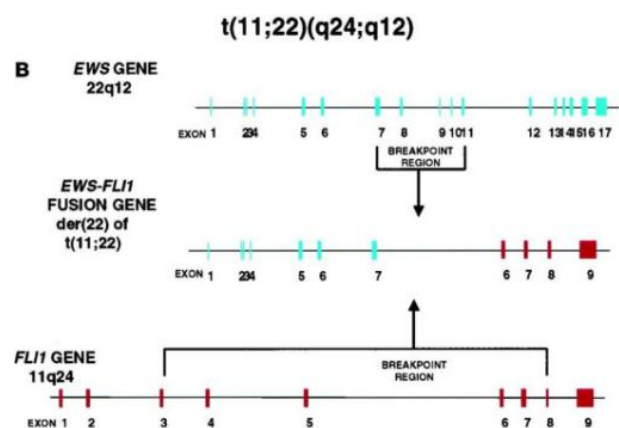


Figura 4. Translocació t(11;22)(q24;q12).

FEV. Les proteïnes quimèriques que se n'originen actuen com a factors oncogènics^[42]. Al marge de les translocacions amb EWS, altres translocacions i variacions estructurals també han sigut identificades. Tot i que l'ES no es caracteritza per un mapa genòmic gaire caòtic, les diferents mutacions que puguin presentar afecten alguns gens, els més importants serien: TP53 (9-21,5%) i STAG2 (5,2-7%). La mutació de STAG2 és perjudicial perquè codifica per una subunitat del complex de cohesina i participa en el modelatge de cromatina, la cohesió de la cromatina, la reparació de forquilles de replicació estancades i trencaments de doble cadena. Les mutacions en TP53 impedeixen l'acció correcta del gen com a supressor tumoral^[43]. El gen CDKN2A, que actua com a regulador de la transcripció de gens codificants de determinades proteïnes, també apareix freqüentment mutat en casos d'ES^[44].

4.1.3.4. Neuroblastoma

El neuroblastoma és un tumor embrionari que afecta majoritàriament als infants de menys edat, generalment a partir dels 18 mesos. És un càncer del sistema nerviós simpàtic. El sistema nerviós simpàtic és una part del sistema nerviós autònom que controla, de manera inconscient, diferents accions involuntàries com la freqüència cardíaca i la pressió arterial, la digestió i els nivells de certes hormones. El neuroblastoma pertany als tumors neuroblàstics, juntament amb el ganglioneuroma i el ganglioneuroblastoma, originat a partir de la cresta neural. Els tumors de neuroblastoma són molt heterogenis en termes biològics, genètics, clínics i morfològics^[45]. Representa un 7% dels casos de càncer infantil, més d'un 50% es donen en infants menors de 2 anys, i afecte aproximadament a 1 de cada 100.000 nens^[46].

La majoria dels neuroblastomes comencen a l'abdomen, a les glàndules suprarenals, prop de la medul·la espinal o al tòrax. Es poden disseminar als ossos, la qual cosa inclou la cara, el crani, la pelvis, les espatlles, els braços i les cames. També en alguns casos es poden disseminar a la medul·la òssia, al fetge, als ganglis limfàtics, a la pell i al contorn dels ulls^[47].

A voltant d'un 1 i un 2% dels pacients amb neuroblastoma tenen antecedents familiars d'aquest, i sovint aquests casos són més joves (9 mesos) en el moment del diagnòstic. La predisposició genètica s'ha relacionat amb varies mutacions de la línia germinal. La primera és una mutació del gen ALK, que codifica per un receptor de tipus tirosina quinasa. La segona és una mutació del gen PHOX2B. En ocasions molt minoritàries el neuroblastoma es relaciona amb el síndrome d'Ondina, un síndrome respiratori, que conté una mutació d'aquest gen. I la darrera, és una deleció de la línia germinal en el locus 1p36 o 11q14-23. Tot i així, a vegades aquestes mutacions també sorgeixen de manera esporàdica.

En la majoria de casos el neuroblastoma sorgeix de forma esporàdica, s'han identificat diversos polimorfismes d'un sol nucleòtid, és dir alteracions en un sol nucleòtid. Un subconjunt d'aquestes mutacions

originen neuroblastomes d'alt risc, com per exemple les que alteren la seqüència del gen BARD1, del gen LMO1, del LIN28B... Dels lactants afectats, normalment majors de 18 mesos, només en sobreviuen un 50% després de diagnòstic. Les característiques genòmiques dels tumors més agressius són una ampliació del gen MYCN, que regula la transcripció de determinades proteïnes, mutacions que provoquen l'allargament dels telòmers i mutacions activadores de ALK^[48]. Altres mutacions gèniques, però, també es relacionen amb neuroblastomes de baix risc. Aquests presenten habitualment un augment del nombre de cromosomes a les cèl·lules tumorals. En general es presenta en casos d'infants de menys de 18 mesos.

4.2. RECEPTOR DE GLUCOSA GLUT-1

GLUT-1 és una proteïna transmembrana transportadora de glucosa, codificada pel gen SLC2A1. Va ser el primer transportador de membrana que es va purificar, i actualment és un dels més àmpliament estudiats. S'ha estudiat especialment en els eritròcits on s'hi troba en gran abundància. Està compost per 492 aminoàcids i té adherida a l'extrem N45 una molècula glucídica (Fig. 5), a part d'això no es coneixen altres modificacions post-transcripcionals de la proteïna. GLUT-1 està constituït per 12 hèlixs, els sis primeres presenten una pseudo-simetria amb les sis últimes. Les hèlixs internes són 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 i 11, la quals són estabilitzades per les hèlixs externes 3, 6, 9 i 12, que són les més hidrofòbiques (Fig. 6). Aquesta distribució segueix un model simètric^[49].

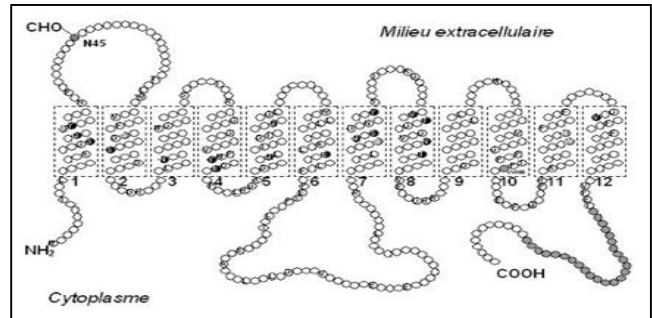


Figura 5. Estructura molecular de GLUT-1.

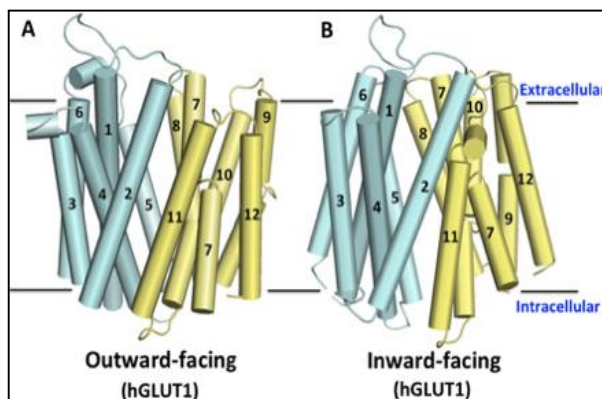


Figura 6. Estructura de GLUT-1 en les dues conformacions possibles.

Els transportadors de glucosa transmembrana duen a terme la difusió facilitada^[50], la qual depèn de la diferència de concentració entre el medi extern i el medi intern, però sobretot també de la quantitat de transportadors que hi hagi^[51]. La proteïna pot canviar la seva conformació segons si es transporta la molècula cap a l'exterior de la cèl·lula o bé cap al citoplasma (Fig. 6). S'ha comprovat que l'afinitat amb el sucre, però, és major en la conformació amb l'obertura cap a l'exterior, i, en conseqüència, la velocitat del transport és major de l'exterior cap a l'interior de la cèl·lules que a la inversa. El principal substrat transportat és clarament la glucosa, però, tot i així, també és capaç de transportar manosa, galactosa, glucosamina i ascorbat reduït. La seva activitat pot ser inhibida per la citocalasina B i la florentina^[49].

GLUT-1 s'expressa en múltiples tipus de cèl·lules i conjuntament amb altres GLUTs. Més concretament però, s'expressa àmpliament en les membranes dels eritròcits, en la barrera hematoencefàlica, on hi té un rol molt important, ja que la glucosa és el principal combustible del cervell, i també juga un paper important a la placenta, perquè és el major responsable de transferir la glucosa materna al fetus i per tant, és crucial pel desenvolupament adequat del fetus^[49].

L'expressió de GLUT-1 és molt elevada en les cèl·lules tumorals, ja que aquest transportador és essencial per la proliferació dels tumors. Els tumors, que metabòlicament són molt actius, són dependents de la glucosa per a satisfer l'alta demanda d'ATP. Aquest fet, explica la necessitat de les cèl·lules cancerígens d'augmentar l'expressió dels receptors de glucosa^[49].

4.3. EL FÀRMAC

4.3.1. Dasatinib

El fàrmac Dasatinib (Fig. 7) és un inhibidor de tirosina quinasa (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*) de mida molecular petita generalment ingerit per via oral. Sovint és emprat per tractar la leucèmia (CML, *chronic myeloid leukemia*), ja que la principal mutació d'aquesta tipologia de

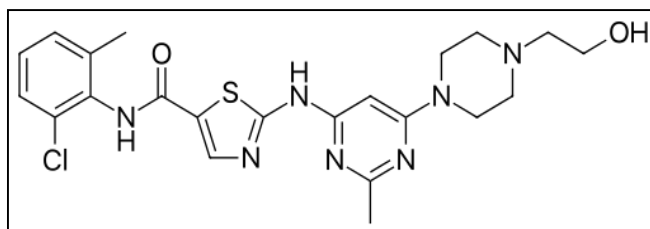


Figura 7. Estructura química de Dasatinib.

càncer afecta directament la cadena de transducció de senyals de tirosina quinasa. La mutació consisteix en la fusió de dos gens, BCR i ABL, la fusió dels quals origina BCR-ABL. En tumors sòlids s'ha comprovat que, per via oral, la seva activitat és molt moderada^[1].

Les tirosina quinases són mediadors importants de la cascada de senyalització que determina el desenvolupament de diferents processos biològics com el creixement, la diferenciació, la migració, el metabolisme i l'apoptosi com a resposta d'estímuls interns i externs a la cèl·lula. La tirosina és un aminoàcid que sovint actua de neurotransmissor que estimula l'acció dels enzims tirosina quinases, els quals donen resposta a l'estímul activant diverses vies metabòliques mitjançant l'ús d'ATP^[52].

El dasatinib, doncs, actua com a inhibidor de diferents mediadors que formen part de la família d'enzims tirosina quinasa. Realitza *targeting* amb les següents proteïnes: la proteïna quimèrica Abelson (ABL) tirosina quinasa activa, procedent de la fusió BCR-ABL, la família de quinases SRC, la família de quinases TEC i diferents receptors TK com c-KIT. El fàrmac actua sobre les diferents enzims inhibint-los^[49].

L'BCR-ABL, codifica per una proteïna quimèrica anomenada ABL tirosina quinasa, que no actua com a receptor, ja que realitza l'activitat a l'interior del citoplasma. La conformació més habitual de c-ABL conté diferents dominis SRC homòlegs (SH): SH1, que realitza l'activitat de tirosina quinasa, i SH2 i SH3, que permeten interaccions amb altres proteïnes. Els dominis SH es van primer descobrir en l'oncoproteïna SRC, que també forma part de la família d'enzims amb els quals reacciona dasatinib. El gen BCR-ABL es troba molt expressat en tumors sòlids com el càncer de pit, de colon, carcinomes de pulmó, tumors cerebrals, osteosarcomes i sarcomes d'Ewing. Està associat a la cara interna de la membrana i integra i regula els senyals provinents dels receptors de membrana als quals està acoblat, com per exemple EGFR o PDGFR^[1].

Un altre mediador que és inhibit per dasatinib és un receptor de membrana, una glicoproteïna que

s'anomena KIT. S'activa a partir de lligands, però, degut a mutacions podria esdevenir independent a la seva acció. Finalment, s'ha descrit un altre element sobre el qual també hi actuaria el fàrmac, les quinases TEC, que són no-receptors estretament lligats amb SRC i ABL, especialment s'ha estudiat un dels enzims d'aquesta família, el BTK (*Bruton tyrosine kinase*), sovint inhibit per dasatinib^[1].

4.3.2. Les micel·les polimèriques

Les nanopartícules s'utilitzen per estabilitzar i augmentar la biodisponibilitat dels fàrmacs, i a més a més augmenten l'especificitat de les teràpies^[53]. Poden estar formades de materials variats com per exemple polímers, lípids o metalls. Al seu interior poden contenir molècules actives com àcids nucleics, fàrmacs, proteïnes...segons l'aplicació biomèdica que se'n vulgui fer. Una gran varietat de nano-vehicles han sigut estudiats i utilitzats pel tractament de malalties (Fig. 8)^[54].

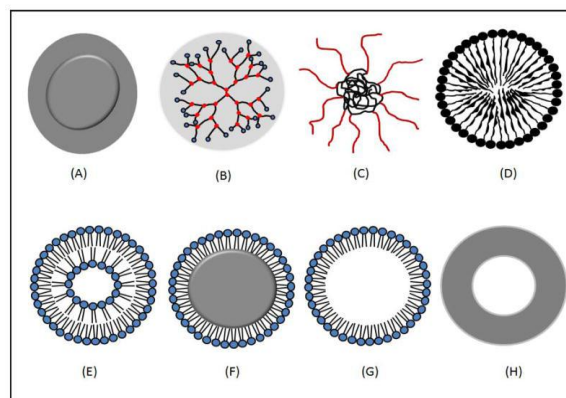


Figura 8. Diferents tipus de nanopartícules per l'investigació: (A) Nanopartícula polimèrica (B) Nanopartícula dendrítica (C) Micel·la polimèrica (D) Micel·la no polimèrica (E) Liposomes (F) Sòlid-líquid nanopartícules (G) Nanoemulsions lipídiques (H) Nanocàpsules lipídiques.

Les micel·les polimèriques són molècules amfipàtiques copolimèriques de forma esfèrica. S'utilitzen àmpliament pel transport de fàrmacs hidròfobs, ja que tenen una part externa hidròfila i un nucli central hidròfob, on queden retingudes les molècules dels medicaments insolubles. Per tant, la idea d'encapsular el fàrmac en polímers amfipàtics es basa en aconseguir solubilitat i estabilitat en molècules de fàrmac de naturalesa hidròfoba^[55].

Les micel·les polimèriques que embolcallaven el TKI, dasatinib, com s'ha explicat tenien dues formulacions. La Pristine T1107 (micel·la pura) i la T1107-Glu (micel·la decorada amb glucosa). Aquesta segona parteix de la primera amb l'afegit de molècules de glucosa als extrems de les cadenes que la formen.

Les micel·les en qüestió (Fig. 9) estan constituïdes per branques de poli(òxid d'etilè) i poli(òxid de propilè) (PEO-PPO), que formen copolímers i es designen com a Plurònics o Tetronics, depenent del tipus de cadena que desenvolupin (Fig. 10), en aquest cas Tetronic. Aquests biomaterials són els més versàtils en la formació de micel·les polimèriques a causa de la seva biocompatibilitat en diferents vies d'administració.

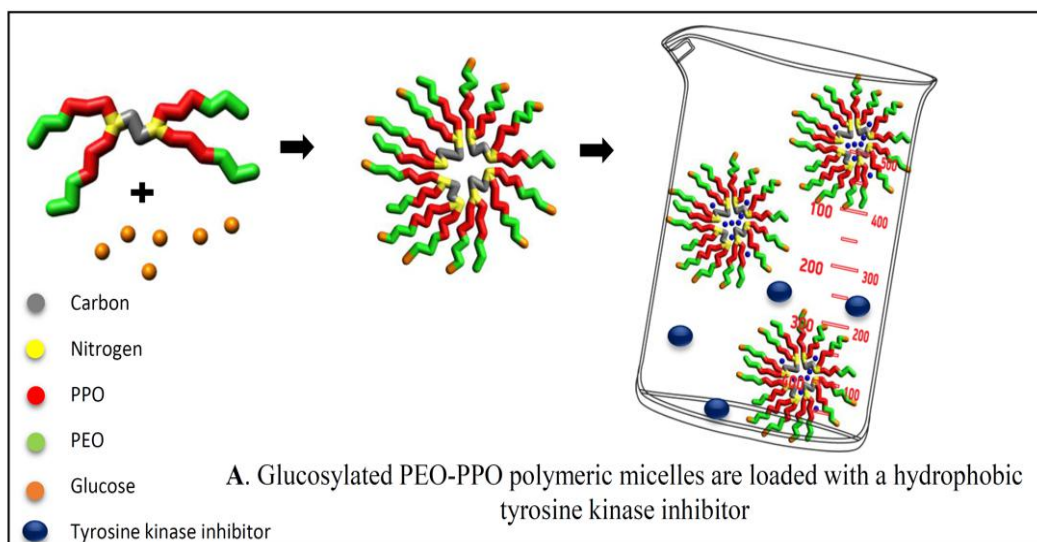


Figura 9. Micel·les polimèriques Glu-T1107

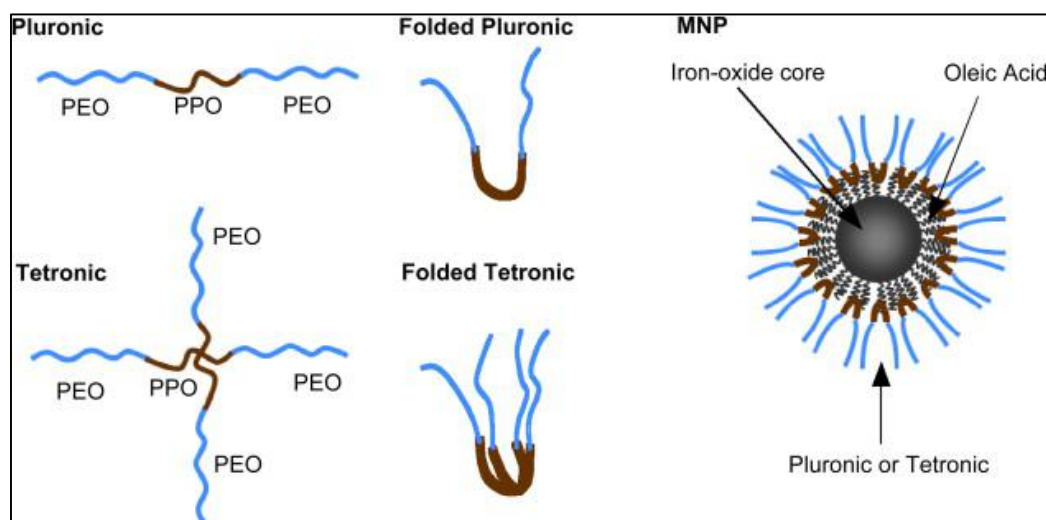


Figura 10. Conformacions Plurònica i Tetrònica.

5. METODOLOGIA

5.1. OBTENCIÓ DE MOSTRES

Les mostres utilitzades pels tres experiments provenien de ratolins (*Mouse musculus*). Per a l'HPLC es van infectar als ratolins amb la línia cel·lular Rh30, i posteriorment se'ls va administrar el fàrmac dasatinib en tres formats diferents; alguns se'ls va tractar per via intravenosa a l'interior de micel·les glicosilades o bé no glicosilades i d'altres per via oral en dissolució en àcid. Per a la immunohistoquímica i la RT-qPCR en els animals se'ls van introduir tumors de rhabdomiosarcoma, Ewing sarcoma, osteosarcoma i neuroblastoma, provinents de diferents pacients, i també cèl·lules de la línia cel·lular Rh30.



Figura 11. Ratolí (*Mouse musculus*) Nude.

Es treballa amb ratolins immune deprimits (*Mouse musculus*), de tal manera que no puguin desencadenar una resposta immunitària eficaç contra les cèl·lules tumorals que se'ls introdueixen al cos. Per aquest motiu, les normes d'accés i de treball a l'estabulari són tan estrictes, és molt important mantenir l'esterilitat en tots els espais on es manipulin els ratolins. Les races de ratolins més utilitzades són "Nude" (Fig. 11), que com el seu nom indica són nus, sense pèl, i "Nod" (Fig. 12), amb pèl blanc.



Figura 12. Ratolí (*Mouse musculus*) Nod.



Figura 13. Injecció per via intravenosa

Abans que res es deixen créixer els tumors dins dels animals. Per fer-ne el seguiment es pesen als ratolins periòdicament. La pèrdua de pes és un determinant clau per identificar si el ratolí està emmalaltint. Aquest mètode és molt útil pels animals amb tumors no subcutanis, ja que el tumor no és visible a simple vista. Quan el ratolí ha perdut un 20% del seu pes màxim obtingut, és precís sacrificar-ho. El que és important és que no es mori de forma natural, ja que si és així es perd la mostra, i a més, cal evitar el màxim possible que l'animal pateixi. El tumor es

passa d'un ratolí a un altre per tal de que segueixi proliferant. Per indicar els "passes" realitzats del tumor entre ratolins s'indica entre parèntesis al costat del nom del ratolí, per exemple: HSJD-ES-001 (F3).

Per a realitzar la injecció per via intravenosa primer cal posar l'animal sota una làmpada d'escalfor, però sempre amb la seguretat de no sobreescalfar-lo. D'aquesta manera les venes quedaran a la vista. Llavors s'introdueix l'animal en un dispositiu que li restringeixi la mobilitat, com el de la figura 13, de tal manera que la cua quedi a l'exterior per poder de realitzar la injecció.

5.2. IMMUNOHISTOQUÍMICA

La immunohistoquímica és una tècnica que permet reconèixer receptors específics mitjançant la unió antígen-anticòs. S'utilitza un anticòs primari i un de secundari. L'anticòs primari s'uneix a l'antigen (GLUT-1) de forma específica. L'anticòs secundari, marcat amb un enzim, en aquest cas la peroxidasa, reconeix al complex antígen-anticòs primari. Per revelar l'activitat de la peroxidasa, de manera que el substrat esdevingui visible, s'utilitza la solució DAB. (Fig. 14) És important que els anticòs siguin d'animals diferents al de l'antigen a analitzar, per això es procura que no siguin de ratolí ja que la mostra s'ha extirpat del cos d'un ratolí i podria ser que hi hagués cèl·lules d'aquest i interessa no crear confusió.



Figura 14. Esquema de la formació del complex antígen-anticòs i unió de l'anticòs primari que activa el senyal.

La immunohistoquímica de GLUT-1 està automatitzada, però es va dur a terme el procés manualment per a GLUT-4, un altre receptor de glucosa, per altres experiments, de manera que en pogués fer un seguiment. Per revelar la presència de GLUT-1, i també de GLUT-4, es va utilitzar un anticòs policlonal de conill.

Es van processar talls de tumors de models PDX: rabdomiosarcomes (RMS), rabdomiosarcomes alveolars (aRMS), neuroblastomes (NB), Ewing sarcomes (ES) i osteosarcomes (OS), i també tumors de la línia cel·lular Rh30.

De cada tipus de tumor hi havia un control negatiu per així poder comparar-lo amb els resultats de les mostres d'aquell mateix tipus de tumor. Es va utilitzar carcinoma de mama com a control positiu^[56]. També es va realitzar immunohistoquímica en teixits humans sans: el fetge i el ronyó, per tal de poder-ne fer la comparativa amb els teixits tumorals.

MATERIAL:

- Retolador impermeabilitzant, laminetes, gradeta de laminetes, cambra freda, PBS, antígen retrieval, Peroxidase block, Protein block, GLUT-1 Polyclonal antibody, Novolink Polymer, solució DAB, hematoxilina, alcohol i aigua MilliQ.

PROCEDIMENT:

1. Abans de començar amb tots els talls, realitzar el procediment amb talls de la mostra control positiu, ja que és precís comprovar quina és la dilució de l'anticòs primari que permetrà veure més clarament els resultats. El dissolvent és una solució salina comercial, ja que si fos aigua es podria produir la lisi de les cèl·lules per turgència, degut a processos osmòtics. En aquest cas s'ha provat amb 1:50, 1:100 i 1:200. S'ha escollit la 1:100 perquè no s'han apreciat gaires diferències entre les diferents mostres amb distintes dilucions, i per tant com que l'anticòs és car, el més adequat és utilitzar-ne el mínim possible, tot i així per assegurar-se que es vegi adequadament s'ha optat per la dilució intermèdia.
2. Una vegada escollida la dilució, amb un retolador impermeabilitzant, emmarcar les zones dels talls.
3. Rentar amb PBS durant 5 minuts els talls de teixit prèviament desparafinats (la parafina els manté en bona conservació). Una vegada desparafinats també se'ls aplica un tractament amb antígen retrieval, el qual serveix per "desemmascarar" els antígens que, per la fixació amb formol del tall a la lamineta, hagin pogut establir unions entre ells (*cross-linking*) produint el bloqueig de la unió de l'anticòs primari amb els antígens .
4. Treure de la gradeta les làmines amb PBS, deixar-les dins la cambra freda. Aplicar sobre els talls dues o tres gotes de Peroxidase Block durant 5 minuts. Aquest reactiu neutralitza la peroxidasa endògena, que es troba dins de les cèl·lules de la mostra.
5. Rentar en PBS dues vegades durant 5 minuts
6. Incubar dins la cambra freda altra vegada però amb gotes de Protein Block, que inactiva les proteïnes. Aquest reactiu bloqueja les proteïnes per evitar les unions inespecífiques de l'anticòs primari, d'aquesta manera es veu reduït el *background* de la immunohistoquímica.
7. Rentar en PBS dins la gradeta per a làmines dues vegades durant 5 minuts.
8. Incubar dins la cambra freda amb l'anticòs primari, GLUT-1 Polyclonal Antibody (*rabbit anti-human*) en una dilució de 1:100, durant 1h a temperatura ambient.
9. Tornar a rentar en PBS dins la gradeta per a làmines dues vegades durant 5 minuts.
10. Incubar les mostres amb Post Primary durant 30 minuts. El Post Primary és un anticòs secundari anti-ratolí, i tenint en compte que l'anticòs primari emprat és de conill, actualment no està clara la funció d'aquesta solució en la immunohistoquímica realitzada, però anteriorment era un barreja de anti-conill i anti-ratolí, de manera que servia per amplificar el senyal.

11. Rentar dues vegades amb PBS durant 5 minuts.
12. Incubar en Novolink Polymer durant 30 minuts. El Novolink Polymer consisteix en l'anticòs secundari anti-conill, el qual conté l'enzim que permetrà el marcatge, la peroxidasa.
13. Rentar en PBS durant 5 minuts dues vegades.
14. Rebel·lar l'activitat peroxidasa amb la solució DAB (50 µL de DAB chromogen + 1 mL de Novolink DAB Substrate Buffer) durant 5 minuts.
15. Rentar els portaobjectes amb MilliQ.
16. Realitzar la contratinció dels nuclis amb hematoxilina i posteriorment deshidratar amb alcohol.
17. Muntar les laminetes. Finalment adherir-hi el cobreobjectes.

5.3. RT-qPCR

Es va treballar amb models PDX dels mateixos tumors que en immunohistoquímica: rabdomiosarcomes, neuroblastomes, Ewing sarcomes i osteosarcomes. També es va estudiar un xenoempelt de la línia cel·lular Rh30 i cèl·lules Rh30 cultivades en medi amb glucosa i en medi sense glucosa.

5.3.1 Cultiu de cèl·lules¹

MATERIAL:

- Pipetes 10 mL, flascó T75, aparell per realitzar el bany maria, tubs Falcon 75 mL, centrífuga, DMSO, microscopi, tripsina, blau de tripà, càmera de Neubauer, eppendorfs, plaques de petri, DMSO, PBS, tripsina.

PROCEDIMENT:

Sembra:

1. Bany maria del medi de cultiu (RPMI) . És necessari que estigui a 37 °C per tal d'entrar en contacte amb les cèl·lules.
2. Treure les cèl·lules del nitrogen líquid i descongelar-les amb aigua calenta.
3. Amb una pipeta passar les cèl·lules a un tub Falcon.
4. Purificar les cèl·lules del criopreservant (DMSO), que té un cert grau de toxicitat, amb PBS.
5. Centrifugar la mescla.
6. Obtenció del pellet, les cèl·lules. Extreure fent el buit el PBS.
7. Afegir 10 mL de medi de cultiu dins el tub Falcon, pipetejar i afegir-hi 10 mL més de RPMI.
8. Retolar un flascó T75, tenint e compte el nombre de vegades que s'han tripsinitzat les cèl·lules. (En aquest cas no estava clar el *passé* de les cèl·lules descongelades i per tant s'ha nombrat el *passé* com a "px+1")
9. En el flascó introduir-hi les cèl·lules amb el medi de cultiu evitant les cèl·lules mortes que es veuen a simple vista.
10. Desar el flascó a incubadora (37 graus, 5% CO₂)

¹ Tots els procediments que impliquin la manipulació de cèl·lules s'han de realitzar dins d'una campana de fluxe laminar per tal de mantenir l'esterilitat.

Tripsinització/expansió

1. Escalfar el medi al bany maria, per tal de que estigui a 37 °C.
2. Retirar el medi antic de dins del flascó amb una pipeta de 10 mL. Les cèl·lules estan adherides a la placa.
3. Netejar la monocapa cel·lular amb 7 mL de PBS i finalment retirar-lo. (Fig. 15)



Figura 15. Eliminació del PBS amb una pipeta de 10 mL.

4. Afegir 4,5 mL de tripsina² i incubar durant 3-4 min. (Fig. 16)



Figura 16. Sembrada de cèl·lules en 4,5 mL de tripsina.

5. Comprovar que les cèl·lules s'han desenganxat al microscopi.
6. Afegir PBS al flascó i disgregar la suspensió fent diverses aspiracions i eliminacions amb la pipeta.



Figura 17. Centrifuga compensada amb dos tubs Falcon.

² La tripsina trenca els enllaços que formen les cèl·lules amb la placa i per tant, les desenganxa.

7. Transferir la suspensió en un tub Falcon de 15 mL.
8. Centrifugar durant 3 min a 400 rcf (sempre centrifugar amb la centrífuga compensada, en aquest cas és necessari un segon flascó). (Fig. 17) Observació del pellet de cèl·lules i el sobrenedant de PBS i tripsina.
9. Descartar el sobrenedant amb una pipeta.
10. Resuspendre el pellet amb 1 mL de medi sense glucosa, per tal de que les cèl·lules que es cultiven en un medi sense glucosa no contaminin el medi després amb glucosa.
11. Fer el recompte cel·lular:
 - a. En un eppendorf afegir 25 μ L de la suspensió cel·lular i 25 μ L de Trypan blue (blau de tripà), que tnyirà de color blau les cèl·lules mortes i deixarà brillants les vives. (Fig. 18)



Figura 18. Blau de Tripà

- b. Contar el número de cèl·lules vives totals a la càmera de Neubauer:
 - i. Posar 10 μ L de la mescla damunt la càmera de NB. (Fig. 19)
 - ii. Cobrir la mostra amb un cobreobjectes.
 - iii. Recompte al microscopi (Fig. 20)

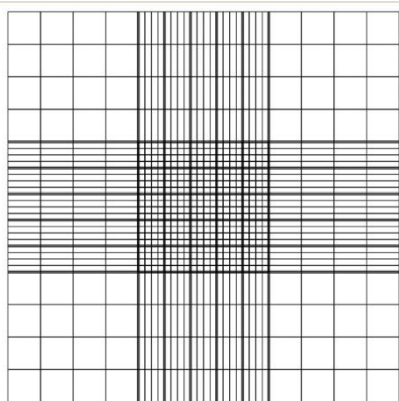


Figura 19. Esquema càmera de Neubauer. Per fer el recompte de cèl·lules. Es compten les cèl·lules que hi ha en els quatre quadrats 4x4 de les cantonades..

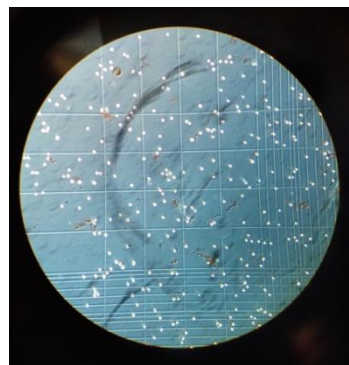


Figura 20. Visualització d'un quadrat 4x4 amb presència de cèl·lules brillants a través del microscopi.

Número total de cèl·lules en els quatre quadrats 4x4: $92+48+59+115=314$

- c. Dividir per 4 i multiplicar pel el factor de dilució (1:2) i el factor de la càmera de NB (10^4), obtenint així el número de cèl·lules per mL.

$314/4 = 78,5$ $78,5 \times 2 = 157$ $157 \times 10^4 = 1.570.000$ cèl·lules/mL

12. En dos eppendorfs passar-hi 500 μ L a cada un de sembra.
13. En dos Falcons, un omplir-lo amb 45 mL de medi sense glucosa i l'altre amb 45 mL de medi amb glucosa.
14. Passar el volum dels eppendorfs un en cada tub Falcon.
15. En sis plaques de petri grans; tres sembrar-les amb 15 mL de cèl·lules amb medi sense glucosa, i les altres tres amb 15 mL de cèl·lules medi amb glucosa. Un cultiu de cada tipus de medi es deixarà a l'incubador 24h abans de l'extracció de RNA de les cèl·lules, un altre hi estarà 48h i el tercer es guardarà per a estudis posteriors.

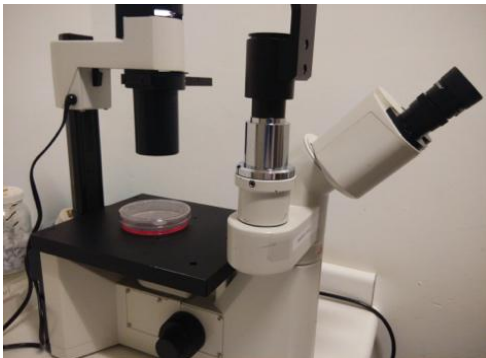


Figura 21. Visualització d'un quadrat 4x4 amb presència de cèl·lules brillants a través del microscopi.

16. Revisar les plaques al microscopi. (Fig. 21)
17. Desar les plaques a la incubadora a 37 graus, 5% de CO_2 .

5.3.2. Extracció d'RNA³

MATERIAL:

- Xeringues, Tubs de rosca, Trizol, Cloroform, Isopropanol o 2-propanol, Pipetes pasteur, Cell-scraper, Pipeta 10 mL

PROCEDIMENT:

Cèl·lules

a) Retirar amb una pipeta pasteur una part del medi de cultiu de les plaques de petri amb glucosa i sense fent el buit.

b) Amb un cell-scraper desenganxar les cèl·lules de la placa.

c) Amb una pipeta de 10 mL passar la sembra en un falcon de 15 mL.

d) Centrifugar 3 minuts. Obtenció del pellet de cèl·lules.

e) Descartar el medi

f) Resuspendre les cèl·lules amb 1 mL de trizol (Fig. 22).

Teixits

a) Amb una xeringa disgregar les mostres encara dins dels eppendorfs resuspenent-les en 1 mL de Trizol (Fig. 22).

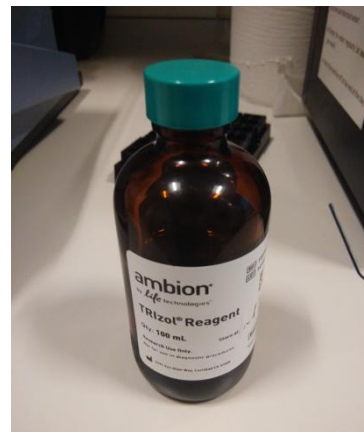


Figura 22. Trizol Reagent. Evita la desnaturalització de l'RNA. Mentre es manipuli el Trizol és indispensable treballar dins la campana de gasos degut a la seva toxicitat.

1. Passar el disgregat dins de tubs de rosca i afegir-i 200 µL de cloroform (Fig. 23), que reten les cadenes de RNA i DNA. Tot seguit fer un vòrtex (Fig. 24)

³ L'RNA no es pot descongelar, perquè és molt inestable i es degrada amb facilitat, és molt important que mentre no es treballi amb les mostres desar-les dins del gel.

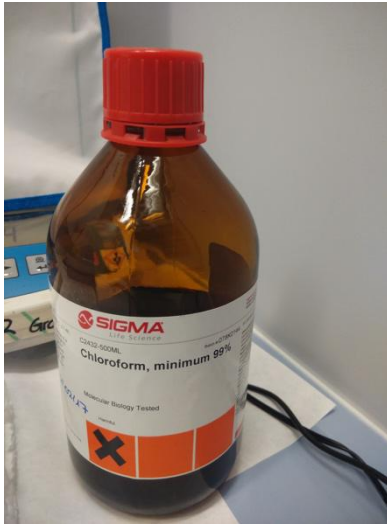


Figura 23. Cloroform.



Figura 24. Homogenitzar la mescla amb un Vortex

2. Posar a refredar la mostra durant 5 min.
3. Centrifugar els tubs 10 min a 4 °C a 12000 rpm. Després de la centrifugació es poden observar tres capes, a la part superior hi ha el cloroform amb l'RNA, que s'anomena fase aquosa, la del mig és una fina capa de proteïnes, que s'anomena interfase, i la inferior correspon al trizol, que es denomina com a fase fenòlica. (Fig. 25)



Figura 25. Representació esquemàtica de les tres fases diferenciades després de la centrifugació.

4. Mentrestant, retolar tubs de rosca i omplir-los amb 500 µL de isopropanol.
5. Traspasar la fase aquosa, en els tubs de rosca amb 500 µL de isopropanol. Fer un Vortex.
6. Centrifugar 10 min a 4 °C a 12000 rpm. (Fig. 26)



Figura 26. Obtenció del pellet després de centrifugar.

7. Descartar l'isopropanol.
8. Resuspendre el pellet de RNA amb 1 mL d'etanol 70%.
9. Centrifugar 5 min a 4 °C a 12000 rpm.
10. Treure l'etanol amb una pipeta.
11. Centrifugar un spin.
12. Eliminar la resta de líquid que hagi pogut quedar amb l'ajut d'una pipeta.
13. Resuspendre el pellet amb aigua MilliQ. El volum depèn de la mida del pellet. Deixar-ho en gel.
14. Per últim és necessari determinar la concentració d'RNA que hi ha en cada mostra per després ser exactes en fer la dilució per la qPCR. Per fer-ho s'utilitza el programa de lectura ND-1000 V3.5.2, anomenat Nano-Drop (Fig. 27), que també llegeix la contaminació per proteïnes i la contaminació per alcohols que pugui tenir la mostra. La contaminació per proteïnes s'anomena 260-280 i la contaminació per alcohols s'anomena 260-230, els valors d'aquestes s'han de trobar entre 1,80 i 2,20 per a acceptar com a vàlida la concentració que ens indiqui el programa i per què es pugui utilitzar la mostra en els passos posteriors.



Figura 27. Espectofotòmetre on s'ha de carregar la mostra per ser llegida pel programa ND-1000 V3.5.2

5.3.3. RT-qPCR

Aquesta fase està dividida en dues parts, la primera equival a la transcripció inversa o RT (*reverse transcription*), en la qual les cadenes de RNA esdevenen DNA monocatenari complementari (cDNA). En la segona es duu a terme la PCR quantitativa. L'objectiu de la qPCR és determinar el nombre de cicles que han sigut necessaris per tal de que la màquina detecti l'expressió de DNA que procedeix de l'RNA que codifica, en aquest cas, per a GLUT-1 (Fig. 28). En cada cicle el gen diana s'amplifica, de manera que com més expressió hi hagi inicialment més ràpidament podrà ser reconegut, per tant, com menys cicles siguin necessaris més quantitat de RNA codificant per a GLUT-1 hi ha en la mostra en la concentració inicial. El recompte de cicles es duu a terme a temps real gràcies a la presència d'un reactiu que s'adhereix a les cadenes de DNA i els hi proveeix fluorescència^[57].

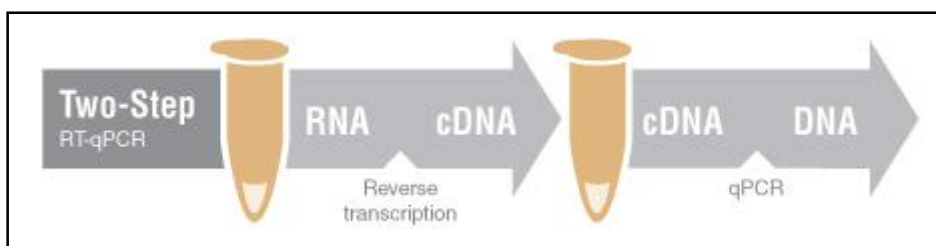


Figura 28. Esquema del procés de la RT-qPCR.

5.3.3.1. Transcripció inversa (RT)

MATERIAL:

- Microtubs, tubs de rosca, aigua MilliQ, eppendorf, Vortex, termociclador, pipeta de 100 µL.

PROCEDIMENT:

1. Preparar les dilucions de cada mostra de RNA a concentració 0,2 µg/µL. Afegir aigua en 5 µL d'RNA. El volum d'aigua necessari s'obté amb la fórmula següent:

$$\frac{5 \times []}{0,2} - 5 = X \mu\text{L H}_2\text{O}$$

*[] : Concentració que ha donat per cada mostra en el programa Nano-drop.

2. Posar 5 µL de solució de cada mostra en microtubs diferents.
3. Preparar el MIX RT, reactius que duren a terme la transcripció inversa.

Reactiu	Volum (µL)
Aigua Milli Q	7,5

Buffer 5x RT	4
dNTPs	2
Random Hexàmers	1
M-MLV	0,5

Els valor de la taula són els necessaris per a una sola mostra. Preparar en un eppendorf el volum total necessari de reactius pel nombre total de mostres. Un cop feta la mescla, fer un Vortex. Llavors, en cada microtub, que conté mostra, afegir-hi 15 µL, que és la suma del volum de tots els reactius per una sola mostra.

4. Introduir els microtubs al termociclador. Iniciar els cicles.

Fases del cicle	Temps (min)	Temperatura (°C)
Fase 1	10	25
Fase 2	45	42
Fase 3	30	99

5. Un cop acabada la RT resuspendre el DNA amb 80 µL d'aigua, amb l'ajut d'una pipeta, de manera que s'obtingui una concentració de 10 ng/µL.

4.3.3.2. qPCR

MATERIAL:

- Eppendorfs, Vortex, aigua MilliQ, SYBR Green, Primer Forward, Primer Reverse, trips de vuit peuet, pipetes, termociclador a temps real.

PROCEDIMENT:

1. Preparar el MIX amb el volum total de reactius i primers que seran necessaris per a la PCR en un eppendorf. S'han de fer tantes mescles com gens es vulguin amplificar, ja que cada primer és específic per cada gen. En el nostre cas els gens d'interès són Glut1 i Glut4. Sigui quin sigui el gen d'interès, però, sempre s'ha d'amplificar paral·lelament un gen de control, el TBP, que ens permetrà identificar si els resultats són vàlids o no ho són en cada mostra. S'ha de tenir en compte també per calcular el volum total que es posaran dos exemplars de la mostra per gen a amplificar. Després d'afegir tots els reactius fer un Vortex.

Reactiu	Volum (μL)
Aigua MilliQ	4,9
SYBR Green ⁴	7,5
Primer Forward	0,3
Primer Reverse	0,3

2. En trips de vuit peuets introduir-hi els MIX corresponents amb la mostra desitjada. 13 μL de reactiu (amb els primers determinats) i 2 μL de mostra de DNA obtingut anteriorment a la RT. Un dels peuets es carrega només amb el mix, sense cDNA (NTC).
3. Un cop plenes totes les tires, tapar-les i centrifugar un spin.
4. Introduir la placa en un termociclador a temps real, que, a través d'un ordinador, es programa indicant-li la posició de les mostres en la placa.
5. Obtenció dels resultats de la qPCR.

4.3.3.3. Processament de dades i càlcul de l'expressió de RNA

Un cop finalitzada la qPCR s'obté un Excel amb el nombre de cicles que ha necessitat la màquina per tal de detectar les cadenes de DNA desitjades, és a dir, per identificar fluorescència. El número de cicle en què es reconeix el gen diana s'anomena Ct (Threshold cycle).

El Ct del gen TBP de cada mostra s'utilitza com a gen de referència, ens indica de l'estat de la mostra, ja que al ser el mateix gen en totes, el nombre de cicle de detecció sempre hauria de ser molt semblant. Una gran variació de l'expressió d'aquest gen entre mostres ens permetria identificar les que no estan en bon estat, la qual cosa podria ser conseqüència d'un mal processament de la mostra o bé d'una contaminació d'aquesta.

L'expressió de GLUT-1 i GLUT-4 en els teixits i cèl·lules es calcula mitjançant el mètode $2^{-\text{ddCt}}$:

⁴ El SYBR Green s'adhereix a les cadenes de DNA i emet fluorescència.

1. Com que es van carregar dos exemplars de cada mostra per cada gen a analitzar, per tant, dos pel TBP i dos pel GLUT-1, s'han obtingut dos resultats. Els del gen diana, així com els del TBP, entre ells, també han de tenir valors propers per poder-los qualificar com a vàlids. Dins l'Excel amb les dades s'obté per defecte la mitjana dels dos exemplars de la mateixa mostra per cada gen. Per fer els càlculs corresponents és necessària la dels gens control. Es fa la resta entre el primer valor de la primera mostra i la mitjana dels Ct del gen control d'aquella mostra. Després es resta el segon valor també amb la mitjana obtinguda dels valors del gen control, i així successivament amb cadascuna de les mostres. La diferència resultant s'anomena dCt (Ct diana - mCt referència = dCt). És important tenir dos dCt per cada mostra per llavors poder fer la desviació estàndard.
2. En la primera qPCR realitzada, per exemple, la mostra control era el fetge i per tant els resultats interessa obtenir-los en comparativa a aquest. Es fa la mitjana dels dCt de la mostra "liver". Es resta després cada dCt amb la mitjana dels dCt de "liver". Els valors que s'obtinguin s'anomenen ddCt.
3. Finalment es calcula l'expressió de cada mostra utilitzant el mètode 2^{-ddCt} . Elevant a 2 l'oposat de la diferència abans calculada.

5.4. HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY)

Es va treballar amb un gran nombre de mostres, ja que a cada ratolí, prèviament infectat per la línia cel·lular Rh30, tractat després amb dasatinib, se li va extreure el ronyó, el fetge, la melsa, el cervell i el múscul, per estudis anteriors també se'ls va extreure teixit tumoral. Es va administrar de tres maneres diferents el fàrmac als ratolins; alguns van ingerir per via oral fàrmac dissolt en àcid, i altres per via intravenosa micel·les glicosilades o no glicosilades.

L'HPLC es compon de dues fases, la fase mòbil i la fase estacionària. La fase estacionària és una columna amb un revestiment de petites partícules arrodonides a través de la qual, mitjançant el bombament de líquid, és a dir, de la fase mòbil, el compost passa a través seu. Les diferents molècules que formen el compost travessen la columna a diferents

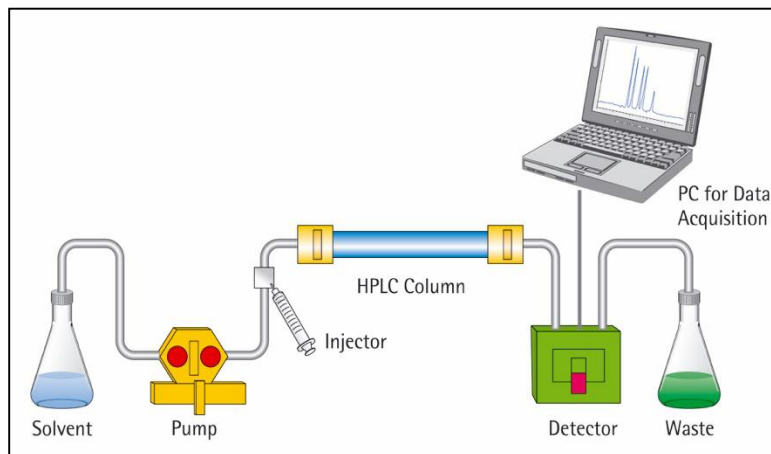


Figura 29. Esquema del funcionament de l'HPLC.

velocitats, depenent de l'afinitat que tinguin amb la fase mòbil i amb el revestiment de la columna. Quan les molècules a analitzar surten de la columna, el detector emet una longitud d'ona que excita les partícules i les detecta^[58]. (Fig.29)

5.4.1. Preparació de les mostres

MATERIAL:

- Eppendorfs, espàtula, boletes de metall, aigua MilliQ, tubs Falcon, Vortex, pipetes de diferents volums, aigua MilliQ, centrífuga.

PROCEDIMENT:

1. Pesar les mostres i passar-les en eppendorfs retolats.
2. En cada eppendorf introduir-hi boletes de metall mitjançant una espàtula, aproximadament la mateixa quantitat que de teixit. (Fig.30)



Figura 30. Introducció de la mateixa quantitat de boletes que de teixit dins dels eppendorfs amb els teixits.

3. Afegir-hi a cadascun d'ells 300 μL d'aigua Milli Q.
4. Disgregar els teixits mitjançant un homogeneïtzador de teixits. (Fig. 31)
5. Afegir l'aigua restant en cada eppendorf utilitzant una pipeta de 1000 μL . Si la quantitat d'aigua és major a 1000 μL , degut a la capacitat de l'eppendorf, utilitzar tubs Falcon traslladant-hi el disgregat (Fig.32). La quantitat d'aigua necessària és el pes de cada mostra multiplicat per 1000.



Figura 31. Màquina homogeneïtzadora de teixits.

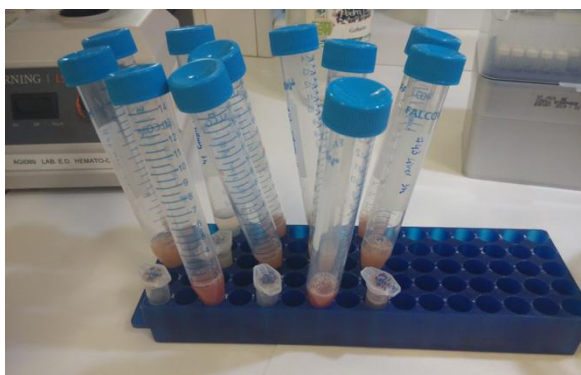


Figura 32. Homogenats dels diferents teixits diluïts en la quantitat d'aigua corresponen.

6. Preparar un tub de rosca (retolar-los abans) amb 400 μL de metanol per cada mostra i deixar-los en gel sec.
7. Homogeneïtzar la mescla, ja que s'hi haurà afegit aigua amb el Vortex.
8. Dins dels tubs amb metanol fred afegir-hi 100 μL de una mostra diferent a cadascun.

9. Homogeneïtzar la nova mescla en el Vortex.
10. Centrifugar els tubs de rosca a la centrífuga a 4 graus i 12000 rpm durant 10 minuts. Important situar-los en equilibri dins la màquina.
11. Obtenció del sobrenedant i el pellet en dues fases separades.

5.4.2. Anàlisi de les mostres per HPLC

MATERIAL:

- HPLC, dasatinib, DMSO, metanol.

PROCEDIMENT:

1. Estabilitzar la màquina (Fig. 33), línia de la pressió ha d'estar horitzontal. Augmentar la concentració progressivament fins a 0,8 mL.

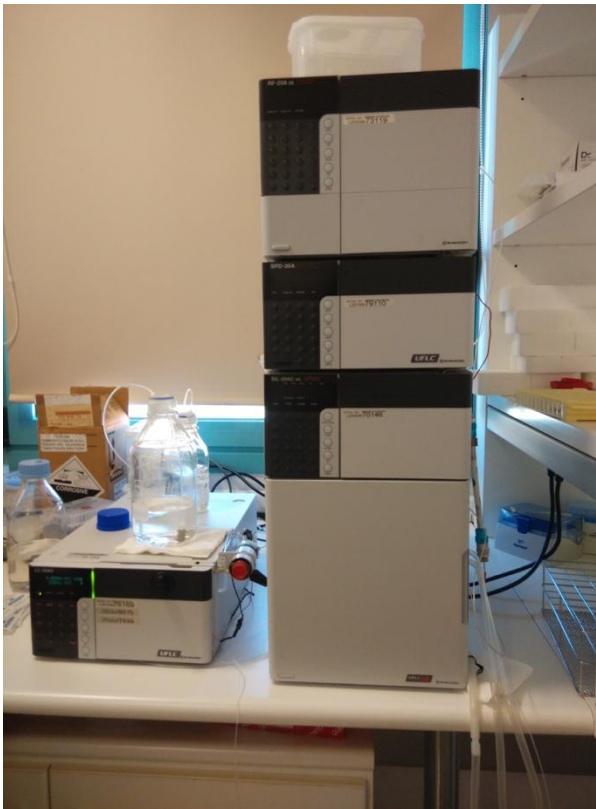


Figura 33. HPLC. A la dreta de la imatge s'hi aprecia la columna la revestiment i en pots de vidre hi ha la fase

2. Crear la recta patró:
 - a. Homogeneïtzar un tumor per a la recta patró amb el mateix procediment que s'ha utilitzat per homogeneïtzar els teixits.

- b. Fer dissolucions de dasatinib⁵ en eppendorfs:
 - i. Pre WS1: 500000 ng/mL, 10 µL de dasatinib en 90 µL de DMSO
 - ii. Pre WS2: 50000 ng/mL, 10 µL de Pre WS1 en 90 µL de DMSO
 - iii. Pre WS3: 5000 ng/mL, 10 µL de Pre WS2 en 90 µL de DMSO
 - iv. Pre WS4: 500 ng/mL, 10 µL de Pre WS3 en 90 µL de DMSO (no utilitzada)
 - c. Preparar les working solutions (WS)
 - i. WS1: 100 ng/mL, 2 µL de Pre WS3 i 98 µL de DMSO
 - ii. WS2: 250 ng/mL, 5 µL de Pre WS3 i 95 µL de DMSO
 - iii. WS3: 500 ng/mL, 10 µL de Pre WS3 i 90 µL de DMSO
 - iv. WS4: 1000 ng/mL, 2 µL de Pre WS2 i 98 µL de DMSO
 - v. WS5: 2500 ng/mL, 5 µL de Pre WS2 i 95 µL de DMSO
 - d. Preparar les solucions amb concentració coneguda que s'usaran per a la formació de la recta patró:
 - i. Solució 1: 10 ng/g, 99 µL homogeneïtzat i 1 µL WS1
 - ii. Solució 2: 25 ng/g, 99 µL homogeneïtzat i 1 µL WS2
 - iii. Solució 3: 50 ng/g, 99 µL homogeneïtzat i 1 µL WS3
 - iv. Solució 4: 100 ng/g, 99 µL homogeneïtzat i 1 µL WS4
 - v. Solució 5: 250 ng/g, 99 µL homogeneïtzat i 1 µL WS5
 - vi. Blank: sense fàrmac⁶
 - e. Afegir 400 µL de metanol a cadascun dels sis tubs de rosca.
 - f. Centrifugar.
 - g. Introduir 60 µL de cada dissolució en els tubs.
 - h. Anàlisi de les mostres i creació de la recta patró, a partir de la qual la màquina podrà aproximar les concentracions de dasatinib de les mostres punxades.
3. Anàlisi de les mostres homogeneïtzades prèviament.
 4. Dissolució 1:10 i 1:100 de les mostres dels ratolins tractats per via oral (alta concentració de fàrmac i superen el valor màxim de la recta patró).
 5. Anàlisi de les mostres diluïdes.
 6. Integració de pics, és a dir, des de l'ordinador indicar l'àrea del pic obtingut que s'hagi de valorar, per obtenir posteriorment la concentració de dasatinib que hi havia en cada mostra. (Fig. 34)

⁵ Després d'afegir nous components sempre és necessari realitzar un Vortex.

⁶ Al punxar la dissolució, s'obtindrà un pic petit que llavors s'haurà de restar als pics de les altres mostres.

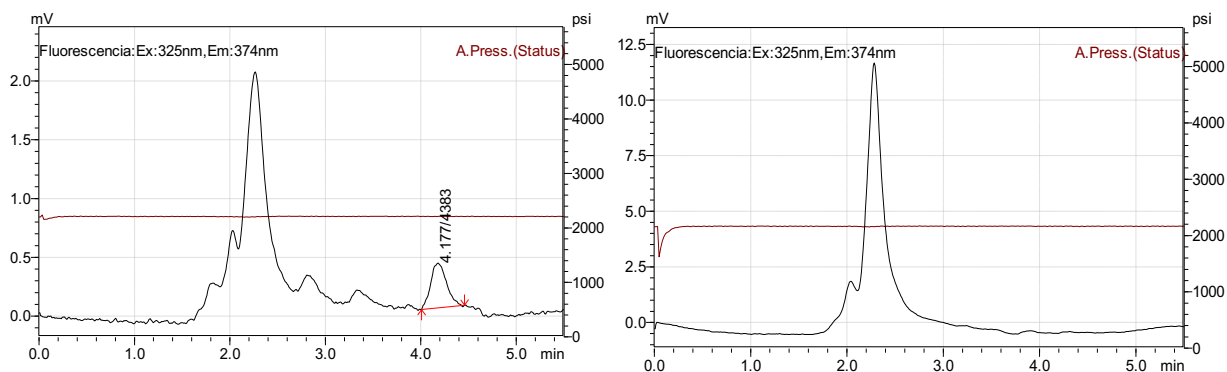


Figura 34. A la gràfica de l'esquerra hi ha hagut pic al minut 4'307, és a dir, s'ha detectat concentració de dasatiib. A la gràfica de l'esquerra ni hi ha hagut pic al minut 4'307, per tant no s'ha detectat concentració de dasatinib. Als pics més grans corresponen al fronts de la mostra.

7. En el cas de les mostres diluïdes, fer els càlculs que s'han fet per diluir-les a la inversa per determinar-ne la concentració.
8. Elaboració d'un Excel amb totes les dades.

A partir de la recta patró, que està elaborada en funció de les concentracions conegudes i l'àrea de la gràfica que ocupen, el programa pot estimar, segons l'àrea del pic detectat de les mostres amb dasatinib amb concentració desconeguda, quina és la concentració del fàrmac en cadascuna de les mostres que es punxin.

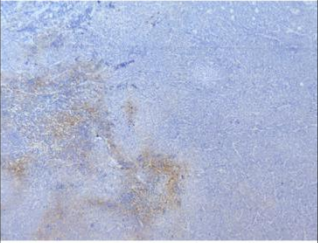
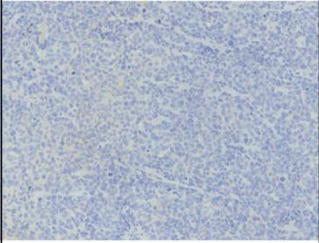
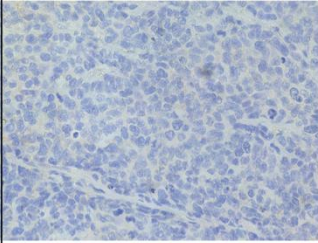
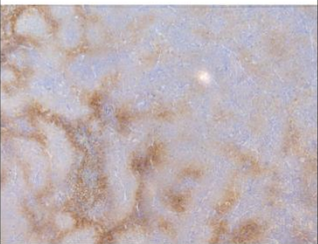
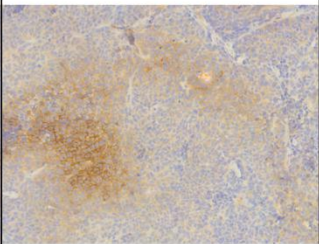
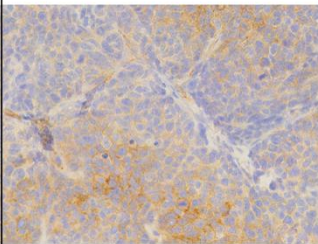
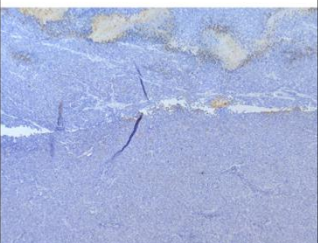
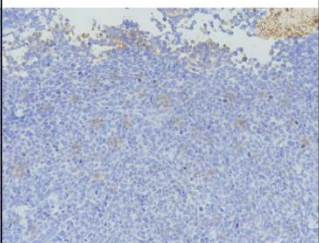
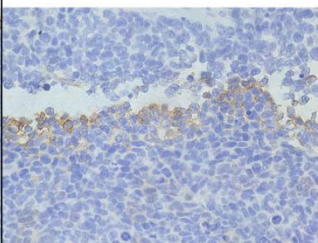
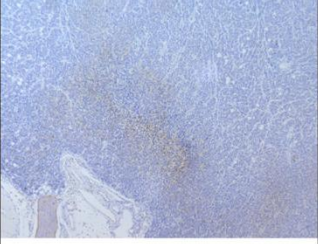
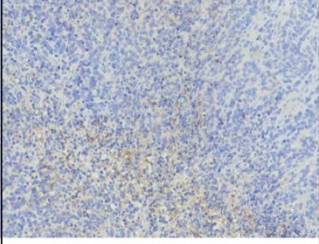
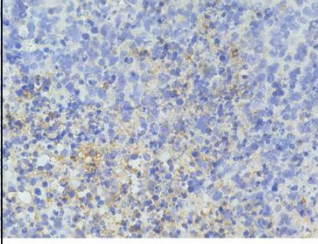
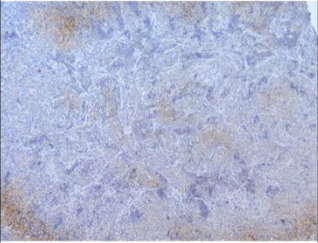
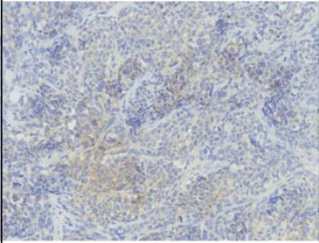
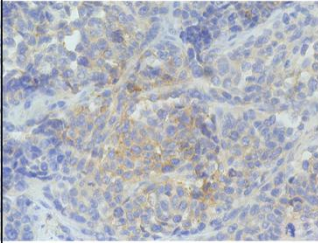
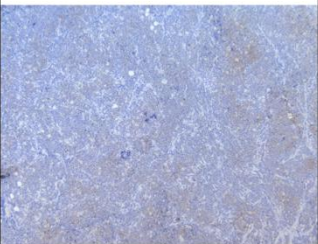
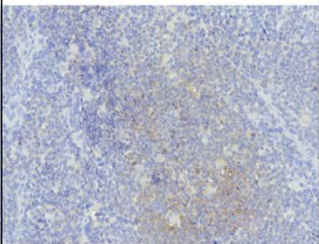
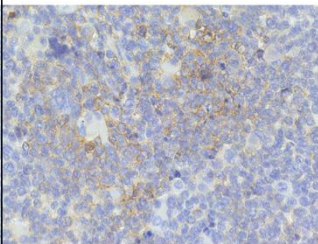
6. RESULTATS

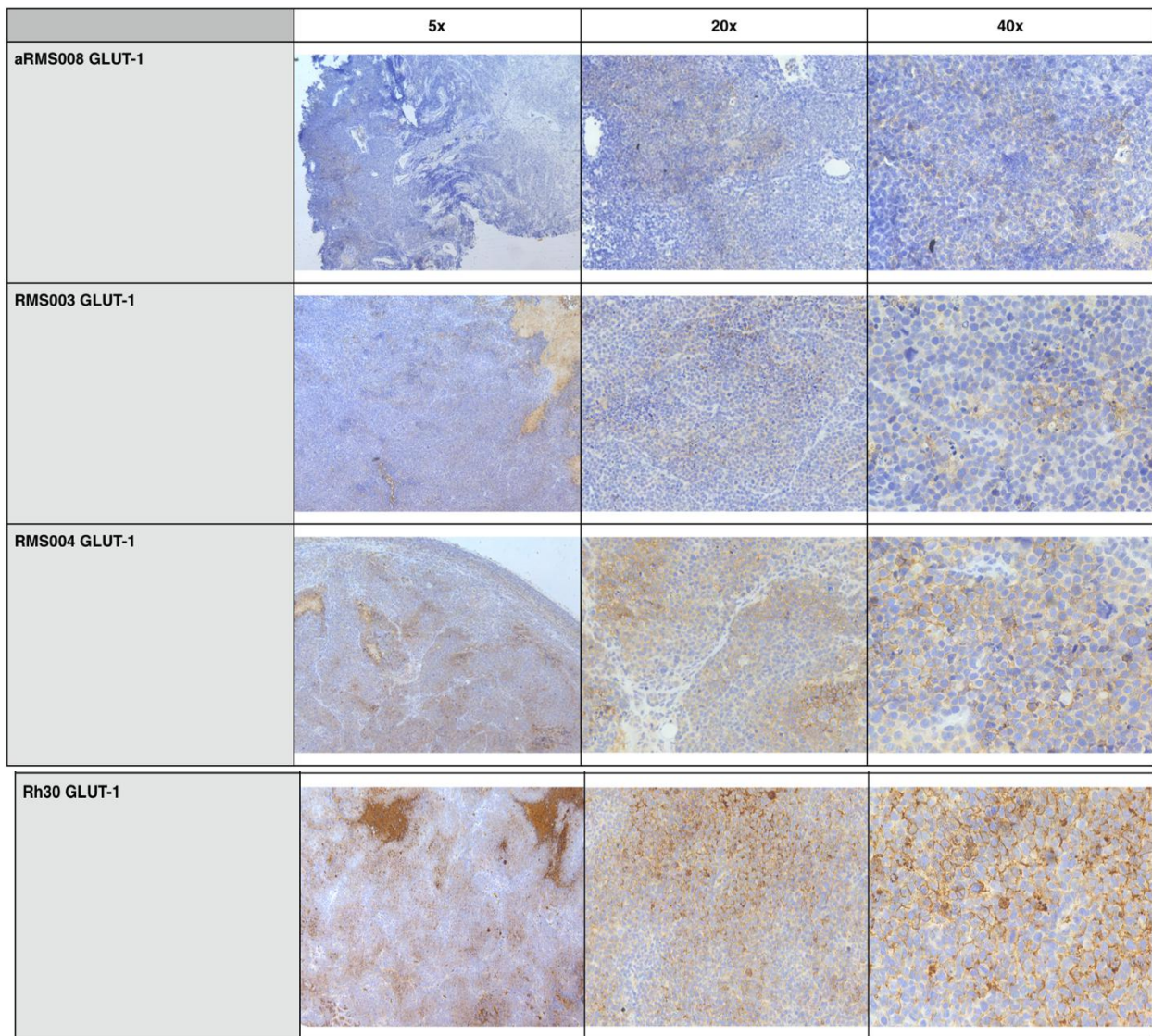
6.1. IMMUNOHISTOQUÍMICA

S'esperava que els controls negatius no obtinguessin cap mena de senyal, ja que no se'ls va aplicar l'anticòs primari, de manera que l'anticòs secundari no pogués reaccionar. Quan el procediment es realitza correctament el marcatge és de color marró, i com ja se sap, gràcies a la literatura, GLUT-1 en els tumors generalment actua com a proteïna de membrana, per tant s'esperava que el marcatge se situés a l'entorn de la cèl·lula. El nucli de la qual ja haurà estat prèviament tenyit amb hematoxilina, de color blau, de manera que es pugui distingir amb claredat. La membrana plasmàtica degut a la tinció del nucli, per contrast, també hauria d'insinuar-se.

S'han distribuït els resultats en tres taules diferents, la primera correspon als teixits control (el fetge, el ronyó i el carcinoma de mama), la segona són sarcomes (Ewing sarcoma i osteosarcoma) i neuroblastomes, i finalment la última són exclusivament rabdomiosarcomes, la qual cosa inclou els rabdomiosarcomes, els rabdomiosarcomes alveolars i la línia cel·lular Rh30.

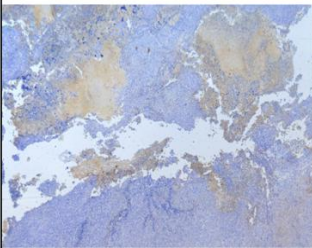
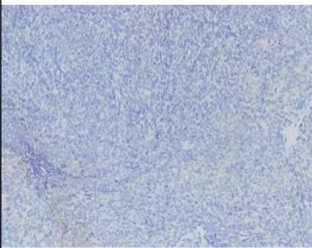
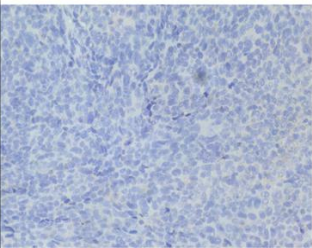


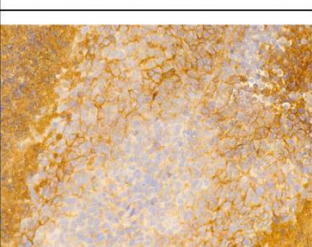
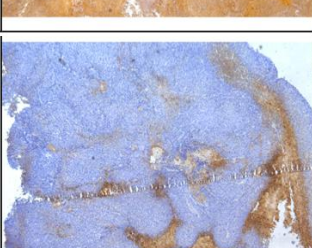
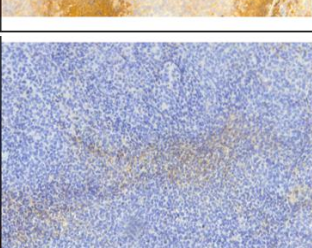
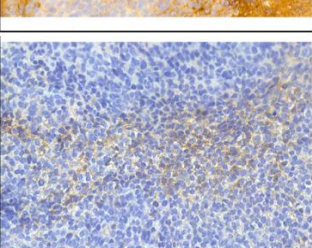
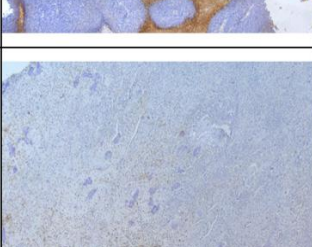
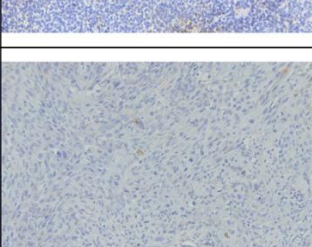
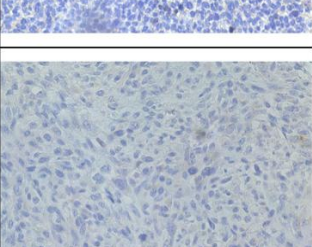
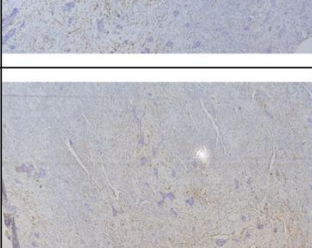
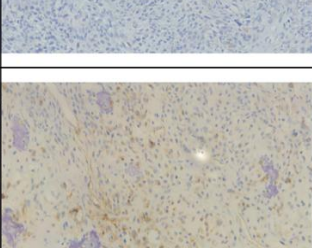
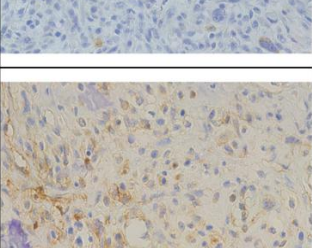
La primera columna d'imatges són fotografies fetes a 5 augments al microscopi, per tal de donar una visió general del teixit, la segona a 20, i la última a 40, que permet identificar detalls amb precisió.

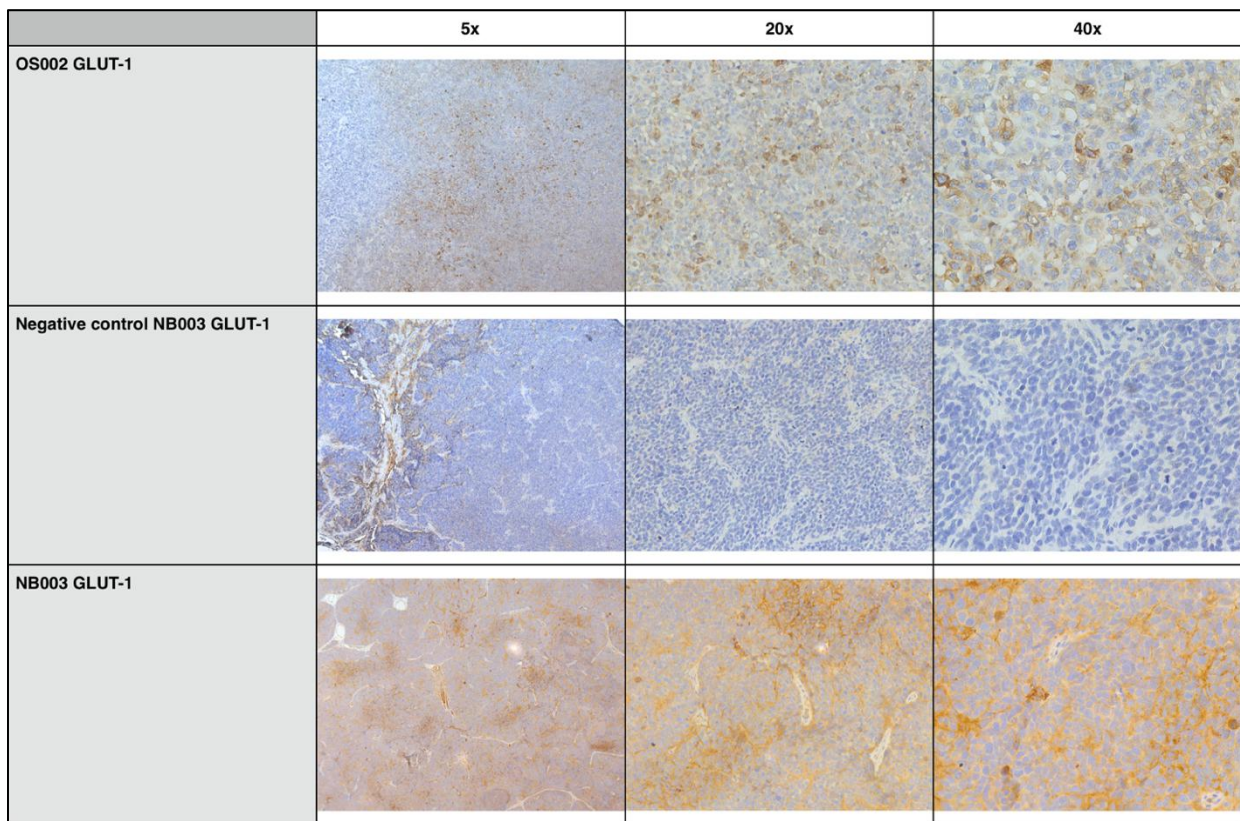
	5x	20x	40x
Negative control aRMS001 GLUT-1			
aRMS001 GLUT-1			
aRMS002 GLUT-1			
aRMS005 GLUT-1			
aRMS006 GLUT-1			
aRMS007 GLUT-1			



Taula 1. Imatges al microscopi a 5x, 20x i 40x dels talls processats de models PDX de rabdomyosarcoma i d'un xenoempelt d'Rh30 amb els corresponents controls negatius.

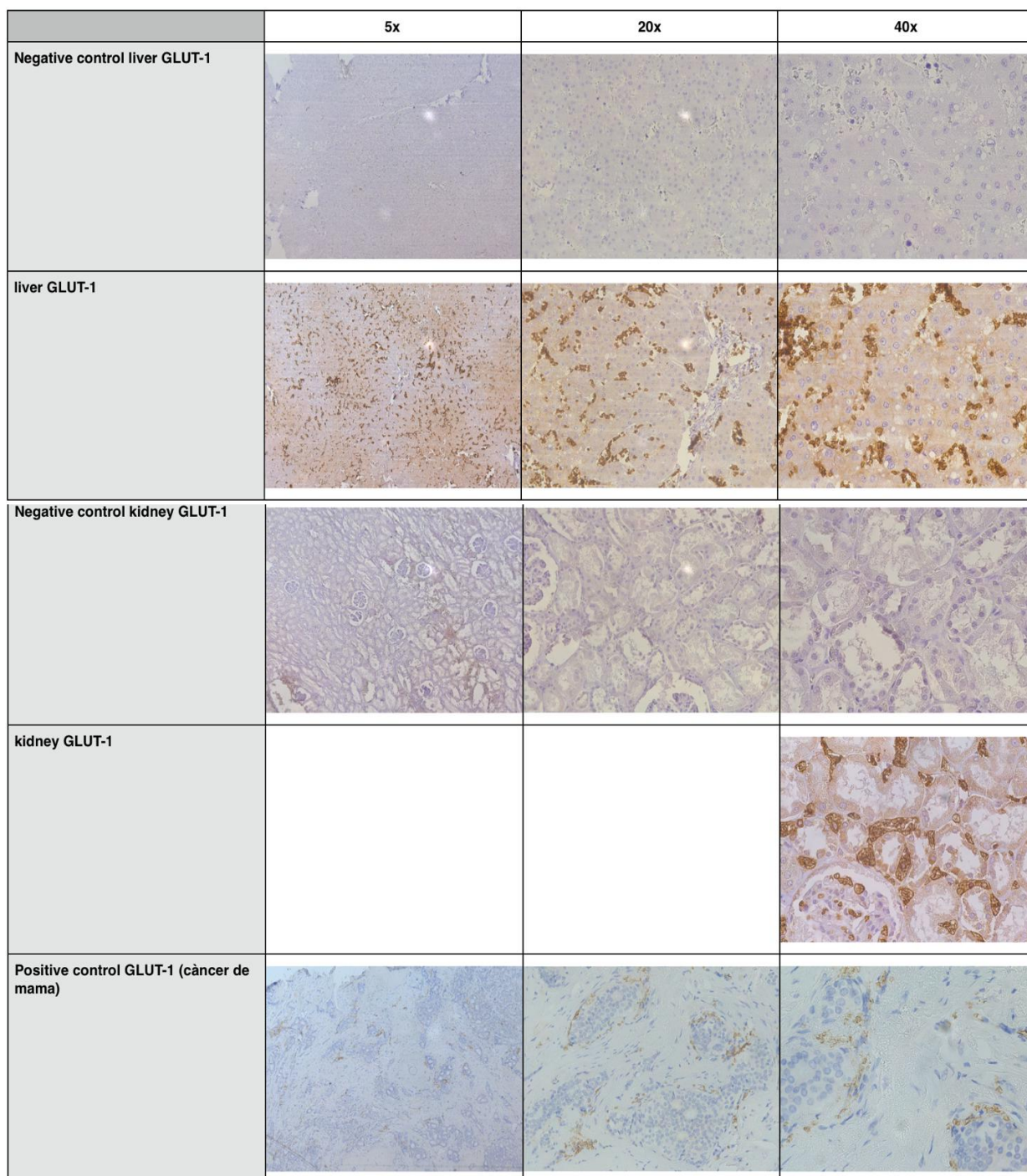
En aquesta taula, destinada únicament a rabdomyosarcomes, s'hi pot observar una gran varietat de resultats respecte a la l'expressió del transportador GLUT-1. En el xenoempelt aRMS001 el marcatge es troba bastant definit en les membranes plasmàtiques i en gran quantitat, tot i així, en la imatge de 40x s'hi aprecien algunes zones difuses. Les mostres aRMS002, aRMS005, aRMS006, aRMS007 i aRMS008 han adquirit una tinció molt semblant, s'han tenyit en poques zones però queda clar que la presència de GLUT-1 es manifesta en la membrana de la cèl·lula. RMS003 tampoc no s'ha tenyit gaire, però en canvi en RMS004 se n'ha obtingut una tinció molt definida, també a les membranes cel·lulars, i en una quantitat elevada. La línia cel·lular Rh30 és la mostra obtinguda amb més marcatge, GLUT-1 es troba àmpliament expressat en les seves cèl·lules. També cal destacar el marcatge en les zones necròtiques, com es veu sobretot en RMS003 i també força en RMS004 i aRMS002, en les imatges de 5x ja que faciliten una àmplia visió general de la mostra.

	5x	20x	40x
Negative control ES001 GLUT-1			
ES001 GLUT-1			
ES006 GLUT-1			
Negative control OS001 GLUT-1			
OS001 GLUT-1			



Taula 2. Imatges al microscopi a 5x, 20x i 40x dels talls processats de models PDX d'Ewing sarcoma, osteosarcoma i neuroblastoma amb els corresponents controls negatius.

En les mostres d'Ewing sarcomes hi ha moltes zones necròtiques i totes estan altament marcades sobretot en ES001, fins i tot en el control negatiu en presència de necrosis algunes zones han quedat tenyides. ES001 ha obtingut una sobreexpressió de marcatge en comparació la resta de mostra. Tot i tenir molta necrosis, la qual cosa fa que la mostra ha quedat molt tenyida, les membranes de les cèl·lules, aparentment encara vives, han quedat perfectament marcades. Els osteosarcomes en general han obtingut una tinció molt més difusa que en la resta de tumors. En OS002 sembla com que hi hagués marcatge a l'interior d'algunes cèl·lules, però en poques es veu ben definit. Finalment els neuroblastomes. NB003 es troba totalment marcat, gairebé totes les cèl·lules tenen la membrana clarament tenyida. NB005 i NB007 tenen un marcatge bastant difús, tot i que sí que algunes membranes es veuen tenyides.



Taula 3. Imatges al microscopi a 5x, 20x i 40x dels talls processats de mostres de fetge, ronyó i càncer de mama i els seus corresponents controls negatius.

En el fetge no es veu un marcatge gaire definit, la tinció marró es troba en tota la cèl·lula, només en algunes zones sí que queda delimitada la membrana. Hi ha zones molt tenyides entre cèl·lules que no formen part del teixit en qüestió, són glòbuls vermells. Aquests també hi són presents en el tall de ronyó. En el ronyó el marcatge també és poc clar, ja que no s'identifiquen les membranes de les cèl·lules, i novament sembla que el citoplasma de la cèl·lula estigui també tenyit. L'última mostra d'aquesta primera taula correspon al carcinoma de mama, el control positiu, però sorprenentment no hi ha gairebé gens de tinció, i en les zones que sí que n'hi ha no es veu clar que envolti una cèl·lula.

6.2. RT-qPCR

Els primers resultats del segon experiment van ser les concentracions de RNA (ng/ μ L) i el grau de contaminació corresponent a cada mostra, obtingudes amb el programa ND-1000 V3.5.2. Es van fer dos anàlisis diferents, ja que es va haver d'esperar que passessin 48h després del cultiu de les cèl·lules cultivades en medi amb glucosa i sense glucosa per tal de poder extreure RNA de les cèl·lules.

Mostra	Concentració (ng/ μ L)	260/280	260/230
1. Rh30 48h -Glu	332,97	1,85	2,29
2. Rh30 48h +Glu	1849,20	1,92	2,32

Taula 4. Concentració de mRNA i contaminació per alcohols i proteïnes en les mostres de les cèl·lules de la línia cel·lular Rh30 cultivades durant 48h.

Mostra	Concentració (ng/ μ L)	260/280	260/230
1. HSJD-ARMS-006 (F2)	2263,36	1,80	2,28
2. HSJD-ARMS-001 (F3)	2468,16	1,90	2,11
3. HSJD-ARMS-007 (F1)	1238,83	1,93	2,20
4. HSJD-RMS-004 (F3)	1745,65	1,92	2,01
5. HSJD-NB-003 (F3)	1818,70	1,94	2,22
6. HSJD-NB-007 (F6)	920,27	1,92	2,28
7. HSJD-OS-002 (F1)	1398,95	1,93	2,27
8. +GLU 24h	78,60	1,80	1,65
9. -GLU 24h	180,62	1,82	1,12
10. HSJD-NB-005 (F13)+25	3147,04	1,90	1,85
11. Rh30	1545,66	1,90	2,26
12. Human liver	563,73	1,92	1,72
13. Human Lung	1283,84	1,95	1,85

Mostra	Concentració (ng/ μ L)	260/280	260/230
14. Human Spleen	1146,84	2,00	2,19

Taula 5. Concentració de mRNA i contaminació per alcohols i proteïnes en les mostres dels models PDX i de les cèl·lules de la línia cel·lular Rh30 cultivades durant 24h.

La mostra 10 (HSJD-NB-005 (F13)+25) de la primera taula es va haver de dissoldre amb 25 μ L d'aigua, degut a una excessiva concentració, tot i així encara era la mostra més concentrada. Les concentracions d'RNA de les cèl·lules analitzades després de 24h de cultivar-les, es troba en una concentració molt baixa i un grau de contaminació molt elevat, ja que els dos valors de 260/230, tant en "+Glu 24h" com en "-Glu 24h" estan molt per sota del llindar establert (1,8-2,2). Tot i la contaminació i la baixa concentració, es va seguir amb normalitat amb els passos següents del procés, ja que es disposava de poca mostra. En la resta de mostres, la contaminació per alcohols i per proteïnes entre dins dels límits, o bé els sobrepassa o es troba lleugerament per sota, la qual cosa es va negligir.

En la segona taula es pot apreciar que l'RNA de les cèl·lules cultivades durant 48h, a diferència del de les cèl·lules cultivades durant només 24h, es troba en perfecte estat, gens contaminat, i en una concentració considerable.

Les grans diferències que es poden observar en les diferents concentracions obtingudes no suposa un problema ja que prèviament a la RT s'igualen totes les concentracions per tal d'aconseguir que totes les mostres es trobessin en les mateixes condicions i obtenir uns resultats el màxim d'acurats possible.

Seguidament es va fer la transcripció inversa i finalment es van dur a terme les qPCR. Es van realitzar dues qPCR per analitzar l'expressió del cDNA diana; una pels teixits i una segona exclusiva per a les cèl·lules. Una vegada finalitzades es van obtenir dues taules amb valors, a partir de les quals es va fer el càlcul de l'expressió d'RNA de cadascuna de les mostres. Un cop calculada l'expressió es van dibuixar dues gràfiques, també, una pel GLUT-1 en teixits i una altra per les cèl·lules.

Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD	dCt	ddCt (LIVER)	Expression
ARMS1	GLUT1		28,41		TBP	22,40	22,87	0,66	TBP	22,40	22,87	0,66	5,54	-1,49	2,80
ARMS1	GLUT1	Undetermined	28,41		TBP	23,34	22,87	0,66	TBP	23,34	22,87	0,66			
ARMS2	GLUT1		25,62	0,10	TBP	20,43	20,37	0,09	TBP	20,43	20,37	0,09	5,25	-1,78	3,43
ARMS2	GLUT1		25,76	0,10	TBP	20,30	20,37	0,09	TBP	20,30	20,37	0,09	5,39	-1,64	3,12
ARMS6	GLUT1		29,45	0,26	TBP	24,16	24,13	0,04	TBP	24,16	24,13	0,04	5,32	-1,71	3,27
ARMS6	GLUT1		29,83	0,26	TBP	24,11	24,13	0,04	TBP	24,11	24,13	0,04	5,69	-1,33	2,52
ARMS7	GLUT1		25,93	0,01	TBP	21,50	21,50		TBP	21,50	21,50		4,43	-2,60	6,05
ARMS7	GLUT1		25,92	0,01	TBP	Undetermined	21,50		TBP	Undetermined	21,50		4,42	-2,61	6,10
ES1	GLUT1		27,33	0,17	TBP	22,74	22,81	0,09	TBP	22,74	22,81	0,09	4,52	-2,51	5,69
ES1	GLUT1		27,10	0,17	TBP	22,87	22,81	0,09	TBP	22,87	22,81	0,09	4,29	-2,74	6,69
ES6	GLUT1		26,29	0,21	TBP	20,79	20,65	0,20	TBP	20,79	20,65	0,20	5,64	-1,39	2,63
ES6	GLUT1		25,99	0,21	TBP	20,51	20,65	0,20	TBP	20,51	20,65	0,20	5,34	-1,69	3,23
ES9	GLUT1		30,71	0,17	TBP	21,16	21,36	0,28	TBP	21,16	21,36	0,28	9,35	2,32	0,20
ES9	GLUT1		30,95	0,17	TBP	21,56	21,36	0,28	TBP	21,56	21,36	0,28	9,59	2,56	0,17
Liver	GLUT1		33,44	2,52	TBP	28,54	28,20	0,49	TBP	28,54	28,20	0,49	5,24	-1,79	3,45
Liver	GLUT1		37,01	2,52	TBP	27,85	28,20	0,49	TBP	27,85	28,20	0,49	8,81	1,79	0,29
Lung	GLUT1	Undetermined			TBP	Undetermined			TBP	Undetermined			-		
Lung	GLUT1	Undetermined			TBP	Undetermined			TBP	Undetermined			-		
NB3	GLUT1		27,35	0,25	TBP	21,94	22,03	0,13	TBP	21,94	22,03	0,13	5,31	-1,72	3,29
NB3	GLUT1		27,70	0,25	TBP	22,13	22,03	0,13	TBP	22,13	22,03	0,13	5,66	-1,37	2,58
NB5	GLUT1		25,72	0,16	TBP	21,96	21,94	0,03	TBP	21,96	21,94	0,03	3,78	-3,25	9,51
NB5	GLUT1		25,50	0,16	TBP	21,93	21,94	0,03	TBP	21,93	21,94	0,03	3,56	-3,47	11,08
NB7	GLUT1		27,72	0,07	TBP	22,55	28,23	8,04	TBP	22,55	28,23	8,04	-0,51	-7,54	185,72
NB7	GLUT1		27,62	0,07	TBP	33,92	28,23	8,04	TBP	33,92	28,23	8,04	-0,61	-7,64	199,52
NTC	GLUT1	Undetermined			TBP	Undetermined			TBP	Undetermined			-		1,00
OS1	GLUT1		25,04	0,00	TBP	22,88	23,02	0,20	TBP	22,88	23,02	0,20	2,02	-5,01	32,17
OS1	GLUT1		25,05	0,00	TBP	23,16	23,02	0,20	TBP	23,16	23,02	0,20	2,03	-5,00	32,05
OS2	GLUT1		28,77	0,37	TBP	23,74	23,69	0,07	TBP	23,74	23,69	0,07	5,08	-1,95	3,86
OS2	GLUT1		29,29	0,37	TBP	23,65	23,69	0,07	TBP	23,65	23,69	0,07	5,60	-1,43	2,69
RH30	GLUT1		24,92	0,29	TBP	22,00	22,07	0,10	TBP	22,00	22,07	0,10	2,85	-4,18	18,15
RH30	GLUT1		25,33	0,29	TBP	22,15	22,07	0,10	TBP	22,15	22,07	0,10	3,26	-3,77	13,63
RMS3	GLUT1		27,36	0,00	TBP	21,86	21,35	0,73	TBP	21,86	21,35	0,73	6,01	-1,02	2,02
RMS3	GLUT1		27,37	0,00	TBP	20,83	21,35	0,73	TBP	20,83	21,35	0,73	6,02	-1,01	2,02
RMS4	GLUT1		27,02	0,03	TBP	22,85	23,00	0,21	TBP	22,85	23,00	0,21	4,02	-3,01	8,05
RMS4	GLUT1		27,07	0,03	TBP	23,15	23,00	0,21	TBP	23,15	23,00	0,21	4,07	-2,96	7,78
Spleen	GLUT1	Undetermined			TBP	Undetermined			TBP	Undetermined					
Spleen	GLUT1	Undetermined			TBP	Undetermined			TBP	Undetermined					
Mean dCt liver			7,03												

Taula 6. Anàlisi de l'expressió de Glut1 en els tumors analitzats i en tres teixits control: fetge ("liver"), pulmó ("lung") i melsa ("spleen").

La primera taula (Taula. 6) correspon a l'anàlisi de l'expressió de GLUT-1 en els tumors analitzats i en tres teixits control: fetge ("liver"), pulmó ("lung") i melsa ("spleen"). D'aquests només el fetge va estar ben analitzat, tot i que els Ct del TBP són més alts que els de la resta de mostres, superant el 25. No obstant, va ser utilitzat per a fer la comparativa amb els tumors. A part de les dues mostres control, que no s'hi va reconèixer cDNA diana, dues de les mostres dels tumor també tenen valors dubtosos. La primera mostra de la qual no se'n va obtenir un resultat gaire clar és "ARMS1", ja que només en un dels dos exemplars s'hi va identificar el gen diana, llavors això no ens permet validar el resultat, però com que el TBP, que és un bon indicador de l'estat de la mostra, si que es va reconèixer correctament, es va acceptar el el valor com a bo. El "NB7", té els Ct del TBP massa diferenciats, un dels valors passa del 30 i per tant, provoca que la mitjana entre els dos resultats sigui molt alta i conseqüentment l'expressió de RNA sigui desmesuradament alta. Aquesta mostra es va descartar per fer la comparativa global i no es va incloure en els gràfics.

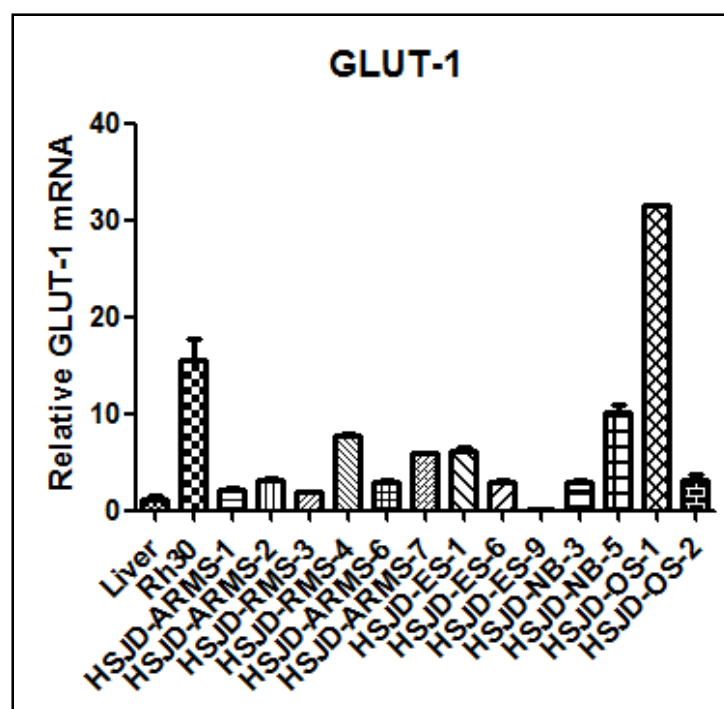


Figura 35. Gràfica de expressió d'mRNA codificant de GLUT-1 en teixits tumorals i fetge.

A la gràfica (Fig. 35) s'hi pot apreciar que l'expressió de RNA codificant de GLUT-1 en el fetge queda gairebé sempre per sota de la dels tumors, menys de l'Ewing sarcoma 9, que és el que ha donat un valor més baix. La línia cel·lular Rh30 té una elevada expressió d'RNA, molt alta en comparació la resta de tumors, en excepció de l'osteosarcoma 1 (HSJD-OS-1) que destaca per sobre de totes les mostres. Del neuroblastoma 5 (HSJD-NB-5) també se'n va obtenir un valor destacable, quedant una mica per damunt del rabdomiosarcoma 4 (HSJD-RMS-4) que també té una expressió rellevant.

Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD	dCt	ddCt	Expression
Rh30 24h con glu	glut-1	27,515	27,242	0,386	tbp	25,679	25,605	0,104	1,910	0,273	0,828
Rh30 24h con glu	glut-1	26,969	27,242	0,386	tbp	25,531	25,605	0,104	1,364	-0,273	1,208
Rh30 24h sin glu	glut-1	25,902	25,848	0,076	tbp	24,845	24,837	0,011	1,065	-0,572	1,487
Rh30 24h sin glu	glut-1	25,794	25,848	0,076	tbp	24,830	24,837	0,011	0,957	-0,680	1,602
Rh30 48h con glu	glut-1	28,468	28,517	0,069	tbp	26,507	26,579	0,101	1,889	-0,049	1,034
Rh30 48h con glu	glut-1	28,565	28,517	0,069	tbp	26,650	26,579	0,101	1,987	0,049	0,967
Rh30 48h sin glu	glut-1	28,545	28,741	0,278	tbp	26,901	26,903	0,002	1,642	-0,296	1,228
Rh30 48h sin glu	glut-1	28,938	28,741	0,278	tbp	26,905	26,903	0,002	2,035	0,097	0,935
Mean dCt 24h		1,637									
Mean dCt 48h		1,938									

Taula 7. Anàlisi de l'expressió de Glut1 en cèl·lules Rh30 cultivades en medi amb glucosa i sense glucosa durant 24h i 48h.

A la segona taula (Taula 7), exclusiva només per a l'expressió d'RNA en cèl·lules Rh30, tots els resultats van sortir adequadament. Tal com s'havia fet abans amb els teixits també es van processar dos exemplars de cada mostra. En aquest cas les mostres de cèl·lules cultivades durant 24 hores es relativitzaren amb el valor de la mitjana dels dCt de les cèl·lules cultivades en medi amb glucosa durant 24 hores. Les altres mostres, cèl·lules cultivades durant 48 hores, se les va relativitzar amb el valor de la mitjana dels dCt de les cèl·lules cultivades en medi amb glucosa durant 48 hores.

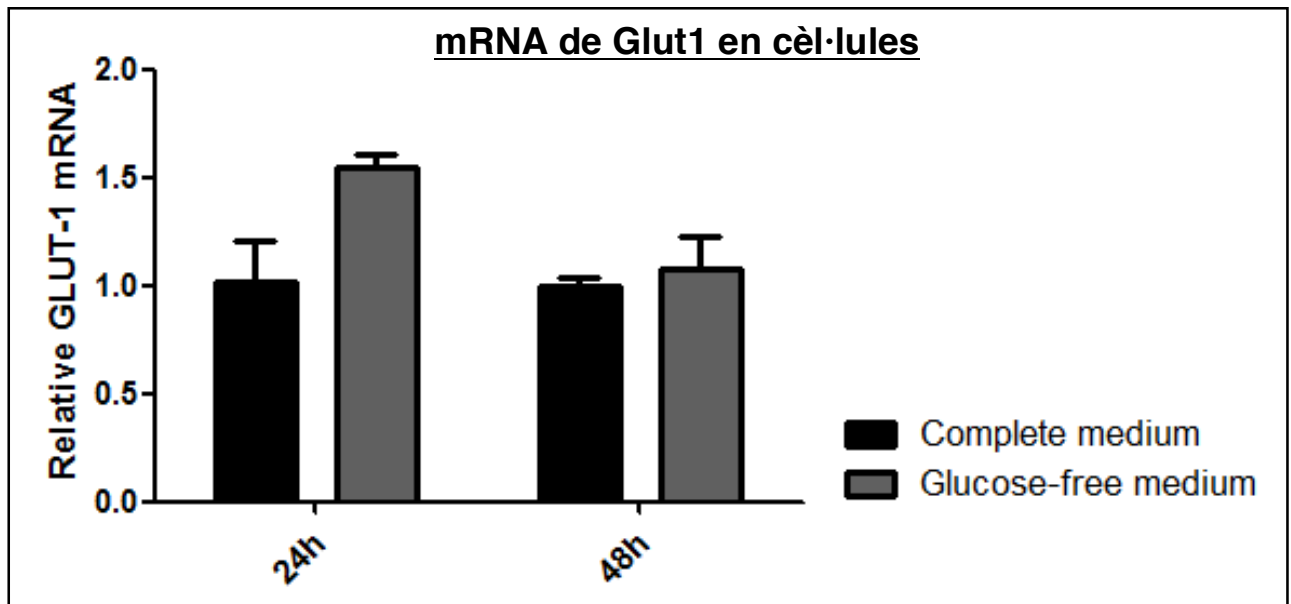


Figura 36. Gràfica de l'expressió de mRNA codificant de GLUT-1 en cèl·lules cultivades en medi amb glucosa i cèl·lules cultivades en medi sense glucosa durant 24 i 48 hores.

Com es pot interpretar a la gràfica (Fig. 36) l'expressió de les cèl·lules en medi sense glucosa sobrepassa l'expressió de les cultivades en medi amb glucosa, tant a les 24 hores com a les 48 hores, tot i així, a les 24 hores la diferència és més notable que a les 48h. L'expressió es mantén en les cèl·lules en medi amb glucosa al llarg del temps, en canvi, en les que no tenien glucosa al medi l'expressió relativa de GLUT-1 va disminuir.

6.3. HPLC

El primer pas de la preparació de les mostres requeria pesar-les per després posar la quantitat d'aigua adequada perquè totes tinguessin, la mateixa concentració. A la taula següent (Taula 8) hi ha totes les mesures i el volum d'aigua afegit en cada cas.

Núm. animal	Òrgans	Pes (g)	Volum d'aigua Milli Q (μL)	Temps des de la ingestió del fàrmac fins al sacrifici (h)
#21	Ronyó	0,1300	1300	14
	Fetge	0,1053	1053	
	Melsa	0,0443	443	
	Cervell	0,1998	1998	
	Muscle			
#23	Ronyó	0,1318	1318	
	Fetge	0,0938	938	
	Melsa	0,0661	661	
	Cervell	0,3950	3950	
	Muscle	0,0777	777	
#25	Ronyó	0,1189	1189	14
	Fetge	0,2134	2134	
	Melsa	0,0569	569	
	Cervell	0,2070	2070	
	Muscle	0,0661	661	
#31	Ronyó	0,1105	1105	14
	Fetge	0,1841	1841	
	Melsa	0,0612	612	

	Cervell	0,4472	4472	
	Muscle	0,1065	1065	
#32	Ronyó	0,1052	1052	14
	Fetge	0,1269	1269	
	Melsa	0,0906	906	
	Cervell	0,4189	4189	
	Muscle	0,1239	1239	
#33	Ronyó	0,1231	1231	8
	Fetge	0,1627	1627	
	Melsa	0,0572	572	
	Cervell	0,1996	1996	
	Muscle	0,1267	1267	
#34	Ronyó	0,1366	1366	8
	Fetge	0,1008	1008	
	Melsa	0,0390	390	
	Cervell	0,1570	1570	
	Muscle	0,0665	665	
#35	Ronyó	0,1335	1335	3
	Fetge	0,0764	764	
	Melsa	0,1214	1214	
	Cervell	0,1719	1719	
	Muscle	0,0809		
#37	Ronyó	0,1332	1332	8
	Fetge	0,1757	1757	
	Melsa	0,0707	707	

	Cervell	0,4138	4138	
	Muscle	0,0732	732	
#38	Ronyó*no ben dis.	0,1308	1308	3
	Fetge	0,1067	1067	
	Melsa	0,1388	1388	
	Cervell	0,1878	1878	
	Muscle	0,1319	1319	
#39	Ronyó	0,1148	1148	8
	Fetge	0,1318	1318	
	Melsa	0,0513	513	
	Cervell	0,2140	2140	
	Muscle	0,1347	1347	
#42	Ronyó	0,1080	1080	3
	Fetge	0,1289	1289	
	Melsa	0,1211	1211	
	Cervell	0,4043	4043	
	Muscle	0,0662	662	
#43	Ronyó	0,1235	1235	3
	Fetge	0,1549	1549	
	Melsa	0,1000	1000	
	Cervell	0,4180	4180	
	Muscle	0,1109	1109	

Taula 8. Pes de les mostres i volum d'aigua afegit.

Abans que res es va haver d'elaborar una recta patró (Fig. 37), a partir de la qual llavors es van poder determinar les concentracions en els teixits. Es van preparar cinc dilucions amb concentracions conegudes: 10 ng/g, 25 ng/g, 50 ng/g, 100 ng/g i 250 ng/g.

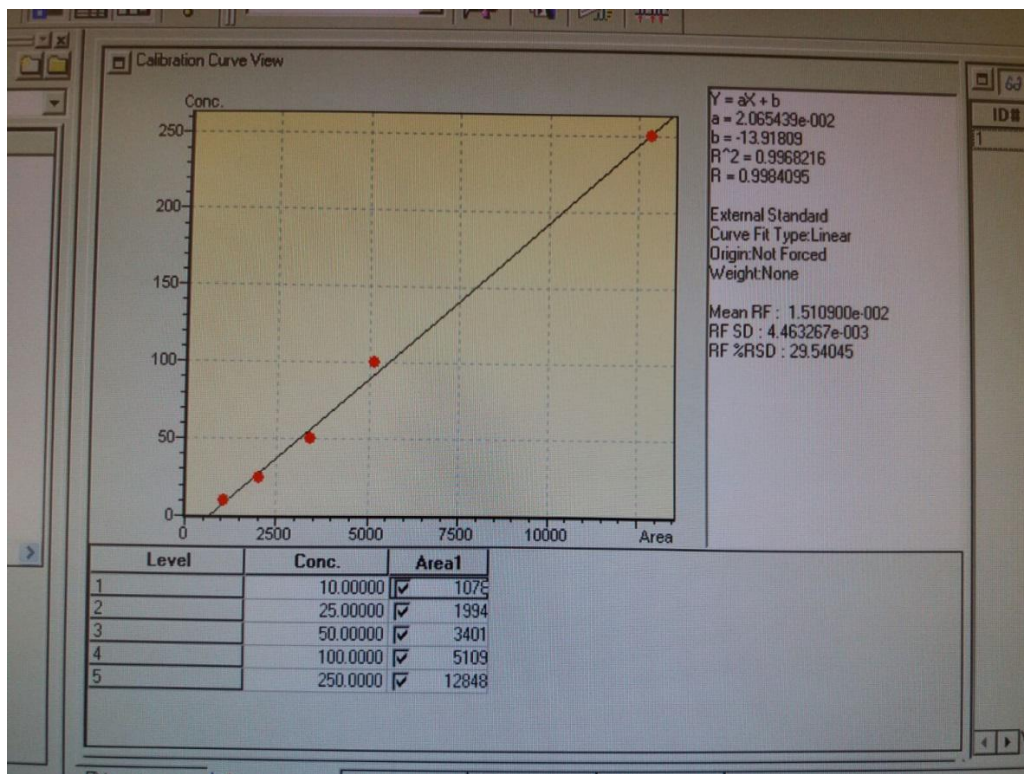


Figura 37. Recta patró. Gràfic realitzat en funció de la concentració de dasatinib respecte l'àrea.

Una vegada punxades totes les mostres es va haver de realitzar un altre anàlisi d'algunes les mostres a l'HPLC, a causa de que es va obtenir, en el primer anàlisi, que en algunes mostres, les dels animals tractats per via oral, la concentració superava la concentració màxima de la recta patró (250 mg/mL). Per tant, no es podia afirmar del cert que la concentració estimada fos correcta, i per això va ser necessari fer-ne la dissolució (Taula 9). Algunes mostres es van diluir deu vegades i en d'altres com que no era suficient no era suficient i es van diluir cent vegades. Els que van ingerir dasatinib oralment van rebre una alta quantitat del del fàrmac, 50 mg/kg. Com que se'ls hi va administrar dissolt en àcid, al dissoldre'l hi hagués hagut massa volum d'àcid i hagués sigut molt perjudicial pel cos de l'animal. Amb les micelles, en canvi, degut a la seva capacitat, la concentració ingerida va ser de 1mg/kg..

Núm. animal	Teixit	Concentració primer anàlisi, sense diluir (mg/mL)	Dilució
43	Múscul	985,52804	1:10
43	Melsa	4765,97273	1:100

43	Ronyó	5575,47452	1:100
43	Fetge	6911,59446	1:100
42	Múscul	846,51144	1:10
42	Melsa	6500,75298	1:100
42	Ronyó	8895,15605	1:100
42	Fetge	8001,84800	1:100
39	Múscul	396,93471	1:10
39	Melsa	3186,35552	1:100
39	Ronyó	3905,95976	1:100
39	Fetge	6395,34869	1:100
34	Cervell	644,88728	1:10
34	Múscul	1741,05066	1:100
34	Melsa	4046,51445	1:100
34	Ronyó	4323,26361	1:100
34	Fetge	5960,9138	1:100
33	Múscul	1019,91618	1:100
33	Melsa	8020,70221	1:100
33	Ronyó	6997,18207	1:100
33	Fetge	9754,71854	1:100

Taula 9. Concentració de dastinib obtinguda en el primer anàlisi per HPLC dels ratolins tractats per via oral i factor de dilució emprat.

Una vegada punxades les mostres dissoltes es van processar les dades en un Excel i es van obtenir les taules següents. La columna temps (h) fa referència al temps que va transcórrer des que se li va subministrar el fàrmac a l'animal fins que va ser sacrificat.

Pristine T1107				
TEIXIT	NOM	RATOLÍ	TEMPS (h)	CONCENTRACIÓ DASATINIB (ng/g)
Ronyó	Rh30 17 kidney	17	3	51,58
	#35 kidney 3h	35	3	39,03
	#38 kidney 3h	38	3	0,00
	#37 kidney 8h	37	8	23,51
	Rh30 11 kidney	11	8	0,00
	Rh30 14 kidney	14	8	0,00
	Rh30 8 kidney	8	14	0,00
	#32 kidney 14h	32	14	0,00
Fetge	Rh30 17 liver	17	3	87,90
	#35 liver 3h	35	3	40,96
	#38 liver 3h	38	3	33,89
	#37 liver 8h	37	8	0,00
	Rh30 11 liver	11	8	0,00
	Rh30 14 liver	14	8	10,01
	Rh30 8 liver	8	14	0,00
	#32 liver 14h	32	14	0,00
Múscul	Rh30 17 muscle	17	3	0,00
	#35 muscle 3h	35	3	0,00
	#38 muscle 3h	38	3	0,00
	#37 muscle 8h	37	8	0,00
	Rh30 11 muscle	11	8	0,00
	Rh30 14 muscle	14	8	0,00

Pristine T1107				
TEIXIT	NOM	RATOLÍ	TEMPS (h)	CONCENTRACIÓ DASATINIB (ng/g)
	Rh30 8 muscle	8	14	0,00
	#32 muscle 14h	32	14	0,00
Melsa	Rh30 17 spleen	17	3	66,92
	#35 spleen 3h	35	3	68,51
	#38 spleen 3h	38	3	24,45
	#37 spleen 8h	37	8	19,15
	Rh30 11 spleen	11	8	0,00
	Rh30 14 spleen	14	8	0,00
	Rh30 8 spleen	8	14	0,00
	#32 spleen 14h	32	14	0,00
Cervell	#38 brain 3h	38	3	0,00
	#37 brain 8h	37	8	0,00
	#32 brain 14h	32	14	0,00

Taula 10. Concentracions de dasatinib obtingudes per HPLC de mostres de ratolins tractats amb micel·les no glicosilades.

Els ratolins tractats amb micel·les no glicosilades (Pristine-T1107) no van retinir gens de fàrmac ni en el múscul ni en el cervell, com es pot llegir a la taula (Taula 10). Pel que fa als altres teixits, en els dels ratolins sacrificats al cap de 14h, la concentració de dasatinib es va reduir fins a zero.

T1107-Glu				
TEIXIT	NOM	RATOLÍ	TEMPS (h)	CONCENTRACIÓ DASATINIB (ng/g)
Ronyó	Rh30 13 kidney	13	3	11,38

T1107-Glu				
TEIXIT	NOM	RATOLÍ	TEMPS (h)	CONCENTRACIÓ DASATINIB (ng/g)
	Rh30 15 kidney	15	3	7,80
	Rh30 5 kidney	5	3	46,94
	Rh30 12 kidney	12	8	0,00
	Rh30 18 kidney	18	8	0,00
	#23 kidney	23	8	26,44
	Rh30 19 kidney	19	14	0,00
	Rh30 9 kidney	9	14	0,00
	Rh30 10 kidney	10	14	0,00
Fetge	Rh30 13 liver	13	3	13,94
	Rh30 15 liver	15	3	5,59
	Rh30 5 liver	5	3	148,38
	Rh30 12 liver	12	8	12,77
	Rh30 18 liver	18	8	12,60
	#23 liver	23	8	0,00
	Rh30 19 liver	19	14	0,00
	Rh30 9 liver	9	14	0,00
Rh30 10 liver	10	14	0,00	
Múcul	Rh30 13 muscle	13	3	0,00
	Rh30 15 muscle	15	3	0,00
	Rh30 5 muscle	5	3	0,00
	Rh30 12 muscle	12	8	0,00
	Rh30 18 muscle	18	8	0,00

T1107-Glu				
TEIXIT	NOM	RATOLÍ	TEMPS (h)	CONCENTRACIÓ DASATINIB (ng/g)
	#23 muscle	23	8	0,00
	Rh30 19 muscle	19	14	0,00
	Rh30 9 muscle	9	14	0,00
	Rh30 10 muscle	10	14	0,00
Melsa	Rh30 13 spleen	13	3	40,59
	Rh30 15 spleen	15	3	42,81
	Rh30 5 spleen	5	3	151,98
	Rh30 12 spleen	12	8	0,00
	Rh30 18 spleen	18	8	0,00
	#23 spleen	23	8	5,52
	Rh30 19 spleen	19	14	0,00
	Rh30 9 spleen	9	14	0,00
Rh30 10 spleen	10	14	0,00	
Cervell	#23 brain	23	8	0,00

Taula 11. Concentracions de dasatinib obtingudes per HPLC de mostres de ratolins tractats amb micel·les glicosilades.

El cas dels animals tractats amb micel·les glicosilades (T1107-Glu) es repeteix un esquema molt semblant al dels tractats amb les micel·les no glicosilades.

Reference (oral)				
TEIXIT	NOM	RATOLÍ	TEMPS (h)	CONCENTRACIÓ DASATINIB (ng/g)
Ronyó	Rh30 43 3h kidney	43	3	3612,00

Reference (oral)				
TEIXIT	NOM	RATOLÍ	TEMPS (h)	CONCENTRACIÓ DASATINIB (ng/g)
	Rh30 42 3h kidney	42	3	6722,38
	Rh30 39 8h kidney	39	8	879,18
	Rh30 34 8h kidney	34	8	1896,37
	Rh30 33 8h kidney	33	8	3485,17
	#21 kidney 14h	21	14	39,73
	#25 kidney 14h	25	14	82,78
Fetge	Rh30 43 3h liver	43	3	4108,19
	Rh30 42 3h liver	42	3	6168,89
	Rh30 39 8h liver	39	8	3842,34
	Rh30 34 8h liver	34	8	3156,35
	Rh30 33 8h liver	33	8	6141,71
	#21 liver 14h	21	14	31,12
	#25 liver 14h	25	14	13,01
Múscul	Rh30 43 3h muscle	43	3	766,02
	Rh30 42 3h muscle	42	3	601,61
	Rh30 39 8h muscle	39	8	294,12
	Rh30 34 8h muscle	34	8	No suficientment dissolt
	Rh30 33 8h muscle	33	8	No suficientment dissolt
	#25 muscle 14h	25	14	0,88
Melsa	Rh30 43 3h spleen	43	3	2827,17
	Rh30 42 3h spleen	42	3	3309,17

Reference (oral)				
TEIXIT	NOM	RATOLÍ	TEMPS (h)	CONCENTRACIÓ DASATINIB (ng/g)
	Rh30 39 8h spleen	39	8	969,17
	Rh30 34 8h spleen	34	8	1610,34
	Rh30 33 8h spleen	33	8	4770,39
	#21 spleen 14h	21	14	46,04
	#25 spleen 14h	25	14	43,24
Cervell	#43 brain 3h	43	3	21,04
	#42 brain 3h	42	3	17,63
	#39 brain 8h	39	8	16,99
	Rh30 34 8h brain	34	8	441,28
	#33 brain 8h	33	8	26,25
	#21 brain 14h	21	14	0,00
	#25 brain 14h	25	14	0,00

Taula 12. Concentracions de dasatinib obtingudes per HPLC de mostres de ratolins tractats per via oral amb una dilució del fàrmac en àcid.

Finalment, els tractats per via oral (taula 12), i, per tant, amb una alta concentració de fàrmac, n'han retingut una quantitat notable en els seus teixits, tot i que com ha passat també en els de les micel·les, a les 14h el fàrmac ha disminuït considerablement en tots els teixits. Cal tenir en compte que aquests animals van ingerir una altíssima concentració de fàrmac i per aquest motiu la presència d'aquest en els teixits és considerable.

Seguidament es van elaborar tres gràfiques diferents per il·lustrar els valors numèrics obtinguts. Les gràfiques no estan normalitzades, és a dir, no es va tenir en compte alhora de dibuixar-les, que els ratolins tractats oralment havien ingerit 50 vegades més de fàrmac que els tractats amb micel·les, i per aquest motiu les barres que corresponen als animals amb administració per via oral són tan elevades. Degut a la desmesurada concentració de fàrmac en els tractats per via oral s'han realitzat les gràfiques a escala loga-

rítmica, ja que els valors elevats no permetien apreciar amb detall els resultats obtinguts en els tractats amb micel·les. Cadascuna de les gràfiques correspon a la farmacocinètica en cada instant de temps estudiat en l'experiment (3h, 8h i 14h).

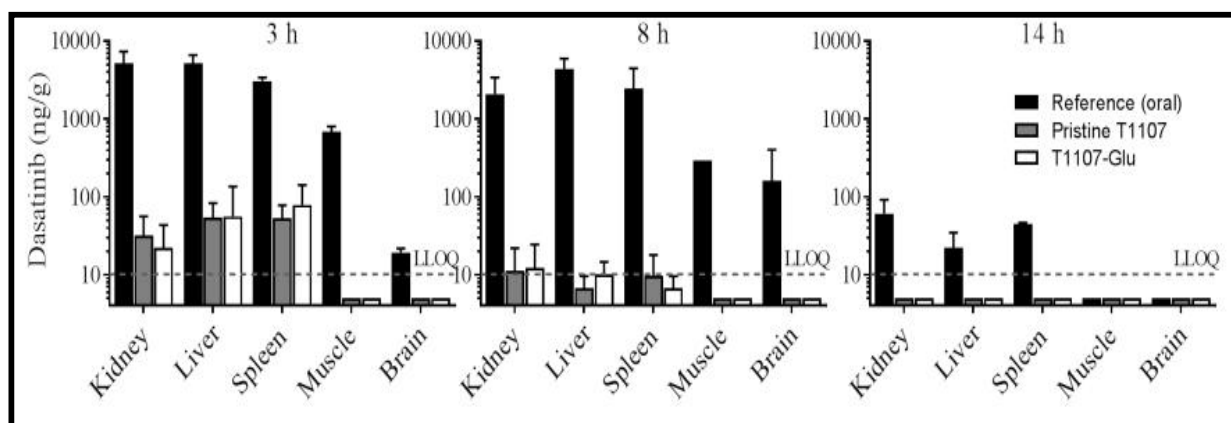


Figura 38. Farmacocinètica del fàrmac dasatinib a les 3h, 8h i 14h després de l'administració.

En aquesta primera gràfica (Fig. 38) la concentració en el múscul i el cervell en els que se'ls havia subministrat micel·les està per sota de del límit de detecció de la tècnica quantitativa emprada (10ng/g). En el ronyó dels tractats per via oral és on s'hi va acumular més concentració de fàrmac, i en el cervell a on menys. En els que, per via intravenosa, se'ls van administrar les micel·les tant glicosilades com no glicosilades, les concentracions mitjançant aquests dos tipus de formats de micel·les, en tots els òrgans, són molt similars.

A les 8h (Fig. 38) la concentració de dasatinib en els òrgans dels ratolins tractats amb micel·les va fer una disminució destacable. Els tractats per via oral però, encara contenien una elevada quantitat de fàrmac en els seus teixits, en el ronyó però, va disminuir i en el cervell va augmentar considerablement.

Finalment, a les 14h (Fig. 38), com era d'esperar, tots els tractats amb micel·les no contenien gens de presència de dasatinib en les mostres punxades dels seus òrgans, fins i tot els d'administració oral ja no contenien fàrmac ni en el múscul ni en el cervell, i a més la concentració en la resta d'òrgans se situa per sota de 100 ng/g.

Una vegada obtingudes totes les concentracions, es van utilitzar dades que fan referència a la concentració de dasatinib en els tumors, obtingudes anteriorment al laboratori del Dr. Àngel Montero. Les mostres de tumors s'havien estret de ratolins *Nude* portadors de xenoempelt d'Rh30, implantats subcutàniament. Es va calcular, per a cada mostra de cada ratolí la quantitat de fàrmac que hi havia en els tumors en relació els teixits, dividint el valor de la concentració en el tumor entre la del teixit. En cada grup hi ha representats de 4 a 6 valors. Amb això es va dibuixar la gràfica següent.

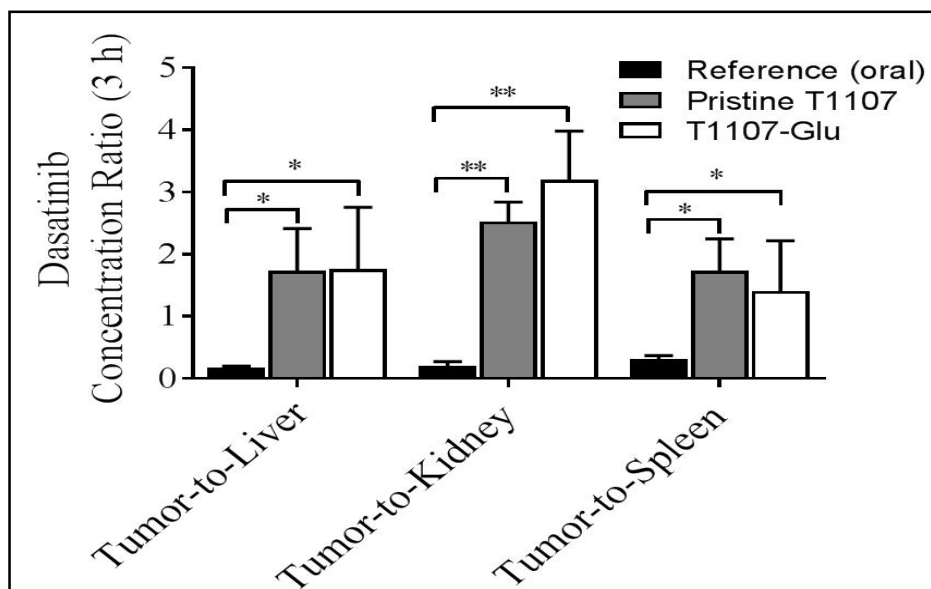


Figura 39. Concentracions en el tumor en relació el teixit corresponent a les 3h.

A la Figura 39 s'hi pot interpretar que les mostres dels ratolins tractats amb micel·les contenien més quantitat de fàrmac en els tumors que en el teixits, ja que els valors es troben entre 1 i 4. Per contra, els que van obtenir el fàrmac per via oral, la concentració d'aquest en els teixits era major que en els tumors, els valors tots se situen per sota de l'1. Per tant, en els que se'ls va administrar micel·les el tumor va trobar-se molt més exposat al tractament que en els teixits, i en canvi per via oral el fàrmac es va dispersar per tot el cos.

7. DISCUSSIÓ DE RESULTATS

7.1. EXPRESSIÓ DE GLUT-1 EN MODELS PDX I XENOEMPELT RH30

Tal i com s'esperava s'ha pogut apreciar una expressió de GLUT-1 en els tumors bastant més elevada que en els teixits normals. Tots els models PDX utilitzats en aquest estudi van presentar una àmplia captació de glucosa marcada en els diagnòstics del PET. El rhabdomiosarcoma, en general, va resultar ser un tumor amb una alta demanda de glucosa, però, era molt similar als altres tumors estudiats: osteosarcoma, neuroblastoma i Ewing sarcoma.

Després d'analitzar els resultats obtinguts en qPCR i immunohistoquímica es poden observar diferències entre els resultats de les dues tècniques. Només en alguns casos però, com alguns rhabdomiosarcomes, s'ha manifestat una expressió semblant en les dues tècniques, com és el cas del rhabdomiosarcoma 4 i del xenoempelet d'Rh30. Pel que fa a la resta de tumors les IHQ i les qPCR no sembla que acabin de concordar, com seria en el cas de l'OS-1, on l'expressió d'mRNA era molt major a la de proteïna, i el NB-3, on l'expressió d'mRNA era menor a la de proteïna. Aquest fet es podria justificar per una mala aplicació del procediment, o bé pel funcionament de la pròpia cèl·lula. És a dir, que la quantitat

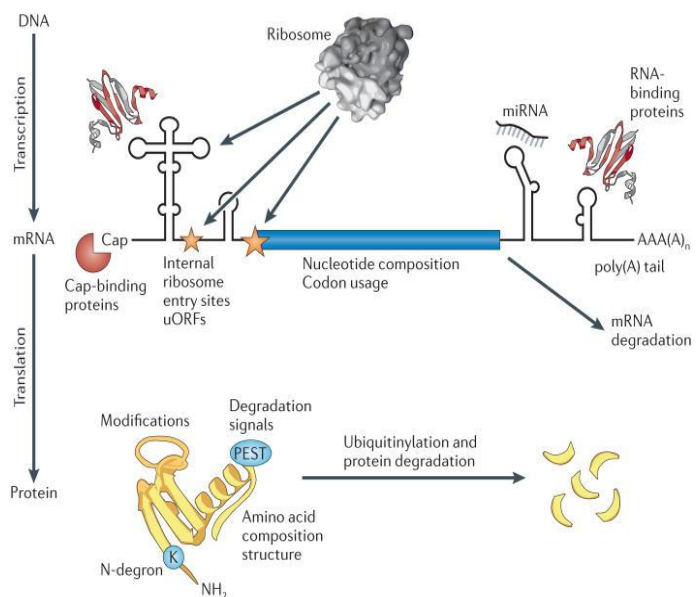


Figura 40. Mètodes de regulació de la traducció i la degradació de proteïnes. A la part superior de la imatge s'hi aprecia la possible acció de miRNA i de proteïnes reguladores en el procés de traducció. A la zona superior hi ha il·lustrats alguns mecanismes de regulació de degradació de proteïnes.

d'ARNm que aquesta sintetitza no sigui el mateix que la de proteïna^[59]. La concentració de proteïna de la cèl·lula és important que es mantingui regulada, i, perquè això succeeixi, són importants els diversos processos transcripcionals, post-transcripcionals, traduccional i de degradació de proteïna (Fig. 40)^[60]. Els nivells d'expressió proteïnics estan determinats, en la mateixa mesura, per la regulació post-transcripcional i traduccional i la degradació de proteïnes, com per la transcripció, que tot i creure que és el procés més determinant, hi ha estudis que ho desmenteixen^[62]. Per tant, tot allò que succeeix posteriorment a la transcripció s'escapa de l'abast de l'anàlisi. Hi ha múltiples processos post-transcripcionals, com per exemple en les cèl·lules cancerígenes, els gens amb una expressió més alta exhibeixen 3'UTR (*Untranslated Regions*) més curts amb menys punts d'unió amb miRNA, disminuint així, la repressió traduccional^[62]. El miRNA regula la traducció adherint-se a l'mRNA i impedit-ne la traducció o bé provo-

cant-ne la degradació^[64]. Aquests mètodes de regulació posteriors a la transcripció fan variar la concentració de proteïna, de tal manera que sovint l'mRNA transcrit no és proporcional a la proteïna expressada.

També es podrien tenir en compte els processos d'activació de la proteïna, pel fet que una vegada l'mRNA ha estat traduït, la proteïna sovint s'ha d'activar perquè sigui funcional. Això succeeix a l'interior de la cèl·lula, i més concretament a l'aparell de Golgi^[51]. Els anticossos utilitzats en l'IHQ són pel receptor de glucosa, GLUT-1, que se situa a la membrana de la cèl·lula^[49], per la qual cosa, si la molècula funcional resta encara inactiva a l'interior de la cèl·lula, els anticossos específics no la detectaran. Per tant, no hi haurà marcatge. També podria succeir que la proteïna adoptés una conformació inactiva que l'anticòs fos incapaç de reconèixer^[64].

La carcinogènesi està associada a un augment de la captació de glucosa per part de les cèl·lules, això indica un augment del metabolisme. En molts tumors com el rhabdomyosarcoma i l'osteosarcoma, el gen supressor tumoral p53 pateix una mutació. S'ha comprovat, que aquest supressor tumoral en absència de mutacions actua com a regulador dels receptors de glucosa, GLUT-1 i GLUT-4^[65]. Aquest podria estar lligat a un augment de GLUT-1 en les cèl·lules cancerígenes de rhabdomyosarcoma i osteosarcoma.

En les imatges d'IHQ dels teixits sans, en tots, el marcatge és molt lleu, menys en zones on s'hi aprecien eritròcits. Aquest resultat és raonable perquè el receptor de membrana GLUT-1 és el principal transportador de glucosa en els glòbuls vermells^[66].

En moltes mostres en immunohistoquímica, hi havia zones necròtiques molt marcades de color marró, segurament a causa de la hipòxia^[67], que correspon a la manca d'oxigen en una àrea concreta de l'organisme. Com s'ha dit, els tumors es caracteritzen per una activitat metabòlica molt alta, fet que requereix una elevada captació de glucosa, i, per això, la taxa de glicòlisi és molt significativa. En unes condicions normals, la cèl·lula, desenvoluparia la respiració aeròbica, utilitzant l'oxigen com a comburent per oxidar la glucosa. En canvi, en un entorn hipòxic, en les cèl·lules tumorals s'hi acumularia àcid làctic després del procés de la glicòlisi^[2]. Així doncs, les deshidrogenases làctiques, responsables de la reducció de l'àcid pirúvic en àcid làctic, prenen un paper crucial per a la supervivència de les cèl·lules, pel fet que permeten l'obtenció d'energia en forma d'ATP en absència d'oxigen. Per tant, quan hi ha una manca d'oxigen, la cèl·lula cancerígena duu a terme vies metabòliques anaeròbiques, més concretament desenvolupa processos de fermentació làctica. La fermentació produeix una quantitat bastant més reduïda d'energia en forma d'ATP que la respiració, d'aproximadament 19 vegades menys ATP per mol de glucosa. Per aquest motiu, les cèl·lules que es troben en zones hipòxiques, al desenvolupar catabolisme anaeròbic, necessiten més glucosa per obtenir l'energia necessària pel seu propi funcionament, molta més de la que utilitzarien en realitzar la respiració aeròbica per obtenir la mateixa quantitat d'energia^[68].

Les cèl·lules Rh30 que van viure en un medi sense glucosa durant 24-48h van presentar més receptors de glucosa GLUT-1 que les cèl·lules que es van cultivar en un medi amb glucosa durant 24-48h. En el cas de la privació de glucosa es podria dir que les condicions en què van viure les cèl·lules plasmaven molt més bé el medi extracel·lular en què es trobaria un tumor, ja que els nutrients, i la glucosa en concret, s'hi troben escassos degut a la captació extremadament ràpida que en fa el tumor. Un tumor doncs, a més a més de sovint trobar-se en zones hipòxiques, també es pot trobar en una situació de privació de la glucosa, la qual cosa, es pot afirmar, activa els receptors de glucosa GLUT-1. Els tumors que pateixen aquestes dues condicions són més propensos a expressar una quantitat major de GLUT-1 que només localitzant-se en una àrea hipòxica^[69]. Les cèl·lules Rh30 d'aquest experiment, però, no van patir una clara manca d'oxigen, en canvi sí una privació de la glucosa absoluta.

7.2. CONCENTRACIÓ DE DASATINIB EN MOSTRES DE RATOLINS TRACTATS AMB DIFERENTS VIES D'ADMINISTRACIÓ

La concentració de dasatinib en els diferents òrgans va anar disminuint a mesura que avançava el temps. Això significa que les mostres es trobaven en bon estat, ja que s'aprecia un procés natural adequat d'eliminació del fàrmac dels teixits sans. Amb els resultats obtinguts, es pot concloure que la biodistribució del fàrmac pur administrat per via oral no és gens precisa, a diferència de les micel·les transportadores de dasatinib, les quals van tenir una alta especificitat en els tumors molt rellevant.

Un fàrmac ingerit per via oral passa per un recorregut farmacocinètic més ampli, i, per tant, la quantitat de filtres que ha de traspasar és major que no quan s'administra el medicament per via intravenosa (Fig. 41). A més el dasatinib pur és altament metabolitzat al fetge, només un 30% resta intacte després de ser filtrat. S'ha d'afegir, també, que fins a un 85%^[1] s'elimina en excrements, de tal manera que es perd gran quantitat de dasatinib abans no s'ha pogut absorbir pels teixits. Quan arriba a la sang ja ha passat per una sèrie de filtres previs significatius (Fig. 41).

Quan les nanopartícules, administrades per via IV, entren en contacte amb la sang encara es mantenen en un 100%. El fàrmac s'encapsula per evitar tot el rebuig que fa el cos; les micel·les protegeixen el fàrmac i eviten, per tant, la defensa massiva que fa el cos envers les molècules del medicament, que el llegeix com a substància tòxica. Així doncs, la quantitat de fàrmac que es metabolitza abans de ser absorbit pel tumor, administrat pur i per via oral, és molt inferior que l'administrat en micel·les i per via IV.

En tots els tipus d'administració, els òrgans que van obtenir més concentració de fàrmac van ser els filtradors; el fetge i el ronyó, i seguidament la melsa, la qual porta a terme la renovació de glòbuls vermells a partir dels eritròcits vells^[70], que també va retenir força dasatinib. Aquest resultat és positiu, ja que significa que els cossos dels animals eren capaços de eliminar el medicament que no arribava al tumor.

S'ha pogut apreciar que el fàrmac encapsulat no va aconseguir penetrar ni els teixits musculars ni el cervell. El cervell està protegit per una membrana altament selectiva i semipermeable anomenada barrera hematoencefàlica. Un 98% dels medicaments no poden travessar-la degut a la seva toxicitat^[54], per

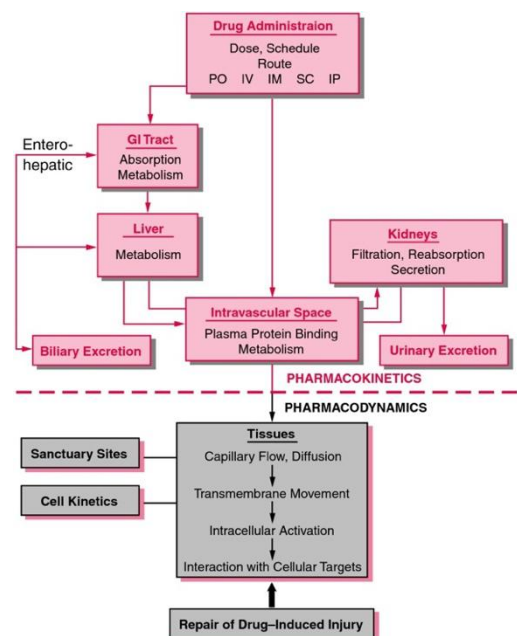


Figura 41. Farmacocinètica i farmacodinàmica dels fàrmacs administrats oralment i per via intravenosa.

aquest motiu no s'ha detectat que hagi presència de dasatinib al cervell. Així doncs, el dasatinib en micel·les no podria ser un medicament utilitzat pel tractament de malalties cerebrals.

El múscul, per tant, és l'únic teixit analitzat que permet valorar l'especificitat del fàrmac. Segurament la concentració de dasatinib als òrgans no va ser nul·la, però sí inferior al límit de detecció de la tècnica emprada. A més, s'ha de dir que la quantitat de fàrmac que es va administrar en micel·les ja de per sí era baixa.

En estudis anteriors ja s'havia trobat que en els tumors dels animals tractats amb micel·les s'hi acumulava molt més el fàrmac que administrat pur i per via oral (Fig. 42). Els tumors estudiats eren dels mateixos animals als que se'ls va fer llavors l'estudi farmacocinètic. L'alta presència de fàrmac en el tumor i la baixa concentració en el múscul indica que gran quantitat del fàrmac va realitzar *targeting* cap al tumor i, per tant, no es va distribuir de forma dispersa en altres teixits. Aquest fet significa que el fàrmac en micel·les es va concentrar bàsicament al tumor i en els diferents òrgans filtradors.

Tal i com s'ha dit, les micel·les glicosilades tenien més especificitat pel tumor que les no glicosilades (Fig. 42). Els anàlisis quantitius de la presència de GLUT-1, realitzats en el xenoempelt d'Rh30, justifiquen que s'hagi obtingut una elevada acumulació de fàrmac en els tumors dels ratolins tractats amb micel·les glicosilades, ja que es va poder comprovar que són cèl·lules amb una àvida captació de glucosa, per la quantitat de receptors que expressava. Tot i així, en relació als òrgans la conjugació amb glucosa dels nano-vehicles no va fer variar gaire les diferents concentracions de dasatinib provinent de les dues formulacions en els teixits sans.

Les Pristine T1107 van actuar amb més especificitat que el dasatinib pur via oral, tot i no trobar-se glicosilades, com a conseqüència del *targeting* passiu. El *targeting* passiu es fonamenta en la hiperpermeabilitat de la vasculatura d'un tumor, de manera que a causa d'una descontrolada angiogènesi, el tumor es proveeix de reg sanguini^[71]. Així doncs, les micel·les fàcilment podien circular pels vasos sanguinis del tumor, fent augmentar la concentració de fàrmac a l'interior de les cèl·lules tumorals^[72].

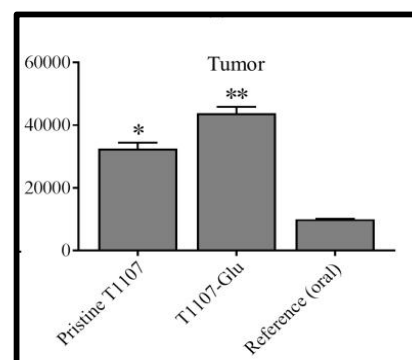


Figura 42. Concentració de Dasatinib en Tumor segons el tipus d'administració.

8. CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts pel que fa a l'estudi de l'expressió de GLUT-1 en diferents teixits i tumors i en referència a l'anàlisi farmacocinètic dels ratolins tractats amb dasatinib, s'han pogut extreure les següents conclusions:

- 1- Les diferències observades entre l'expressió de proteïna analitzada per immunohistoquímica i l'expressió del gen analitzada per RT-qPCR, es podrien deure a la gran quantitat de processos post-transcripcionals que interfereixen en el procés de síntesi del receptor de glucosa GLUT-1.
- 2- Les condicions d'hipòxia i de deficiència de glucosa fan augmentar l'expressió de GLUT-1 en els tumors estudiats.
- 3- La línia cel·lular Rh30 i en general els rhabdomiosarcomes expressen una quantitat similar de GLUT-1 en relació als altres tumors estudiats.
- 4- Els tumors expressen més transportadors de glucosa GLUT-1 que els teixits normals (fetge i ronyó).
- 5- L'administració oral de dasatinib pur no és gens específica en la seva distribució a tumors sòlids pediàtrics, pel fet que s'ha quantificat una major concentració de fàrmac als teixits sans que al tumor. A més, com que se'n metabolitza una gran part abans de ser absorbit pels teixits, el fàrmac no actua amb la seva màxima capacitat.
- 6- Les micel·les administrades per via intravenosa, són molt més específiques que el fàrmac pur administrat via oral.
- 7- El fàrmac que no arriba al tumor es distribueix en els òrgans normals filtradors abans d'eliminar-se. Es trobava en quantitat en totes les formulacions en els òrgans filtradors analitzats, fetge, ronyó i melsa.
- 8- Les micel·les no glicosilades realitzen *targeting* passiu perquè s'acumulen als teixits per extravasació. Les micel·les glicosilades realitzen *targeting* actiu i passiu. Per aquest motiu aconseguixen una millor distribució en els tumors que les micel·les no glicosilades. Podem afirmar, per tant, que una àmplia expressió de GLUT-1 afavoreix la captació de les micel·les glicosilades.

9. GLOSSARI

Anaplàsia: Regressió de les cèl·lules d'un teixit a una forma més primitiva i indiferenciada.

Angiogènesi: Procés de formació dels vasos sanguinis en què els nous vasos emergeixen de vasos preexistents.

Anticòs: Proteïna elaborada per les cèl·lules plasmàtiques (tipus de glòbul blanc) en resposta a un antigen.

Antigen: Qualsevol substància que provoqui que el cos produeixi una resposta immunitària contra ella.

Carcinogènesi: Procés pel qual les cèl·lules normals es transformen en cèl·lules canceroses.

Catabolisme anaeròbic i fermentació: El catabolisme anaeròbic són tots aquells processos d'oxidació de molècules que no requereix oxigen. La fermentació, en concret, un procés anaeròbic que consisteix en una oxidació només parcial de molècules de glucosa.

Cura pal·liativa: Tractament destinat només a alleugerir els símptomes i el patiment causat pel càncer i altres malalties que podrien ser mortals.

Eppendorf: Tub de microcentrífuga.

Estabulari: Espai on es crien i es manipulen els ratolins.

Farmacocinètica: Activitat dels medicaments a l'interior del cos durant un període de temps determinat, on els fàrmacs s'absorbeixen, es distribueixen pel cos, es localitzen en teixits i s'eliminen de l'organisme.

Gen supressor tumoral: Gen que redueix la probabilitat de que una cèl·lula d'un organisme es transformi en cancerosa. Generalment inhibeixen la proliferació cel·lular excessiva.

Glicòlisi: Procés anaeròbic que allibera energia i oxida la glucosa fins a àcid pirúvic.

H₂O Milli-Q: L'aigua purificada i desionitzada en un alt grau per un sistema de purificació d'aigua fabricat per Millipore Corporation.

Hematoxilina: colorant bàsic que permet tintar els teixits i veure'ls per un microscopi. Tenyeix el nucli i altres components cel·lulars.

Homeòstasi: tendència a mantenir l'equilibri i l'estabilitat interns en els diferents sistemes biològics

Línia cel·lular: Cèl·lules d'un tipus únic (humà, animal o vegetal) que s'han adaptat per créixer contínuament en els laboratoris i que s'usen per a la investigació.

Lligand-receptor:

Metàstasi: Disseminació del càncer d'una part del cos on es va formar originalment a una altra part del cos.

Mutació: Qualsevol canvi en l'organització del DNA.

Nano-vehicle: En aquest cas correspon a una partícula que facilita el transport d'una altra molècula a través de l'organisme protegint-la al seu interior.

Oncogen: Gen que quan ha mutat o s'expressa en nivells alts ajuda a convertir la cèl·lula normal en cèl·lula tumoral.

"Passe": Nombre de vegades que s'ha tripsinitzat un cultiu cel·lular.

Pellet: porció de matèria aglomerada a la part inferior dels tubs de rosca després de una centrifugació.

Polímer: Macromolècules formades per la unió de molècules més petites anomenades monòmers.

Primer: En català encenedor, petita molècula d'RNA generalment, que serveix de punt d'inici de la síntesi del DNA.

Proteïna quimèrica: Proteïna formada a partir de la traducció de dos o més gens prèviament independents que s'han unit.

Resuspendre: Tornar a posar en suspensió un precipitat.

Senescència: envelliment biològic.

Sobrenedant: part líquida que queda damunt del pellet després d'una centrifugació.

Spin: centrifugació molt curta.

Targeting: dirigir un element a la localització desitjada.

Termociclador: màquina usada en biologia molecular que permet realitzar de forma automàtica i programada els cicles de temperatures necessaris per a una reacció en cadena de la polimerasa d'amplificació d'ADN.

Translocació cromosòmica: és una mutació cromosòmica que es dona quan un fragment d'un cromosoma passa a formar part d'un altre cromosoma no homòleg.

Tubs Falcon: Tubs que poden ser de diferents volums, calibrats orientativament en mil·límetres.

Vortex: dispositiu utilitzat per homogeneïtzar mesclades.

Xenoempelt: teixit extret d'un donant d'una espècie i injectat a un receptor d'una espècie diferent.

10. BIBLIOGRAFIA

- [1] Lindauer, M.; Hochhaus, A. "Dasatinib". Martens, Uwe M. *Small Molecules in Oncology*. 2. Heidelberg/Berlin: Springer, 2014, 201, pàg 27-65.
- [2] Aminzadeh, S.; Vidali, S.; Sperl, W.; Kofler, B.; Feichtinger, R. G.; "Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor". *Translational Pediatrics*. 4(1), 2015, pàg: 20-32.
- [3] Thorens, B.; Mueckler, M.; "Glucose transporters in the 21st Century". *American Journal Physiology: Endocrinology and Metabolism*. 298(2), 2010, pàg: E141-E145.
- [4] Machaeda, L. M.; Rogers, S.; Best, D. J. "Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer". *Journal of cellular physiology*. 202, 2005, pàgs. 654-662.
- [5] Endo, M.; Tateishi, U.; Seki, K.; Yamaguchi U.; Nakatani F.; Kawai A.; "Prognostic Implications of Glucose Transporter Protein-1 (Glut-1) Overexpression in Bone and Soft-Tissue Sarcomas". *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 37, 2007, pàgs. 955-960.
- [6] Ito, S.; Nemoto, T.; Satoh, S.; Sekihara, H.; Seyama, Y.; Kubota, S.; "Human rhabdomyosarcoma cells retain insulin-regulated glucose transport activity through glucose transporter 1." *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 373(1), 2000, pàgs. 72-82.
- [7] Mazzoleni, S.; Bisogno, G.; Garaventa, A.; Cecchetto, G.; Ferrari, A.; Sotti, G.; Donfrancesco, A.; Madon, E.; Casula, L.; Carli, M. "Outcomes and prognostic factors after recurrence in children and adolescents with nonmetastatic rhabdomyosarcoma". *Cancer*. 104(1), 2005, pàgs. 183-190.
- [8] Carcaboso, A. M.; Sosnik, A. "Nanomedicines in the future of pediatric therapy". *Advanced Drug Delivery Reviews*. 73, 2014, pàgs. 140-161.
- [9] Bukchin, A.; Pascual, G.; Cuadrado, M.; Monterrubio, C.; Olaciregui, G. N; Vila, M.; Ordeix, L.; Móra, J.; Carcaboso, M. A.; Sosnik, A. "Glucosylated nanomicelles to target glucose-avid pediatric sarcomas". *Enviat (encara no publicat)*.
- [10] NEWS MEDICAL LIFE SCIENCES. What causes cancer? <https://www.news-medical.net/health/What-Causes-Cancer.aspx> [Consulta: 07.08.2017]
- [11] MAYO CLINIC. Cancer: Causes. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/basics/causes/con-20032378> [Consulta: 07.08.2017]
- [12] Douglas, H.; Weinberg, A. R.; "Hallmarks of cancer: The next generation". *Cell*. 144(5), 2011, pàg.

646-674.

[13] FECEC. Junts contra el càncer. Tipus de càncer. <http://www.juntscontraelcancer.cat/cancer/tipus-de-cancer/> [Consulta: 12.07.2017]

[14] AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment types. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html> [Consulta: 24.09.2017]

[15] AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment types: How surgery is used for cancer. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/surgery/how-surgery-is-used-for-cancer.html> [Consulta: 24.09.2017]

[16] AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment types: How Is Chemotherapy Used to Treat Cancer? <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-is-chemotherapy-used-to-treat-cancer.html> [Consulta: 24.09.2017]

[17] Blattman, N. J.; Greenberg D. P. "Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses". *Science*. 305(5681), pàgs. 200-205.

[18] AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment types: What is cancer immunotherapy? <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/what-is-immunotherapy.html> [Consulta: 24.09.2017]

[19] AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment types: Radiation therapy basics. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation/basics.html> [Consulta: 24.09.2017]

[20] AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment types: What Is Targeted Cancer Therapy? <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/targeted-therapy/what-is.html> [Consulta: 24.09.2017]

[21] Móra, J. "What is a pediàtric solid tumor?". *Clinical Oncology in Adolescents and Young Adults*. 2012(2), 2012, pàgs. 7-15.

[22] MEDLINE PLUS. How childhood cancers are different from adult cancers. <https://medlineplus.gov/ency/patientinstructions/000845.htm> [Consulta: 20.08.2017]

[23] Móra, J. "El càncer del desenvolupament. Part 1: Introducció." *Pediatría Catalana*. 69, 2009, pàgs. 206-208.

[24] ST BALDRICK'S FOUNDATION. About Childhood Cancer. <https://www.stbaldricks.org/about-childhood->

cancer/ [Consulta: 18.08.2017]

[25] MEDLINE PLUS. Tumores benignos. <https://medlineplus.gov/spanish/benigtumors.html> [Consulta: 24.08.2017]

[26] Ognjanovic, S.; Linabery, M. A.; Charbonneau, B.; Ross A. J. "Trends in Childhood Rhabdomyosarcoma Incidence and Survival in the United States (1975–2005)". *Cancer*. 115(18), 2009, pàgs. 4218–4226.

[27] NATIONAL CANCER INSTITUTE. Childhood Rhabdomyosarcoma Treatment (PDQ®)–Health Professional Version. <https://www.cancer.gov/types/soft-tissue-sarcoma/hp/rhabdomyosarcoma-treatment-pdq> [Consulta: 29.10.2017]

[28] Masliah-Planchon, J.; Garinet, S.; Pasmant, E. "RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action". *Oncotarget*. 7(25), 2016, pàgs. 38892–38907.

[29] Liselotte P. van Hest, Mariëlle W. G. Ruijs, Anja Wagner, Conny A. vander Meer, Senno Verhoef, Laura J. van't Veer, Hanne Meijers-Heijboer. "Two TP53 germline mutations in a classical Li-Fraumeni syndrome family". *Familial cancer*. 6(3), 2007, pàgs. 311–316

[30] U. S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Genes. DICER 1 gene. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/DICER1> [Consulta: 30.09.2017]

[31] Rauen, A. K. "The RASopathies". *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 14, 2013, pàgs. 355-369.

[32] U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Health conditions. Beckwith-Wiedemann syndrome. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/beckwith-wiedemann-syndrome> [Consulta: 30.09.2017]

[33] Ognjanovic, S.; Carozza, E. S.; Chow, J. E.; Fox, E. E.; Horel, S.; McLaughlin, C. C.; Mueller, A. B.; Puumala, S.; Reynolds, P.; Von Behren, J.; Spector, L. "Birth characteristics and the risk of childhood rhabdomyosarcoma based on histological subtype". *British journal of cancer*. 102(1), 2010, pàgs. 227–231.

[34] ENCICLOPÈDIA.CAT. El cercador de referència en català. Anaplàsia. <http://www.enciclopedia.cat/EC-GEC-0078138.xml> [Consulta: 19.10.2017]

[35] Kaste, C. S.; "Imaging pediatric bone sarcomas". *Radiology Clinics*. 49(4), 2011, pàgs. 749–765.

[36] INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Tratamiento del osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno óseo (PDQ®)–Versión para profesionales de salud. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/hueso/pro/tratamiento-osteosarcoma-pdq> [Consulta: 15.10.17]

- [37] Mirabello, L.; Pfeiffer, R.; Murphy, G.; Daw, C. N.; Patiño-García, A.; Troisi, J. R.; Hoover, N. R.; Douglass, C.; Schüz, J.; Craft, W. A.; Savage, A. S. "Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma". *Cancer Causes & Control*. 22(6), 2011, pàgs. 899–908.
- [38] MEDICINE PLUS. Paget disease of the bone. <https://medlineplus.gov/ency/article/000414.htm> [Consulta: 22.10.2017]
- [39] WIKIPEDIA. Diamond-Blackfan anemia https://en.wikipedia.org/wiki/Diamond-Blackfan_anemia [Consulta: 22.10.2017]
- [40] NORD (National Organization for Rare Disorders). Rothmund-Thomson Syndrome. <https://rarediseases.org/rare-diseases/rothmund-thomson-syndrome/> [Consulta: 22.10.2017]
- [41] NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer types: Ewing Sarcoma Treatment (PDQ®)—Patient Version. <https://www.cancer.gov/types/bone/patient/ewing-treatment-pdq> [Consulta: 25.10.2017]
- [42] Ozaki, T. "Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article". *Journal of Orthopaedic Science*. 20(2), 2015, pàgs. 250–263.
- [43] Sand, L. G. L.; Szuhai, K.; Hogendoorn; W. C. P. "Sequencing Overview of Ewing Sarcoma: A Journey across Genomic, Epigenomic and Transcriptomic Landscapes". *International Journal of Molecular Sciences*. 16(7), 2015, pàgs. 16176–16215.
- [44] Brohl, S. A. et al. "The Genomic Landscape of the Ewing Sarcoma Family of Tumors Reveals Recurrent STAG2 Mutation". *PLOS Genetics*. 10(7), 2014.
- [45] Esposito, R. M.; Aveic, S.; Seydel, A.; Tonini, P. G.; "Neuroblastoma treatment in the post-genomic era". *Journal of Biomedical Science*. 24, 2017, 14.
- [46] Stafman, L. L.; Beierle, A. E. "Cell Proliferation in Neuroblastoma". *MDPI Cancers*. 8, 2016, 13.
- [47] MEDINE PLUS. Neuroblastoma. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001408.htm> [Consulta: 02.11.2017]
- [48] INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Tratamiento del neuroblastoma (PDQ®)—Versión para profesionales de salud. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/neuroblastoma/pro/tratamiento-neuroblastoma-pdq> [Consulta: 06.11.2017]

- [49] Mueckler, M.; Bernard, T. "The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters". *Molecular Aspects of Medicine*. 34(2-3), 2013, pàgs. 121-138.
- [50] DIAPEDIA, The living textbook of diabetes. Glucose transport. <https://www.diapedia.org/metabolism-insulin-and-other-hormones/5104085195/glucose-transport#fnref:1> [Consulta: 29.10.2017]
- [51] Grence, T.; Macià, P. *Biologia Batxillerat 1*. Barcelona: Santillana Grup Promotor, 2016.
- [52] Paul, K. M.; Mukhopadhyay, K. A. "Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer". *International Journal of Medical Sciences*. 1(2), 2004, pàgs. 101–115.
- [53] Upadhyay, K. R. "Drug Delivery Systems, CNS Protection, and the Blood Brain Barrier". *BioMed Research International*. 2014, 2014.
- [54] Sagar, V.; Pilakka-Kanthikeel, S.; Pottathil, R.; Saxena, K. S.; Nair, M.; "Towards nanomedicines for neuro-AIDS". *Reviews in Medical Virology*. 24(2), 2014, pàgs. 103–124.
- [55] Cho, H.; Lai, C. T.; Tomoda, K.; Kwon, S. G. "Polymeric Micelles for Multi-Drug Delivery in Cancer". *AAPS PharmSciTech*. 16(1), 2015, 10–20.
- [56] Krzeslak, A.; Wojcik-Krowiranda, K.; Forma, E.; Jozwiak, P.; Romanowicz, H.; Bienkiewicz, A.; Brys, M. "Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers". *Pathology Oncology Research*. 18(3), 2012, pàgs. 721–728.
- [57] New Englan BioLabs. Choice of One-Step RT-qPCR or Two-Step RT-qPCR. <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/choice-of-one-step-rt-qpcr-or-two-step-rt-qpcr> [Consulta: 16.07.2017]
- [58] GIT LABORATORY JOURNAL. HPLC Analysis. <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis> [03.11.2017]
- [59] Guo, Y.; Xiao, P.; Lei, S.; Deng, F.; Xiao, G. G.; Liu, Y.; Chen, X.; Li, L.; Wu, S.; Chen, Y.; Jiang, H.; Tan, L.; Xie, J.; Zhu, X.; Liang, S.; Deng, H.; "How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes". *ABBS (Acta Biochimica et Biophysica Sinica)*. 40(5): 2008, pàgs. 426-36.
- [60] Vogel, C.; Marcott, M. E. "Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses". *Nature Reviews Genetics*. 13(4), 2012, pàgs. 227–232.

[61] Vogel, C.; Abreu, S. R.; Ko, D.; Le, S.; Shapiro, A. B.; Burns, C. S.; Sandhu, D.; Boutz, R. D.; Marcotte, M. E.; Penalva, O. L. "Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line". *Molecular Systems Biology*. 6(1), 2010, 400.

[62] Sandberg, R.; Neilson, J. R.; Sarma, A.; Sharp, P. A.; Burge, C. B.; "Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites". *Science*. 320(5883), 2008, 1643–1647.

[63] WIKIPEDIA. Three prime untranslated region https://en.wikipedia.org/wiki/Three_prime_untranslated_region [Consulta: 09.11.2017]

[64] Robichaud, T.; Appleyard, N. A.; Herbert, B. R.; Henderson, F. J. P.; Carruthers, A. "Determinants of ligand binding affinity and cooperativity at the glut1 endofacial site". *Biochemistry*. 50(15), 2011, pàgs. 3137–3148.

[65] Schwartzberg-Bar-Yoseph, F.; Armoni M.; Karniel, E. "The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression." *Cancer Research*. 64(7), 2004, pàgs. 2627-2633.

[66] Sage J. M.; Carruthers A. "Human erythrocytes transport dehydroascorbic acid and sugars using the same transporter complex." *American Journal of physiology Cell Physiology*. 306(10), 2014, pàgs. C910-C917.

[67] Airley, R.; Evans, A.; Mobasher, A.; Hewittd. M. S. "Glucose transporter Glut-1 is detectable in perinecrotic regions in many human tumor types but not normal tissues: Study using tissue microarrays". *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 192(3), 2010, pàgs.133-138.

[68] Semenza, L. G. "Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate". *The journal of clinical investigation*. 118(12), 2008, pàgs. 3835–3837.

[69] Natsuizaka, M.; Ozasa, M.; Darmanin, S.; Miyamoto, M.; Kondo, S.; Kamada, S.; Shindoh, M.; Higashino, F.; Suhara, W.; Koide, H.; Aita, K.; Nakagawa, K.; Kondo, T.; Asaka, M.; Okada, F.; Kobayashi, M. "Synergistic up-regulation of Hexokinase-2, glucose transporters and angiogenic factors in pancreatic cancer cells by glucose deprivation and hypoxia." *Experimental Cell Research*. 313(15), 2007, pàgs. 3337-48.

[70] WIKIPEDIA. Melsa. <https://ca.wikipedia.org/wiki/Melsa> [Consulta: 19.10.2017]

[71] Kunjachan, S.; Pola, R.; Gremse, F.; Theek, B.; Ehling, J.; Moeckel, D.; Hermanns-Sachweh, B.; Pechar, M.; Ulbrich, K.; Hennink, E. W.; Storm, G.; Lederle, W.; Kiessling, F.; Lammers, T. "Passive vs. Active Tumor

Targeting using RGD-and NGR-modified Polymeric Nanomedicines”. *Nano letters*. 14 (2), 2014, pàgs. 972–981.

[72] Onoue, S.; Yamada, S.; Chan, H. “Nanodrugs: pharmacokinetics and safety”. *International Journal of Nanomedicine*. 9, 2014, pàgs. 1025–1037.

Fonts gràfiques

FIGURA 1: Referència [12]

FIGURA 2: Referència [23]

FIGURA 3: VIQUIPÈDIA. Cromosoma 11. [https://es.wikipedia.org/wiki/Cromosoma_11_\(humano\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Cromosoma_11_(humano)) [08.08.2017]

FIGURA 4: <http://media.clinicaladvisor.com/images/dsm/ch2374.fig1.jpg> [09.08.2017]

FIGURA 5: UNIVERSITÉ LAVAL. Le muscle squelettique.

<http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/20639/ch01.html> [Consulta: 09.09.2017]

FIGURA 6: Park, M. “Molecular Dynamics Simulations of the Human Glucose Transporter GLUT1” *PLOS one*. 2015.

FIGURA 7: VIQUIPÈDIA. Dasatinib. <https://ca.wikipedia.org/wiki/Dasatinib> [Consulta: 08.10.2017]

FIGURA 8: Font: Ref. 54

FIGURA 9: Referència [9]

FIGURA 10: Jaina, K. J.; Foya, P.S.; Erokwub, B.; Dimitrijevic, S.; Flask, A. F.; Labhasetwar, V. “Magnetic resonance imaging of multifunctional pluronic stabilized iron-oxide nanoparticles in tumor-bearing mice”. *Biomaterials*. 30(35), 2009, pàgs. 6748-6756

FIGURA 11: CHARLES RIVER. Athymic Nude Mouse. <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/athymic-nude-mouse?loc=ES> [consulta: 04.08.2017]

FIGURA 12: TACONIC. Swiss Webster Outbred. <https://www.taconic.com/mouse-model/swiss-webster> [Consulta: 04.08.2017]

FIGURA 13: BIOMETHODOLOGY FOR LABORATORY MICE. Injections.

https://theodora.com/rodent_laboratory/injections.html [Consulta: 04.08.2017]

FIGURA 14: SLIDESHARE. Immunohistoquímica, Liliana Maria Agresott Beltran.

<https://es.slideshare.net/lilianabeltran/inmunohistoquimica-28470727> [21.07.2017]

FIGURA 15-23: Elaboració pròpia.

FIGURA 24: Treball de de Recerca de Mireia Batalla. 2015.

FIGURA 25: ACCESS MEDICINA.

http://accessmedicina.mhmedical.com/data/books/1473/armendariz_ch11_fig-11-02.png [20.11.2017]

FIGURA 26: Treball de de Recerca de Mireia Batalla. 2015.

FIGURA 27: Elaboració pròpia.

FIGURA 28: Referència [57]

FIGURA 29: Referència [58]

FIGURA 30-39: Elaboració pròpia.

FIGURA 40: Referència [59]

FIGURA 41: Mark, J.; Ratain, M.D.; William K. "Principles of Pharmacokinetics". *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.* 2003.

FIGURA 42: Referència [9]

Fonts orals

Doctor Ángel Montero Carcaboso

Maria Cuadrado Vilanova

Helena Castillo Éclija

Guillem Pascual Pasto