Influència de la pèrdua epigenètica en la transformació metabòlica de la patologia del càncer

Estudi del paper de la metilació del gen SVIP en el canvi del metabolisme energètic de les cèl·lules cancerígenes que segueixen el fenotip de l'efecte Warburg

Elizabeth Blackburn

Treball de Recerca 2n de Batxillerat

AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria agrair el suport a l'entitat Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (ICJ), concretament a l'edifici IMPPC, que és on vaig realitzar l'estada de pràctiques, per la seva col·laboració en obrir-me les portes del seu laboratori i haver-me permès realitzar la meva part experimental en les seves instal·lacions. En especial a en Pere Llinàs Arias, l'investigador a qui vaig acompanyar durant la meva estada.

També vull mostrar el meu agraïment, d'una banda, a l'Alejandro Rodríguez, que molt amablement em va ajudar a participar en el programa de pràctiques de l'IJC, i a l'Olga Arenas per posar-me en contacte amb ell. I d'altra banda, a l'Érika González per facilitar-me informació sobre el metabolisme cel·lular, que ha resultat molt útil en la realització de la part teòrica.

Per últim, vull donar les gràcies a la Mª José Hellín pel seu suport i atenció en els inicis de la recerca i a la meva tutora del treball pels seus consells, el seguiment i l'atenció que m'ha proporcionat, perquè las seva ajuda ha estat imprescindible en aquest procés de recerca.

ABSTRACT

Estudio del efecto de las alteraciones epigenéticas, concretamente del silenciamiento del gen SVIP, en la reprogramación metabólica durante el desarrollo de la enfermedad del cáncer. Se ha realizado a partir de la descripción teórica del metabolismo celular, focalizándose en las reacciones catabólicas. Se incluye el análisis de la proliferación descontrolada y agresiva de las células tumorales y de cómo estas se alejan de realizar la respiración mitocondrial de glucosa y hacen uso de la fermentación láctica como mecanismo de obtención rápida de energía. A partir de la explicación del artículo "Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum–associated degradation inhibitor SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming" y de las técnicas epigenéticas empleadas en este, gracias a la participación de ellas en los laboratorios del Instituto de Investigación con la Leucemia Josep Carreras, se ha complementado la investigación. Finalmente, se concluye pues con la intervención de la metilación de SVIP en la inducción a la reprogramación metabólica.

Study of the epigenetic alteration of the SVIP gene' silencing and how it modifies the metabolic pathways, used by cancer pathology during its development. Starting with the theoretical description of the cellular metabolism, focused on catabolic reactions, the uncontrolled and aggressive proliferation of tumor cells and the realisation of the lactic fermentation as a quickly energy obtaining mechanism instead of the mitochondrial glucose respiration, are analysed. The research is completed with the article "Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum–associated degradation inhibitor SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming" and with the techniques that it exposes and that I could participate in thanks to "Institut d'Investigació amb la Leucèmia Josep Carreras". Finally, it is concluded that the methylation of SVIP gene takes part in the inducement of metabolic reprogramming in cancer.

Sumari

BLOC I

1. INTRODUCCIÓ 1

2. OBJECTIUS 2

3. HIPÒTESI 3

4. METODOLOGIA 3

BLOC II: Marc teòric

1. INTRODUCCIÓ AL METABOLISME CEL·LULAR 5

1.1 Adenosinatrifosfat 5

1.1.1 Síntesi de l'adenosinatrifosfat 6

1.2 Vies metabòliques 7

1.4 Control metabolisme 8

1.4.1 Biocatalitzadors 8

1.4.2 Activitat dels catalitzadors 9

1.4.3 Enzims 9

1.4.3.1 Coenzims d'oxidació i reducció 10

1.4.3.2 Coenzims de transferència 11

1.4.3.3 Activitat enzimàtica 11

1.4.3.4 Factors que influeixen en l'activitat enzimàtica 12

1.4.3.5 La regulació de les vies metabòliques 12

2. CATABOLISME 14

2.1 Tipus de catabolisme 15

2.2 Catabolisme per respiració 15

2.2.1 El catabolisme respiratori de la glucosa 15

2.2.1.1 La glicòlisi 16

A) Etapes de la glicòlisi 17

2.2.1.2 El cicle de Krebs 18

2.2.1.3 El transport d'electrons en la cadena respiratòria 21

A) El transport d'electrons 21

B) La quimioosmosi 22

C) La fosforilació oxidativa 23

2.3 Catabolisme per fermentació 24

2.3.1 La fermentació làctica 24

3. INTRODUCCIÓ A LES CÈL·LULES TUMORALS 26

3.1 Hallmarks del càncer 27

3.1.1 Independència dels senyals de creixement 28

3.1.2 Insensibilitat a estímuls que inhibeixen el creixement 28
3.1.3 Invasió i metàstasi 29
3.1.4 Evasió d'apoptosi 30
3.1.5 Potencial il·limitat de replicació 30
3.1.6 Angiogènesi sostinguda 31
3.1.7 Evasió de la destrucció immune 31
3.1.8 Reprogramació del metabolisme energètic 32
3.1.8.1 L'efecte Pasteur, l'efecte Warburg i la petjada bioenergètica 32
4. METABOLISME DE LES CÈL·LULES PROLIFERATIVES 34
4.1 Reprogramació metabòlica del càncer 35
4.1.1 Microambient tumoral 37
4.1.1.1 Situacions que generen microambient tumoral 38
A) Inflamació tumorigènica 38
B) Inestabilitat genòmica 39
4.1.2 Alteracions que produeixen disfunció bioenergètica dels mitocondris i afavoreixen i permeten la supervivència de les cèl·lules tumorals 40
4.1.2.1 c-MYC 41
4.1.2.2 HIFα1 41
4.1.2.3 Akt 41
4.1.2.4 P53 42
4.1.2.5 P97/VCP (SVIP) 42

BLOC III: Marc pràctic

1. LA METILACIÓ DE SVIP 45
1.1 Silenciament transcripcional de SVIP 45
2.1 Característiques supressores de tumors del SVIP 54
2.2 Restauració del SVIP 54
2.3 Inducció d'un canvi metabòlic de SVIP 55
2.3.1 Recuperació de proteïnes 55
2.3.2 Disminució de la captació de glucosa 56
2.3.3 Canvi del fenotip de glicòlisi aeròbica 56
2.3.4 Ús a nivell terapèutic 58
CONCLUSIONS 62
BIBLOGRAFIA 66
WEBGRAFIA 67
GLOSSARI 71

BLOC I

1. INTRODUCCIÓ

El funcionament del cos humà sempre ha resultat un tema apassionant per a mi. Durant el meu creixement personal, he anat adquirint coneixements que m'acostaven més a poder entendre'l. Malgrat que encara em trobo lluny de comprendre la complexitat del nostre organisme, cada vegada em sento més propera a fer-ho, a aprofundir en els mecanismes que utilitza per obtenir energia, créixer i desenvolupar-se.

La possibilitat de realitzar un estudi de recerca sobre qualsevol àmbit que fos del meu interès, em va portar a una situació de difícil elecció.
A raó que estic cursant un batxillerat científic amb l'assignatura de biologia, l'estudi dels sorprenents processos que el nostre cos és capaç d'iniciar per a garantir un correcte funcionament del metabolisme, és un tema que tracto habitualment, i és per això, que vaig decidir encetar la meva investigació seguint aquest camí. Davant la gran immensitat de continguts que abasta la biologia humana, no va ser pas una tria fàcil.
Des de la meva posició, sempre provo d'estar informada al respecte, escoltant l'opinió d'especialistes de la salut, i les diferents actualitzacions del món científic.

En un futur, m'agradaria dedicar-me a l'àmbit de les ciències de la salut, que trobo que combina prou bé els meus interessos i aficions. És per aquest motiu que, quan vaig trobar-me amb un article que unia els aspectes del metabolisme del cos humà i del seu funcionament davant d'una malaltia, vaig tenir clar que aquest seria el tema que volia tractar.

Com és possible que la glucosa, que resulta imprescindible per a la vida, pot resultar estimulant i contribuir al desenvolupament d'una de les principals causes de mort al món, que cada any afecta a més de 14 milions de persones? Parlo del càncer, malaltia que segons la previsió de l'OMS (Organització Mundial de la Salut) seguirà augmentant en nombre de casos, incrementant un 70% en els pròxims 20 anys. Tot i tractar-se d'una de les malalties més comunes entre la població, encara se'n desconeixen aspectes que influeixen en l'aparició i la posterior proliferació de les cèl·lules afectades.

És cert que existeixen tractaments pel càncer, com la quimioteràpia, els efectes secundaris dels quals poden arribar a ser perjudicials per al pacient. Per aquest motiu, actualment s'intenta comprendre quins canvis metabòlics s'associen concretament als

diferents tipus de tumors per aconseguir tractaments més específics. De la mateixa manera, s'està estudiant quines mutacions donen lloc a determinats canvis metabòlics, i si aquestes provoquen una sensibilitat cel·lular a la falta d'un nutrient en concret.

Sabent això, em vaig interessar a conèixer a fons quin era el funcionament del càncer, centrant-me en el metabolisme de degradació de la glucosa i en les transformacions que patia en el desenvolupament de les cèl·lules tumorals, amb el propòsit d'estudiar si seria possible utilitzar aquests coneixements per a tractar la malaltia d'una manera més efectiva i menys nociva per als pacients.

2. OBJECTIUS

Un cop escollit el tema de treball, era necessari concretar què volia extreure de la meva recerca, és a dir, estipular quines eren les meves expectatives, els meus objectius. Aquests es basen en:

- Estudiar els processos metabòlics que intervenen en l'obtenció d'energia de les cèl·lules.
- Definir les vies que utilitzen les cèl·lules cancerígenes per aconseguir energia i per a proliferar, tenint en compte els factors, reconeguts científicament en l'actualitat, que generen alteracions en el seu metabolisme.
- Contrastar el motiu pel qual les cèl·lules tumorals segueixen una determinada via glicolítica.
- Com a part pràctica del treball, realitzar, per una banda, una revisió i comprensió de l'estudi basat en la inducció a la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses que produeix SVIP i, per altra banda, una experiència a un laboratori de les instal·lacions del IJC, per observar i entendre les tècniques epigenètiques d'avantguarda empleades en l'estudi revisat.
- Aprofitar la pràctica de laboratori per acostar-me i establir contacte físic amb el món de la recerca, els seus mètodes, el seu instrumental i les seves instal·lacions.

3. HIPÒTESI

Després de determinar els meus objectius, vaig fer una primera cerca que em va permetre disposar de la informació bàsica per elaborar la meva hipòtesi, que enunciaré a continuació:

> *Els canvis metabòlics que, seguint el fenotip descrit per l'efecte Warburg, inhibeixen la respiració mitocondrial de la glucosa en favor de la fermentació làctica, són mediats per alteracions epigenètiques.*

Amb la hipòtesi enllestida, donava peu a l'inici de la investigació.

4. METODOLOGIA

Pel que fa a la metodologia emprada en la realització del treball, cal mencionar que la investigació parteix de conceptes més generals i acaba centrant-se en un aspecte concret.

Primerament, he iniciat la recerca amb informació introductòria del tema per a poder establir la hipòtesi a partir de la qual es desenvoluparia el treball.

A continuació, he començat la realització de la part teòrica investigant a través de diferents fonts d'informació, recorrent sobretot a les dades científiques ja demostrades en articles científics.

Per poder assolir els objectius proposats, en primer lloc, he estudiat el metabolisme cel·lular, centrant-me en el catabolisme de la glucosa, tenint en compte les diferents vies catabòliques de què disposa l'organisme per a la degradació d'aquest glúcid i per la posterior obtenció d'energia i formació d'estructures. Posteriorment, he aprofundit en les diferents fases que es produeixen en els mecanismes d'aprofitament de la glucosa i en els diferents elements i aspectes que intervenen en aquests processos durant el correcte funcionament de les cèl·lules eucariotes.

Seguidament, he analitzat el funcionament de les cèl·lules cancerígenes i les causes que generen una desviació del desenvolupament apropiat per a les cèl·lules cap al creixement extraordinari que caracteritza les cèl·lules de la malaltia del càncer.

A partir d'aquí, he passat a centrar-me en el catabolisme de la glucosa, que dista del que es dona habitualment a la resta de cèl·lules de l'organisme, i en la seva influència en l'evolució de la patologia.

Atès que m'he assabentat que no és un únic factor el que produeix l'alteració de la ruta catabòlica, he esmentat breument alguns dels aspectes que han estat identificats com a punts clau influents, per acabar aprofundint en el SVIP, un gen important en la malaltia del càncer. Concretament, m'he centrat en la influència de la seva metilació en l'alteració del catabolisme de degradació de la glucosa.

La part pràctica del treball aprofundeix doncs en la revisió i comprensió de l'estudi «Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum-associated degradation inhibitor SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming» publicada el març del 2019 en el Journal of Clinical Investigation Insight. He realitzat un aprofundiment en el funcionament d'aquelles tècniques epigenètiques realitzades en aquest estudi demostratiu de la influència de la metilació de SVIP en la malaltia del càncer. M'he basat en la meva experiència d'observació i participació de diferents tècniques que han estat empleades a la investigació epigenètica en l'estada al laboratori: maneig de cultius cel·lulars i pellets, extracció d'ADN, conversió de Bisulfit, PCR de Bisulfit, PCR quantitativa, extracció de proteïnes, quantificació i Western Blot.

Finalment he realitzat la valoració de l'acompliment dels objectius proposats, he donat resposta a la meva hipòtesi inicial i he extret diverses conclusions de la meva recerca.

A continuació trobareu el resultat de tot aquest temps d'esforç, dedicació i, sobretot, de recerca.

BLOC II: Marc teòric

1. INTRODUCCIÓ AL METABOLISME CEL·LULAR

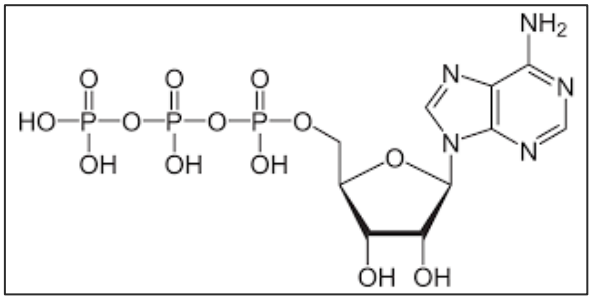
El metabolisme cel·lular és el conjunt de reaccions químiques que es produeixen a l'interior de les cèl·lules i que els permeten obtenir matèria per créixer i energia per dur a terme les tres funcions vitals: nutrició, reproducció i relació.
Es tracta de reaccions catalitzades enzimàticament.

El metabolisme engloba tot un conjunt de processos en què s'inclouen: l'obtenció d'energia química de les molècules combustibles o de la llum absorbida, la conversió dels principis nutritius exògens[1] en molècules precursores dels components macromoleculars de la cèl·lula, l'assemblatge d'aquests materials per formar proteïnes, àcids nucleics, lípids i altres components cel·lulars o la formació i degradació de les biomolècules necessàries per les funcions especialitzades de la cèl·lula.

Aquests processos s'originen mitjançant la transformació d'unes biomolècules en altres, és a dir, a partir de reaccions químiques, que anomenem vies metabòliques, on hi intervenen diferents molècules, els metabòlits. Així, a partir d'un substrat o metabòlit inicial, que pateix unes alteracions regulades per enzims, s'obtenen diferents productes. Aquest conjunt de reaccions formen part del metabolisme intermediari. Entenem que la primera reacció tindrà uns productes, que alhora seran els reactius de la següent reacció, i així successivament fins a arribar al producte final.

1.1 Adenosinatrifosfat

La transferència d'energia entre les reaccions es fa mitjançant una "unitat energètica comú": la molècula d'ATP.
L'adenosinatrifosfat o ATP és una molècula present en tots els éssers vius que constitueix la principal font d'energia utilitzable per les cèl·lules per realitzar les seves diferents activitats.
Es tracta d'un nucleòtid[2] que presenta la capacitat d'emmagatzemar o



Il·lustració 1: Molècula d'adenosinatrifosfat formada per tres grups fosfats units entre ells amb dos enllaços esterfosfòrics (esquerra), units a una ribosa (centre) que alhora s'uneix amb una adenina (dreta).

[1] **Principis nutritius exògens**: nutrients formats a l'exterior del cos.
[2] **Nucleòtid**: unitats estructurals bàsiques dels àcids nucleics, compostes per molècules d'àcid fosfòric, un glúcid de cinc carbonis, és a dir, una pentosa, i bases nitrogenades.

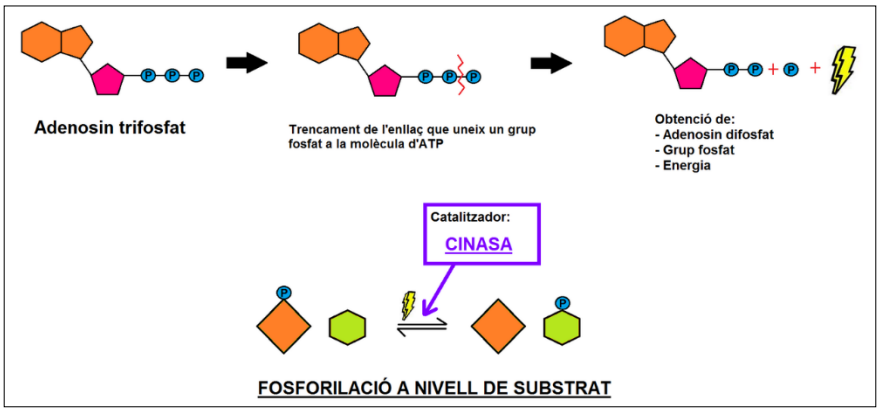
alliberar energia amb molta facilitat. Aquesta funció es pot atribuir al fet que disposa de dos enllaços esterfosfòrics que acumulen cadascun d'ells 7,3 kcal/mol.

Quan es produeix la hidròlisi[3], en la desfosforilació[4] de la molècula, es trenca el seu últim enllaç esterfosfòric, produint així ADP (adenosinadifosfat) i una molècula d'àcid fosfòric (H_3PO_4) i alliberant energia. L'ADP també pot ser hidrolitzat seguint el mateix procés explicat anteriorment, però produint, en aquest cas, una molècula d'AMP (adenosinamonofosfat).

1.1.1 Síntesi de l'adenosinatrifosfat

La síntesi de l'ATP es pot realitzar de dues formes:

- Fosforilació a nivell de substrat: síntesi d'ATP a partir de l'energia alliberada pels enllaços amb fosfats presents en altres biomolècules. Aquestes molècules presenten un nivell d'energia més alt que l'ADP i són capaces de transferir-li l'enllaç amb el grup fosfat. És a dir, se sintetitza l'ATP amb l'energia alliberada per biomolècules, que anomenem substrat, quan trenquen algun dels seus enllaços rics en energia. Aquesta reacció en sentit invers, la transferència de fosfat des de l'ATP a altres molècules de nivell energètic inferior és la forma de transferència energètica del metabolisme. Aquest procés es produeix en determinades reaccions químiques de la glicòlisi i del cicle de Krebs. Els enzims que regulen aquests processos són les quinases.



Il·lustració 2: Esquema gràfic de la desfosforilació de l'ATP i de la fosforilació a nivell de substrat. D'una molècula ATP amb tres grups fosfats se'n separa un dels tres, trencant-se l'enllaç èster, deixant-ne dos a la molècula d'ADP i produint un alliberament d'energia, produint la desfosforilació de l'ATP (part superior). Gràcies a aquesta energia i a l'acció de l'enzim catalitzador cinasa, es pot transferir el grup fosfat d'una molècula a una altra, produint doncs la fosforilació a nivell de substrat (part inferior).

[3] **Hidròlisi**: catàlisi (trencament) d'un enllaç químic a través de l'adició d'aigua.
[4] **Desfosforilació**: procés essencial per treure els grups fosfat d'un compost orgànic (com l'ATP) per hidròlisi.

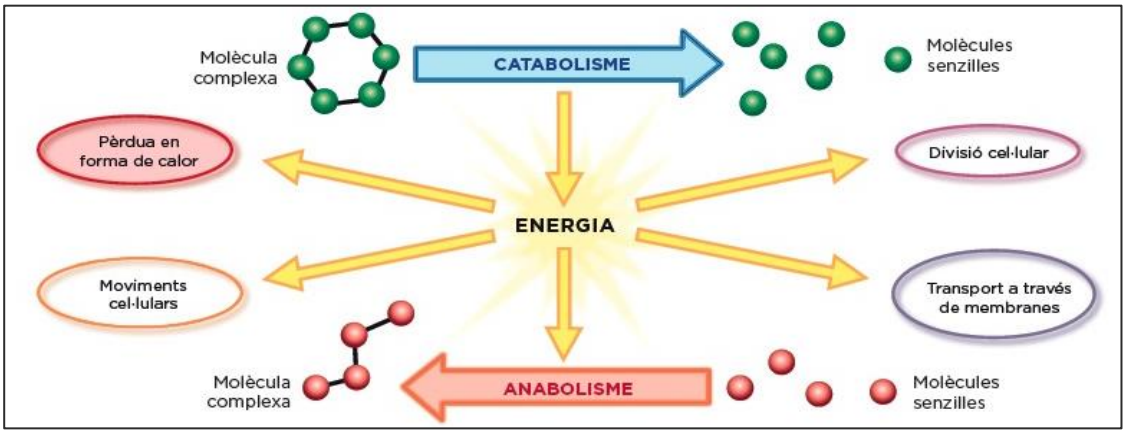
- Acció d'enzims del grup de les ATP-sintetases[5]: síntesi d'ATP mitjançant els enzims ATP-sintetases, que es troben a les crestes dels mitocondris i als tilacoides[6] dels cloroplasts**,** quan són travessats per un flux de protons (H^+).

1.2 Vies metabòliques

Les vies metabòliques es poden dividir en dos tipus, les vies anabòliques i les vies catabòliques.

La principal característica que defineix els processos anabòlics és l'obtenció de molècules complexes a partir de molècules senzilles gràcies al subministrament d'energia procedent dels enllaços fosfat de les molècules d'ATP. Són processos divergents ja que, partint d'un nombre reduït de substrats, s'arriba a una gran diversitat de productes. Generalment són processos de reducció que consumeixen energia.

En canvi, els processos catabòlics són aquells a través dels quals s'obtenen molècules senzilles a partir de la degradació d'altres de més complexes alliberant, d'aquesta manera, energia que s'emmagatzema a les molècules d'ATP. Generalment són processos convergents, ja que d'un ampli ventall de substrats s'arriba a un conjunt reduït de productes, que acostumen a estar molt oxidats, com el piruvat, l'acetil-CoA o el CO_2. Així doncs, solen ser processos oxidatius que alliberen energia.



Il·lustració 3: Esquema gràfic dels processos metabòlics. A partir de molècules complexes obtenim molècules senzilles gràcies a les reaccions d'oxidació del catabolisme, que desprenen energia. Aquesta, d'una banda, és utilitzada per les reaccions de reducció de l'anabolisme per a sintetitzar molècules complexes a partir de molècules senzilles. D'altra banda l'energia de les reaccions catabòliques s'utilitza en processos com la divisió cel·lular, el transport a través de les membranes, els moviments cel·lular, o bé, es perd en forma de calor.

[5] **ATP-sintetases**: complex enzimàtic de membrana que combina la síntesi i/o hidròlisi d'ATP amb el transport de protons a través d'una membrana.
[6] **Tilacoides**: vesícula que forma part de l'estructura de la membrana interna del cloroplast.

1.4 Control metabolisme

Els diferents tipus de reaccions químiques que es produeixen a l'interior de les cèl·lules poden tenir com a finalitat sintetitzar noves molècules o degradar les existents. Les substàncies que hi intervenen són molt estables a temperatura ambient, per aquest motiu requereixen factors que permetin la interacció. D'aquesta manera, aquests elements permeten el control bioquímic del metabolisme, perquè permeten a les cèl·lules regular quines reaccions s'han de donar i en quin moment.

Totes les reaccions del metabolisme estan regulades per biocatalitzadors, hormones o enzims específics per cada metabòlit inicial o substrat i per cada tipus de transformació.

1.4.1 Biocatalitzadors

Els biocatalitzadors o catalitzadors biològics són les substàncies que intervenen en les reaccions químiques dels éssers vius, són de naturalesa orgànica i es classifiquen en tres grans grups:

- Els enzims: de naturalesa generalment proteica, són fabricats per les cèl·lules, són propis de cada espècie i intervenen en les reaccions químiques immediates[7]. En moltes reaccions poden actuar tant de forma anabòlica com catabòlica, així doncs, moltes reaccions del metabolisme es produeixen en ambdós sentits i estan catalitzades, en els dos sentits, pel mateix enzim.
  No obstant, hi ha enzims que actuen en un únic sentit i exerceixen una regulació específica. Afegint-hi que, en tota ruta metabòlica, sol haver-hi, com a mínim, una reacció que és molt favorable termodinàmicament i per aquest motiu es produeix únicament en un sentit. Aquestes reaccions, actuen com a punt de control, atès que si no hi ha suficient substrat o s'inhibeix l'enzim que les catalitza, la ruta metabòlica es deté.

- Les vitamines: de naturalesa diversa, són produïdes generalment pels vegetals, han de ser incorporades de l'exterior i intervenen en les reaccions químiques immediates.

[7] **Reaccions químiques immediates:** es produeixen sense la intervenció d'energia externa, s'efectuen posant en contacte les substàncies.

- Les hormones: són molècules secretades per determinades glàndules que actuen com a missatgers químics específicament sobre determinades cèl·lules, i, d'aquesta manera, regulen el metabolisme intern. Són pròpies dels organismes pluricel·lulars, atès que moltes cèl·lules fan funcions o produeixen substàncies que no són per al seu propi benefici sinó pel benefici de l'organisme. Les hormones s'encarreguen d'un altre tipus de control bioquímic, el sistema hormonal o sistema endocrí.

1.4.2 Activitat dels catalitzadors

La funció dels catalitzadors és accelerar les reaccions químiques disminuint l'energia d'activació necessària perquè s'iniciï el procés desitjat. Definim energia d'activació com aquella energia que es requereix per dur 1 mol de molècules d'una substància, a una temperatura determinada, fins a l'estat de transició, un estat molt inestable en què són debilitats i trencats els enllaços dels reactius. Això, requereix una elevada quantitat d'energia, i per això és necessària aquesta aportació extra d'energia, tant si la reacció és endotèrmica[8] com si és exotèrmica[9]. Les molècules encarregades de dur a terme aquesta funció s'anomenen catalitzadors biològics o biocatalitzadors.

1.4.3 Enzims

Tots els enzims, exceptuant els ribozims[10], són proteïnes globulars, solubles en aigua, que es difonen bé en els medis interns i que poden actuar de manera intracel·lular, a l'interior de la cèl·lula on s'han format, o extracel·lular, a la zona on són secretats. Pel fet de disposar d'una estructura proteica, cada organisme fabrica els seus propis enzims a partir de la informació continguda en l'ADN.

Els enzims compleixen les dues característiques de tots els catalitzadors:

- No es consumeixen ni es modifiquen durant la reacció.
- Actuen rebaixant la quantitat d'energia d'activació i augmentant la velocitat de la reacció; per tant, redueixen el temps total de la reacció.

A més a més, els enzims presenten altres característiques:

- Són molt específics pel que fa a la reacció que catalitzen i al substrat al qual s'uneixen.

---

[8] **Reacció endotèrmica**: reaccions que absorbeixen energia de l'entorn.
[9] **Reacció exotèrmica**: reaccions que desprenen energia a l'exterior.
[10] **Ribozims**: àcids ribonucleics (ARN) amb capacitat enzimàtica.

- Són molt actius, alguns aconsegueixen augments de la velocitat de la reacció de més d'un milió de vegades, molt superior als catalitzadors no biològics.
- Sempre actuen a temperatura ambient, és a dir, a la temperatura de l'ésser viu.
- Tenen un pes molecular molt elevat, atès que són macromolècules.

Segons la seva estructura en distingim dos tipus, d'una banda els enzims estrictament proteics formats per aminoàcids, els oligoelements[11]**,** que es troben en quantitats molt petites, com el Mg^{2+} en les cinases i el Zn^{2+} en els enzims carboxipeptidases. D'altra banda, trobem els anomenats holoenzims, que actuen amb l'ajuda d'estructures no proteiques unides per interaccions febles. En aquest cas, la part proteica s'anomena apoenzim i la part no proteica, cofactor.

Els cofactors poden ser ions, com el Ca^{2+}, el Mg^{2+}, i el Cl^{-} , i s'anomenen cofactors inorgànics; o bé molècules orgàniques, anomenades coenzims, com és el cas de moltes vitamines. Si el coenzim s'uneix a l'apoenzim de forma permanent, aleshores rep el nom de grup prostètic, com en qualsevol heteroproteïna[12]. Un mateix cofactor o coenzim pot formar part de diversos enzims. Els coenzims més importants són l'ATP, el NAD^{+}, el coenzim A (CoA) i les vitamines.
Els coenzims són transportadors de grups químics i, a diferència dels apoenzims, sí que pateixen una modificació durant la reacció.
En distingim dos tipus: els coenzims d'oxidació i reducció i els coenzims de transferència.

1.4.3.1 Coenzims d'oxidació i reducció

Els coenzims d'oxidació i reducció són aquells que transporten els protons (H^{+}) i electrons (e^{-}). El seu nom prové del fet que oxidació és la pèrdua d'electrons i reducció n'és el guany. Els més importants són la nicotinamida-adenina-dinucleòtid [13](NAD^{+}), la flavina-adenina-dinucleòtid [14](FAD) i el grup hemo de la citocromoxidasa[15]. Tots ells s'obtenen de la dieta, a partir de les vitamines.

---

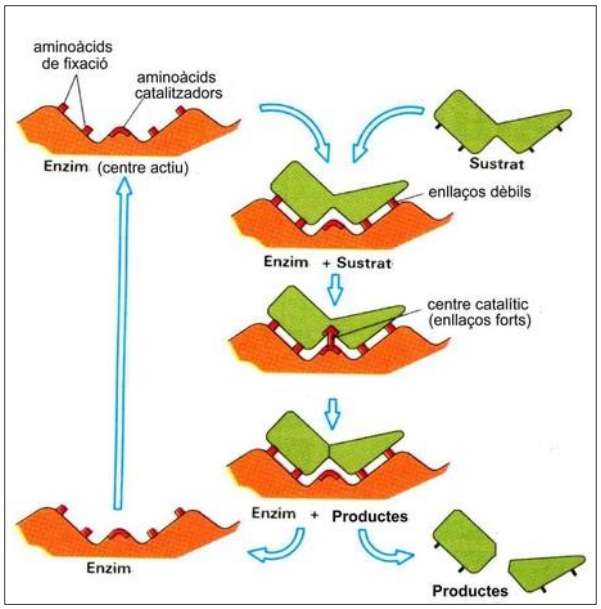
[11] **Oligoelements**: bioelements que es presenten en molt baixa proporció.
[12] **Heteroproteïna**: molècules que presenten una part proteica i una altre no proteica.
[13] **NAD+**: coenzim que s'encarrega de l'intercanvi de protons i electrons i de la producció d'energia de totes les cèl·lules.
[14] **FAD**: coenzim que intervé en les reaccions metabòliques d'oxidació-reducció.
[15] **Citocromoxidasa**: últim enzim de la cadena de transport d'electrons del mitocondri.

1.4.3.2 Coenzims de transferència

Són els que s'encarreguen del transport de diferents radicals**.** Els més importants són l'adenosinatrifosfat (ATP) i l'acetil-CoA[16] (CoA-SH). L'ATP actua transportant grups fosfat (-H_2PO_4) per donar-los a altres molècules. També es pot unir a diversos enzims catabòlics al·lostèrics[17], i aleshores en disminueix l'afinitat pel substrat, actuant com a inhibidor. En canvi, l'ADP es pot unir a aquests mateixos enzims i augmentar-ne l'afinitat pel substrat, actuant com a activador. L'acetil-CoA actua transportant grups acetil (-CO-CH_3) i en la seva formació intervé l'àcid pantotènic o vitamina B_5[18].

1.4.3.3 Activitat enzimàtica

Les substàncies sobre les quals actua un enzim s'anomenen substrats, i les substàncies que es produeixen després de la reacció s'anomenen productes. L'especificitat enzimàtica genera la unió entre l'enzim i el substrat en un punt concret de l'enzim, anomenat centre actiu, format per una sèrie d'aminoàcids que queden junts un cop la molècula s'ha replegat formant l'estructura terciària[19]. El conjunt format pel substrat i l'enzim s'anomena complex enzim-substrat. Un cop s'ha dut a terme la unió del substrat o substrats a l'enzim, es produeix la reacció química i, seguidament, els productes se separen de l'enzim. Els enzims no formen mai part dels productes de la reacció i quan queden lliures estan a punt per tornar a actuar, això fa que siguin necessaris en poca quantitat.



Il·lustració 3: Esquema gràfic de l'activitat enzimàtica. Un enzim conté en el centre actiu: aminoàcids de fixació, que formen enllaços febles amb el substrat, perquè es pugui produir la unió del substrat a l'enzim, i aminoàcids catalitzadors, que formen enllaços forts amb el substrat, perquè es pugui produir la transformació d'enzims a productes, els quals finalment s'alliberen de l'enzim, i aquest pot tornar a actuar sobre un altre substrat de nou.

---

[16] **Acetil-CoA**: molècula intermediària clau del metabolisme que intervé en un gran nombre de reaccions bioquímiques.
[17] **Enzims catabòlics al·lostèrics**: enzims que canvien la seva conformació al unir-se'ls un efector.
[18] **Àcid pantotènic** o **Vitamina B_5**: vitamina hidrosoluble necessària per a la formació del coenzim A i considerada crítica en el metabolisme i síntesi de glúcids, lípids i proteïnes.

[19] **Estructura terciària**: disposició tridimensional dels àtoms que formen l'enzim.

1.4.3.4 Factors que influeixen en l'activitat enzimàtica

Hi ha dos factors externs que poden influir en l'activitat dels enzims:

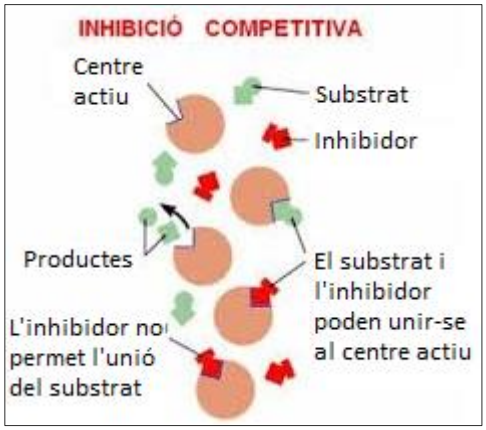
- Temperatura. Si augmenta la temperatura, les molècules es mouen més ràpidament, per tant, el nombre de trobades entre l'enzim i el substrat augmenta i augmenta la velocitat de la reacció. Hi ha una temperatura òptima per a la qual l'activitat enzimàtica és màxima. Si la temperatura continua augmentant, arribarà un moment en què l'enzim, que és una proteïna, es desnaturalitzarà, perdrà la seva forma i deixarà de funcionar.
- Variacions de pH: Els enzims presenten dos valors límit de pH entre els quals són eficaços. Traspassats aquests valors, els enzims es desnaturalitzen i deixen d'actuar. Això es dona pel fet que el pH modifica les càrregues elèctriques de la molècula i això produeix canvis en la seva conformació tridimensional. Entre els dos límits hi ha un pH òptim en el qual l'enzim presenta la màxima activitat. La pepsina[20] de l'estómac, presenta un valor òptim a pH = 2, i la fosfatasa alcalina [21]de l'intestí a pH = 12.

1.4.3.5 La regulació de les vies metabòliques

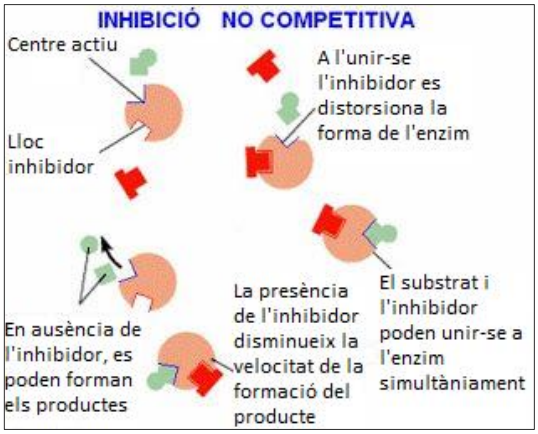
La regulació de les vies metabòliques es pot produir, d'una banda, inhibició feed-back/retroinhibició, un procés en què es disminueix la síntesi dels enzims que intervenen a les vies, ja que s'uneix una substància determinada al centre actiu de l'enzim de manera permanent i suprimeix completament la seva activitat. I, d'altra banda, trobem la inhibició reversible, que consisteix en una inhibició temporal, en què l'enzim recupera la seva activitat quan deixa d'actuar l'inhibidor. Hi ha tres tipus d'inhibició reversible:

- Inhibició competitiva: l'inhibidor s'uneix al centre actiu de l'enzim de la mateixa manera que el substrat. Això succeeix quan les dues molècules, inhibidor i substrat, són molt semblants. Tots dos competeixen pel mateix lloc de l'enzim. El grau d'inhibició de l'enzim dependrà de la concentració relativa de les molècules implicades.

[20] **Pepsina**: enzim que segreguen algunes vàlvules de l'estómac dels vertebrats i que intervé en la digestió de les proteïnes.
[21] **Fosfata alcalina**: enzim hidrolasa que suprimeix grups fosfats de diferents tipus de molècules, com els enzims.



Il·lustració 4: Esquema gràfic de la inhibició competitiva. Tant l'inhibidor com el substrat poden unir-se al centre actiu, és doncs quan tots dos competeixen pel mateix lloc de l'enzim. Això succeeix quan les dues molècules, inhibidor i substrat, són molt semblants.



Il·lustració 5: Esquema gràfic de la inhibició no competitiva. L'inhibidor no actua sobre el centre actiu, s'uneix a una altre part de l'enzim i en distorsiona la forma. No obstant es pot donar que s'uneixin simultaniament, enxim i inhibidor, però la velocitat de formació de producte disminueix. Malgrat això, en ausència de l'inhibidor, el substrat s'uneix a l'enzim i pot formar els productes.

- Inhibició no competitiva: l'inhibidor no actua sobre el centre actiu, sinó que se situa en una altra part de l'enzim i en modifica l'estructura i, conseqüentment, l'activitat.

- Inhibició al·lostèrica: és pròpia d'uns enzims anomenats al·lostèrics, que, a més del centre actiu, tenen també un centre al·lostèric o centre regulador, al qual es pot unir una substància determinada, anomenada lligand o efector al·lostèric, que activa o inhibeix l'activitat de l'enzim provocant-li un canvi en la conformació.

A banda de la retroinhibició, la regulació de les vies metabòliques també es pot dur a terme per inducció enzimàtica, un mecanisme que, contràriament a la inhibició, consisteix en un augment en la síntesi dels enzims, també mitjançant els gens que els codifiquen.

Per tant, l'activitat d'un enzim es pot regular per mitjà de substàncies capaces d'inhibir-lo o d'activar-lo. Els activadors són molècules o àtoms que s'uneixen a l'enzim perquè pugui funcionar. L'enzim que necessita d'activadors es diu zimogen o proenzim, com ara el pepsinogen[22]. Els inhibidors són substàncies que disminueixen o, fins i tot, anul·len l'activitat d'un enzim sense destruir-lo.

[22] **Pepsinogen**: proenzim precursor de la pepsina.

2. CATABOLISME

Com ja hem vist anteriorment, el catabolisme és la fase degradant del metabolisme, per tant, engloba aquell conjunt de reaccions químiques que tenen com a finalitat l'obtenció d'energia. Gràcies a les vies metabòliques, es transformen molècules orgàniques en els productes finals del catabolisme, anomenats productes d'excreció, que generalment són expulsats de la cèl·lula.

Els processos catabòlics són similars en tots els organismes, tant autòtrofs com heteròtrofs i al llarg d'aquests es donen un seguit de transformacions que alliberen energia. A l'escindir una macromolècula es trenquen alguns enllaços interns donant lloc a un alliberament d'energia i a unes molècules resultants més petites que provoquen que en els productes el grau de desordre de la matèria sigui major.

Així doncs, la variació d'energia lliure continguda en les molècules és negativa, i aquesta s'allibera a l'exterior.

En canvi, en el catabolisme respiratori de la glucosa[23], com en altres processos, el nombre de molècules inicials és manté en el nombre de molècules resultants i, per tant, també els enllaços interns. En aquestes reaccions l'energia s'allibera perquè els electrons que formen els enllaços de les molècules inicials perden energia lliure quan passen a formar els enllaços de les molècules finals.

En la glucosa, els electrons que formen els enllaços entre els àtoms de carboni estan compartits de la mateixa manera, i els que formen els enllaços entre els àtoms de carboni i els d'hidrogen també. En unir-se amb un àtom d'oxigen, aquest els atrau amb més força perquè presenta una major electronegativitat[24], fent que passin a un estat de menys energia, i alliberant la resta d'energia. Això dona lloc a una reacció de transferència d'electrons en la qual, com a resultat, s'obté diòxid de carboni i aigua, juntament amb l'energia despresa. La glucosa s'oxida al perdre electrons, sent així l'agent reductor, mentre que l'oxigen guanya electrons i es redueix, l'anomenem oxidant.

Aquesta energia alliberada, a banda de ser energia química que s'emmagatzema en les molècules d'ATP, s'emet de forma gradual. Primerament, el catabolisme respiratori de la glucosa es produeix per un seguit de reaccions químiques successives, les quals estan regulades cadascuna d'elles per un enzim. Pel que fa al transport d'electrons de la glucosa, es manifesta a través de la pèrdua d'àtoms d'hidrogen per l'acció d'un enzim deshidrogenasa. A continuació, aquests àtoms d'hidrogen passen a un coenzim, generalment el NAD^+, que actua com a transportador d'hidrògens. Mitjançant dos

[23] **Glucosa**: monosacàrid formar per 6 àtoms de carboni.
[24] **Electronegativitat**: capacitat d'un àtom per atraure els electrons quan forma un enllaç químic en una molècula.

electrons i un protó es produeix la reducció del NAD^+, donant lloc a NADH i a un protó lliure. Per últim, els electrons continguts en el coenzims traspassen la cadena transportadora d'electrons, [25]constituïda bàsicament per citocroms[26], a través dels quals hi circulen els electrons passant cada vegada a un nivell energètic inferior de manera que es produeix un alliberament d'energia destinat a la fosforilació de l'ADP, generant així ATP de manera gradual. Per acabar, el parell d'electrons s'uneix amb el parell d'àtoms d'hidrogen i d'oxigen per formar aigua.

2.1 Tipus de catabolisme

Segons si en el procés catabòlic hi intervé la cadena transportadora d'electrons o no, podem distingir dos tipus de catabolisme:

- Respiració: hi intervé de la cadena transportadora d'electrons, els quals són transportats des de la matèria orgànica fins l'acceptor final. Si aquest és l'O_2 i forma aigua, parlem de respiració aeròbica. En canvi, si es tracta d'una substància diferent, com l'ió nitrat (NO_3^-) o l'ió sulfat (SO_4^{2-}), que s'oxiden, es formen l'ió nitrit (NO_2^-) o l'ió sulfit (SO_3^{2-}) respectivament.
- Fermentació: no hi intervé la cadena transportadora d'electrons i, per tant, no es transfereixen electrons des de la matèria orgànica fins l'acceptor final, per aquest motiu aquest sempre és un compost orgànic. Es produeix en situacions d'hipòxia o anaeròbiques. Tot i així, els electrons poden tornar a oxidar el NAD^+, imprescindible per a la realització de la glicòlisi.

2.2 Catabolisme per respiració

Les reaccions catabòliques per respiració són diferents segons la naturalesa dels **substrats**. Així doncs, podem distingir entre la respiració dels glúcids, la dels lípids, la de les proteïnes i la dels àcids nucleics.

2.2.1 El catabolisme respiratori de la glucosa

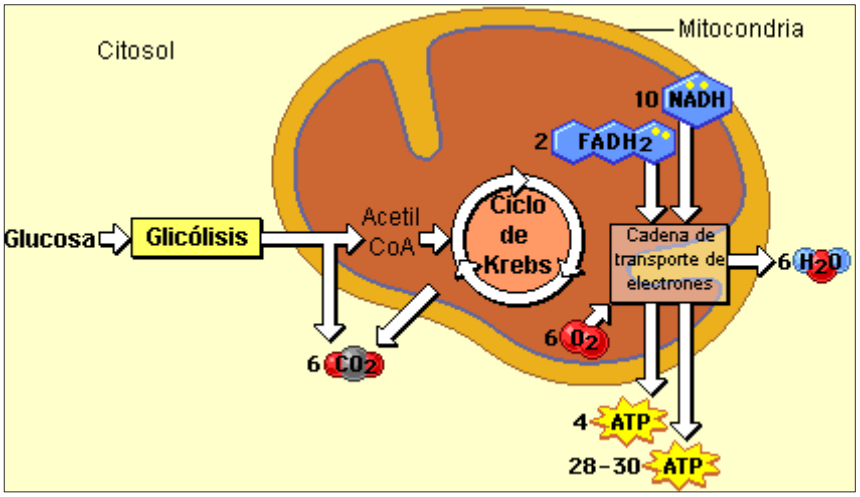
La glucosa és el monosacàrid més abundant en els éssers vius. Les diferents reaccions que es produeixen en la respiració de la glucosa en les cèl·lules eucariotes es separen en dues fases, la glicòlisi, que es produeix en el citosol[27], i la respiració, que es produeix als **mitocondris**[28]. Aquesta segona fase es divideix en dos

[25] **Cadena transportadora d'electrons**: sèrie de transportadors d'electrons que es troba a la membrana interna mitocondrial, que mitjançant reaccions bioquímiques produeix ATP.
[26] **Citocroms**: proteïnes encarregades del transport de l'energia química.
[27] **Citosol**: líquid que es localitza a l'interior de les cèl·lules.
[28] **Mitocondris**: orgànuls cel·lulars encarregats de subministrar la major part de l'energia necessària per a l'activitat cel·lular.

processos: el cicle de Krebs, a la matriu mitocondrial[29], i el transport d'electrons en la cadena respiratòria, que té lloc a la membrana de les crestes mitocondrials[30].

Pel que fa a les cèl·lules procariotes, la glicòlisi i el cicle de Krebs es produeixen al citosol, mentre que el transport d'electrons en la cadena respiratòria es dona a la membrana plasmàtica[31].

La respiració cel·lular és el procés pel qual les cèl·lules aeròbiques en condicions normals, desprès d'obtenir piruvat, el degraden a CO_2 i H_2O, obtenint energia en forma d'ATP.



Il·lustració 6: Esquema gràfic de la respiració mitocondrial de la glucosa. La glucosa entra en la primera fase de la respiració produïda al citosol, la glicòlisi, i forma, entre altres, 2 molècules de CO_2, 2 piruvats que s'oxiden a 2 Acetil-Coa. Aquests últims, entren a la matriu mitocondrial al cicle de Krebs, la segona fase, en la que produeix diferents molècules energètiques ($NADH+H^+$, $FADH_2$ i GTP), els electrons de les quals passen per la cadena de transport d'electrons a la membrana mitocondrial interna, la tercera i última fase, en la que l'acceptor final dels electrons és l'O_2, que es redueix a H_2O. Les molècules energètiques es transformen en ATP i, gràcies al flux de protons que passen de la matriu mitocondrial a l'espai intermembranós a través de l'ATP-sintetasa, aquesta sintetitza 4 ATP. El procés de la respiració de la glucosa en total produeix 38 ATP.

2.2.1.1 La glicòlisi

La glicòlisi és la primera fase del catabolisme de la glucosa en la qual, per cada molècula de glucosa ($C_6H_{12}O_6$), s'obtenen dues molècules d'àcid pirúvic (CH_3-CO-COOH) i dues molècules d'energia emmagatzemada en forma d'ATP, mitjançant la fosforilació produïda pel substrat.

[29] **Matriu mitocondrial**: espai aquós comprès dins la membrana mitocondrial interna.
[30] **Membrana de les crestes mitocondrials**: membrana interna de la mitocondri caracteritzada per tenir replecs en forma de crestes.
[31] **Membrana plasmàtica**: bicapa lipídica que delimita la cèl·lula.

S'hi poden distingir tres etapes que s'engloben en dues fases, una primera de consum d'energia, on tenen lloc la primera i la segona etapa, i una segona de producció d'energia, on es finalitza el procés amb l'última etapa.

La primera etapa consisteix en el pas de la glucosa a la fructosa-1,6-bifosfat i en la segona es produeix la ruptura d'aquesta en dos fragments diferents de tres carbonis que resulten fàcilment convertibles l'un en l'altre.

En aquesta primera fase es consumeixen dues molècules d'ATP.

En la darrera etapa es produeix l'oxidació dels tres fragments anteriors i s'obté el piruvat. En la segona i última fase es produeixen quatre molècules d'ATP. Així doncs, realitzant el balanç global de la glicòlisi tenim que com a resultat del procés s'obtenen dues molècules d'ATP. Juntament amb aquestes, també obtenim dues molècules de NAD^+ que accepten 4 protons (H^+) i 4 electrons procedents de la glucosa, generant doncs dos NADH + H^+. D'aquesta manera, hi ha una interdependència respecte el coenzim NAD^+, el procés de la glicòlisi requereix de la respiració o bé de la fermentació, per a oxidar el NADH + H^+ i poder regenerar el NAD^+.

A) <u>Etapes de la glicòlisi</u>

Etapa 1

1. Es produeix la fosforilació de la glucosa a glucosa-6-fosfat, aquest grup fosfat prové de la primera de les molècules d'ATP que es consumiran al llarg de tot el procés. La fosforilació es duu a terme gràcies a l'acció de l'enzim hexocinasa i resulta un a reacció química irreversible en condicions intracel·lulars.
2. La glucosa-6-fosfat es converteix en la fructosa-6-fosfat, és a dir, passa de forma cíclica a lineal, d'aldosa[32] a cetosa[33], gràcies a l'activitat de la fosfohexosa isomerasa o fosfoglucosa isomerasa. Atès que aquesta reacció no implica un consum energètic, es pot produir en ambdós sentits.
3. La fructosa-6-fosfat pateix una fosforilació i passa a fructosa-1,6-bifosfat per acció de la fosfofructocinasa-1, un enzim al·lostèric, que resulta rellevant per a la regulació de la glucòlisi. Aquest, augmenta la seva activitat sempre que s'esgota el subministrament d'ATP o hi ha un excés d'ADP i/o AMP. En aquesta reacció, es consumeix una segona molècula energètica i resulta irreversible en condicions cel·lulars.

Etapa 2

4. La fructosa-1,6-bifosfat es trenca gràcies a l'enzim fructosa 1,6-bifosfat aldosa o aldolasa i produeix el gliceraldehid 3-fosfat (GAP), una aldosa, i la dihidroxiacetona

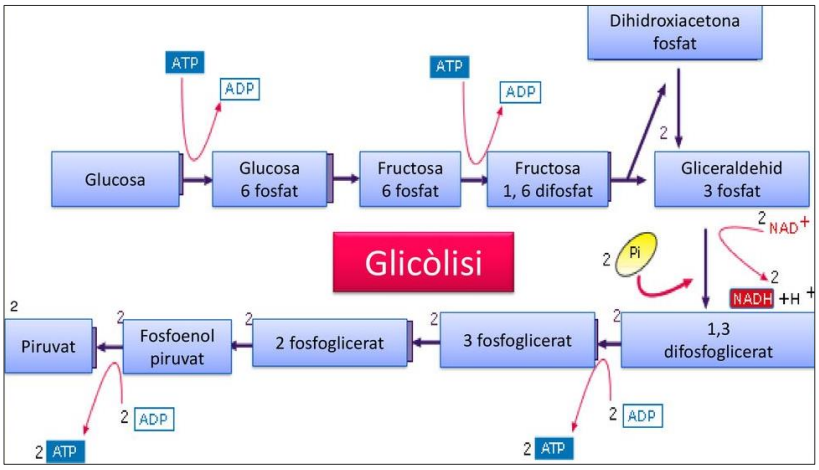
[32] **Aldosa**: monosacàrid amb un grup aldehid.
[33] **Cetosa**: monosacàrid amb un grup cetona.

fosfat (DHAP), una cetosa. Inicialment la glucosa presenta sis carbonis, a partir d'ara els productes de les fases posteriors estaran constituïts per tres carbonis.

5. Entre les dues trioses fosfat es pot produir una conversió de l'una en l'altre que resulta fàcilment realitzable per la triosa fosfat isomerasa (TPI). Atès que el GAP és l'únic producte aprofitable pels processos posteriors, l'enzim s'encarrega de convertir el DHAP a GAP.

Etapa 3

6. Es produeix l'oxidació del gliceraldehid 3-fosfat a 1,3-bifosfoglicerat, en què el grup aldehid és oxidat a àcid carboxílic. Aquest és el primer pas de benefici energètic, l'energia emesa en l'oxidació de GAP s'aprofita en la fosforilació del carboni 1, produint així 1,3-bifosfoglicerat. D'aquesta reacció n'és responsable la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa.
7. Es transfereix el grup fosfat des del 1,3-bifosfoglicerat a l'ADP gràcies a l'enzim fosfoglicerat cinasa, que transporta un grup fosfat d'alta energia des del grup carboxílic del 1,3-bifosfoglicerat a l'ADP, formant ATP. Es tracta d'un procés de fosforilació a nivell de substrat, ja que el grup fosfat és cedit per un substrat amb un elevat potencial de transferència d'aquest ió.
8. El 3-fosfoglicerat es converteix en 2-fosfoglicerat a partir del desplaçament del grup fosforil del carboni 3 al 2 per l'acció de la fosfoglicerat mutasa.
9. El 2-fosfoglicerat es deshidrata donant lloc al fosfoenolpiruvat, fet que es produeix gràcies a l'enolasa que permet l'eliminació de l'H_2O i la formació d'un doble enllaç.
10. Finalment es produeix la transferència del grup fosforil des del fosfoenolpiruvat a l'ADP per l'activitat del piruvat cinasa. Desprès el piruvat passarà de la forma fenol a la cetona, que és predominant a PH 7. Es tracta d'una reacció irreversible.



Il·lustració 7: Esquema de les etapes de la glicòlisi. Una molècula de glucosa, que conté 6 carbonis, es degradada per un conjunt de reaccions anaeròbiques, que tenen lloc al citosol, a dues molècules de piruvat, que contenen cadascuna 3 carbonis. En aquest procés, hi ha una primera etapa en la que es consumeixen 2 ATP i una segona en la que es produeixen 4 ATP i 2 ($NADH^+$+H^+), així doncs el balanç global és de 2 ATP i 2 ($NADH^+$+H^+).

2.2.1.2 El cicle de Krebs

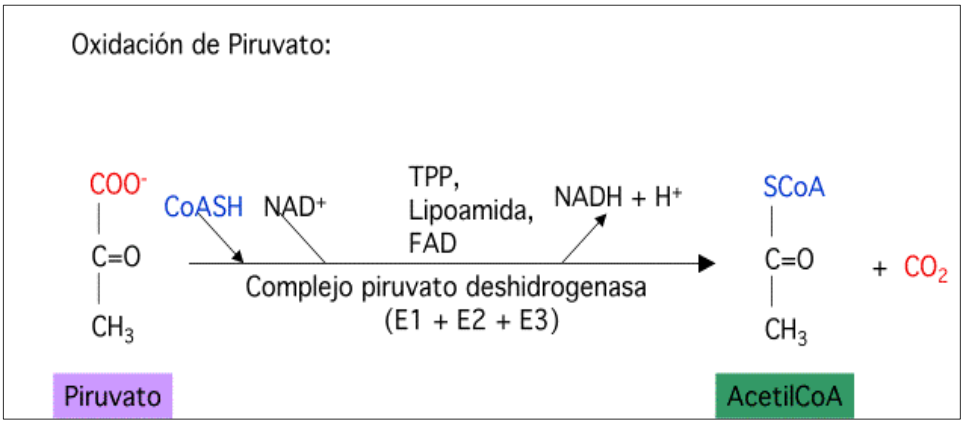
El cicle de Krebs, anomenat també cicle de l'àcid cítric, cicle dels àcids tricarboxílics o cicle oxidatiu tricarboxílic, és un procés que marca l'inici de la respiració cel·lular. En acabar la glicòlisi, la primera etapa de l'oxidació completa de la glucosa, s'inicia aquest procediment, que actua com a via final comú d'oxidació de les molècules energètiques, que entren en el cicle com acetil-CoA, majoritàriament.

La seva funció específica és produir electrons amb gran quantitat d'energia, en forma de NADH i FADH, a partir de l'oxidació de combustibles carbonats. Aquests electrons seran utilitzats posteriorment en la fosforilació oxidativa per a obtenir energia. A més a més, s'encarrega de generar precursors per vies biosintètiques.

El cicle de Krebs s'origina a la matriu mitocondrial, atès que és l'única secció de la cèl·lula on trobem els enzims capaços de degradar els productes de la glicòlisi.

L'objectiu de la glicòlisi és la producció d'àcid pirúvic, no obstant, aquest es troba ionitzat sent doncs un ió piruvat. És per aquest motiu que no pot travessar la membrana mitocondrial per difusió i ha de ser introduït per una proteïna transportadora.

Un cop a l'interior del mitocondri, prèviament a introduir-se al cicle de Krebs, ha de transformar-se en acetil-S-coenzim A mitjançant el sistema piruvat-deshidrogenasa. Durant aquest procés la molècula acull tres processos: en primer lloc la descarboxilació, per la pèrdua del grup acetil que surt en forma de CO_2, a continuació la deshidrogenació, quan es desprenen dos hidrògens de la molècula i redueixen NAD^+ a NADH + H^+, i, finalment, la unió de l'ió acetat resultant a un coenzim A, preparat per a entrar al mitocondri i iniciar el cicle.

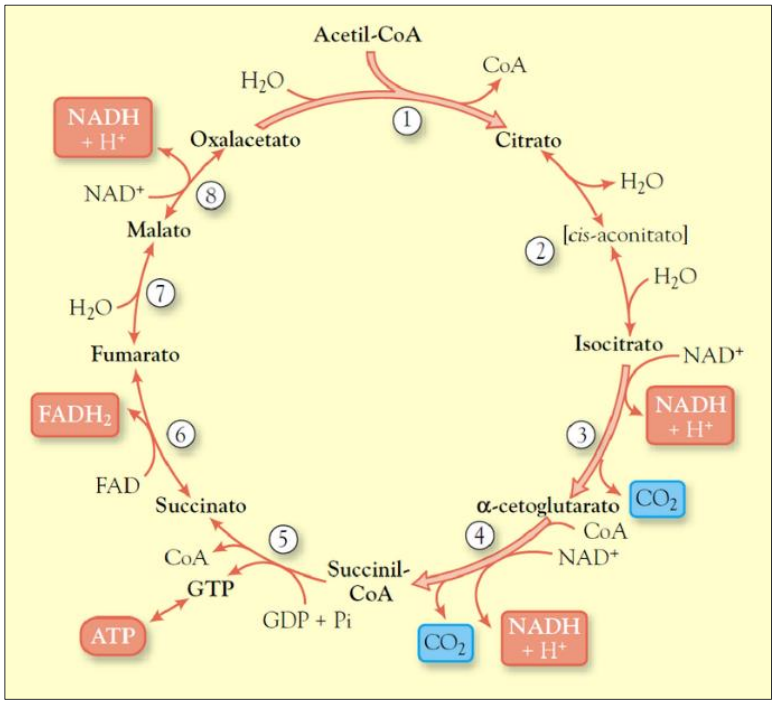


Il·lustració 8: Balanç de la reacció d'oxidació del piruvat a Acetil-CoA. El piruvat situat al citosol entra en forma de ió piruvat introduït per una proteïna per mitjà de transport actiu. Posteriorment, es produeix la transformació a Acetil-CoA gràcies al complex enzimàtic piruvat deshidrogenasa. A partir de les dues molècules de piruvat provinents de la glicòlisi obtenim 2 Acetil-CoA, 2 ($NADH^+$+H^+) i 2 CO_2.

En aquesta via metabòlica els grups acetil, aportats pels acetilcoenzims A, són degradats completament. Els dos carbonis donen lloc a dues molècules de CO_2, els hidrògens són captats pels coenzims NAD^+ i FAD, que passen a les seves formes reduïdes, NADH + H^+ i $FADH_2$, i es sintetitza, gràcies a l'energia alliberada, una molècula de GTP que equival a una d'ATP.

Es tracta d'una via complexa en que se succeeixen vuit compostos diferents. Primerament, el procés comença amb un acetilcoenzim A que transfereix el grup acetil a l'àcid oxalacètic, formant àcid cítric. Seguidament, es produeix una successió de reaccions químiques en les quals el producte pateix transformacions i es degrada totalment el grup acetil, generant com a producte final àcid oxalacètic, tot iniciant el cicle de nou.

A partir d'un Acetil-CoA s'obtenen dues molècules de CO_2, tres molècules de NADH, una de $FADH_2$ i un GTP (a partir d'una molècula de glucosa s'obtindria el doble) .



Il·lustració 9: Representació esquemàtica del cicle de Krebs. Ruta oxidativa central que permet l'oxidació completa de l'Acetil-CoA. S'inicia quan es cedeixen dos carbonis de l'Acetil-CoA a l'oxalacetat i forma l'àcid cítric. Es produeix una sèrie de 8 reaccions en les que s'alliberen 2 CO_2, i s'utilitzen els 4 carbonis restant, provinents de l'àcid cítric que té 6 carbonis, per a regenerar el oxalacetat. Durant el cicle es generen transportadors electrònics reduïts: 3 ($NADH^+$+H^+), 2 $FADH_2$ i GTP, per a cada Acetil-Coa oxidat.

2.2.1.3 El transport d'electrons en la cadena respiratòria

El transport d'electrons en la cadena respiratòria és la segona i última etapa de la respiració. Durant el seu transcurs té lloc l'oxidació dels coenzims reduïts, NADH i FADH, produïts en etapes anteriors perquè puguin tornar a ser utilitzats i es pugui invertir l'energia que contenen en la síntesi d'ATP. Aquesta fase es pot dur a terme gràcies a una sèrie de transportadors electrònics que constitueixen la cadena respiratòria i té lloc a l'interior del mitocondri, en tres zones diferents: la matriu mitocondrial, la membrana mitocondrial interna i l'espai intermembranós.

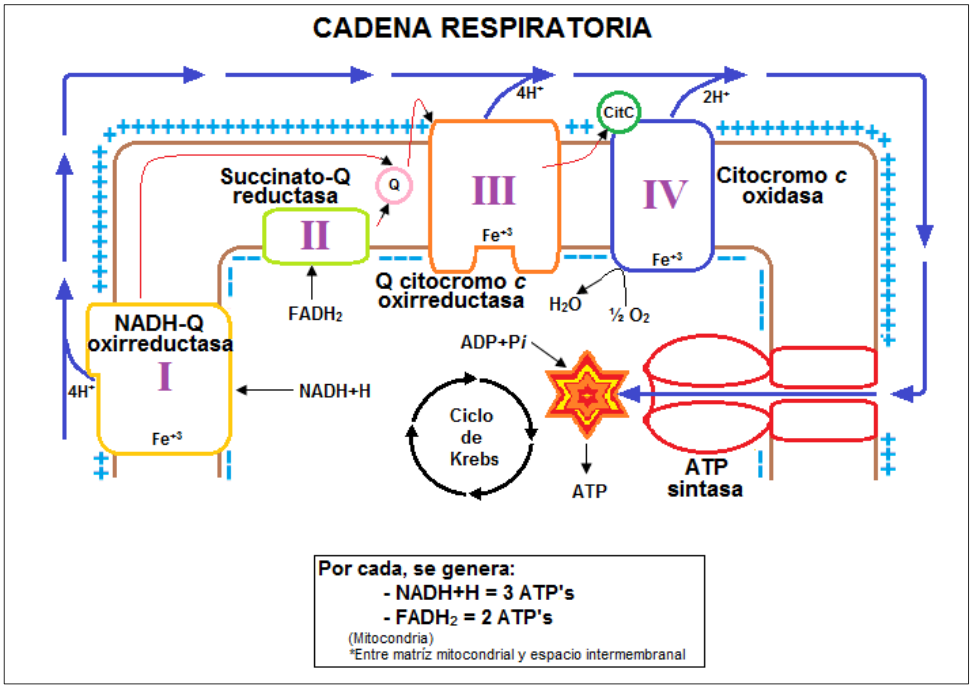
Podem distingir tres processos: el transport d'electrons, la quimioosmosi i la fosforilació oxidativa.

A) <u>El transport d'electrons</u>

La cadena transportadora d'electrons, on es duu a terme el transport d'aquests, està constituïda per una sèrie de molècules, essencialment proteïnes. Mentre que la membrana externa del mitocondri és considerablement permeable a ions i altres molècules petites, la membrana interna és impermeable, fins i tot a protons. Per aquest motiu, qualsevol molècula requereix de transportadors específics de membrana per a poder creuar la membrana interna dels mitocondris. Els sis components que la formen s'anomenen I, II, III, IV, ubiquinona i citocrom. Els components I, II, III i IV són quatre grans complexos proteics que estan englobats a la membrana, actuen seqüencialment, mitjançant grups protètics capaços d'acceptar i donar un o dos electrons. En canvi, la ubiquinona té la capacitat de traslladar-se per la doble capa lipídica i transporta electrons del complex I i II al III, i el citocrom és una petita proteïna que s'encarrega de comunicar el complex III amb el IV i es troba a la cara interna de la membrana.

Aquests sis components es troben ordenats en la membrana interna dels mitocondris de les cèl·lules eucariotes i en la membrana plasmàtica de les cèl·lules procariotes.

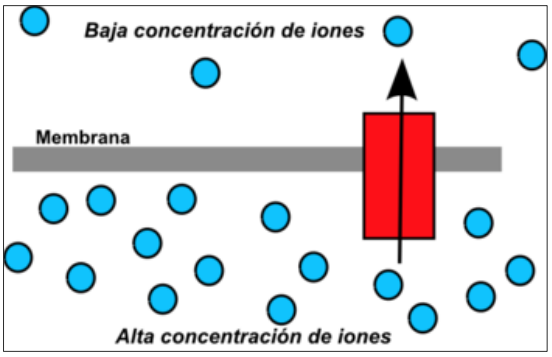
Així doncs, el transport del flux d'electrons provinents dels cofactors reduïts es dona pel fet que aquests elements accepten electrons de l'element anterior, és a dir, es redueixen i transfereixen els electrons a la molècula següent, i per aquest motiu s'oxiden. Això és possible perquè els electrons sempre passen a ocupar en l'àtom següent una posició més propera al nucli, i com a conseqüència, de menor energia.



Il·lustració 10: Esquema gràfic de la cadena de transport electrònic que engloba els processos de la quimioosmosi i la fosforilació oxidativa. La finalitat d'aquest procés és la oxidació dels coenzims reduïts NADH+H⁺ i $FADH_2$ provinents del Cicle de Krebs i es dona a la membrana mitocondrial interna. La cadena de transport electrònic és un sistema de molècules bàsicament proteiques que tenen la capacitat d'acceptar electrons de la molècula anterior, els electrons passen de proteïna a proteïna de manera espontània gràcies al potencial redox. Els transportadors d'electrons reduïts (NADH+H⁺ i $FADH_2$) transfereixen els seus electrons als complexos proteics, amb aquesta transferència els coenzims s'oxiden i es regeneren per a ser utilitzats de nou en la glicòlisi i el cicle de Krebs. Finalment. els electrons són cedits a l'O_2.que es redueix a H_2O.

B) La quimioosmosi

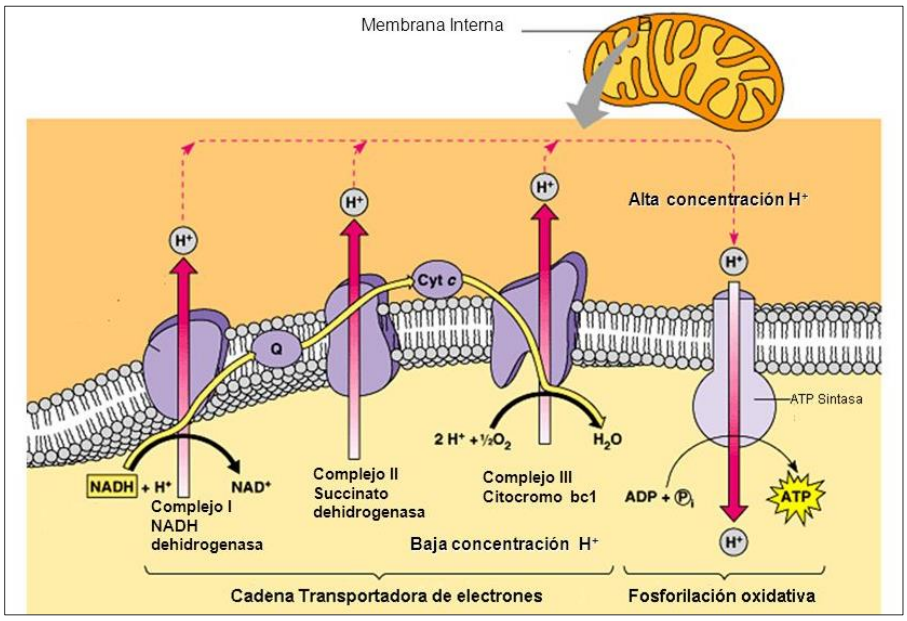
La quimioosmosi consisteix en la utilització de l'energia perduda dels electrons per a bombejar protons a l'exterior, des de la matriu mitocondrial a l'espai intermembranós. Això genera una acumulació de protons que, en assolir una elevada concentració, produeix un gradient de pH i un potencial elèctric que la membrana és incapaç de mantenir. És a dir, la concentració de H^+ en la matriu disminueix generant un camp elèctric negatiu en aquesta. Per igualar els potencials electroquímics, els protons flueixen tornant a la matriu en resposta a una força protó-motriu originada per la pròpia diferència de concentracions entre els dos medis. D'aquesta manera els protons acaben tornant a la matriu mitocondrial per mitjà d'uns canals que presenten els enzims ATP-sintetases.



Il·lustració 11: Representació gràfica de la quimioosmosi. A banda de la cessió d'electrons a l'O2, es produeix la quimioosmosi, és a dir, es genera una diferència de potencial a una banda i l'altre de la membrana degut a que hi ha un flux de protons que passa de la matriu mitocondrial a l'espai intermembranós.

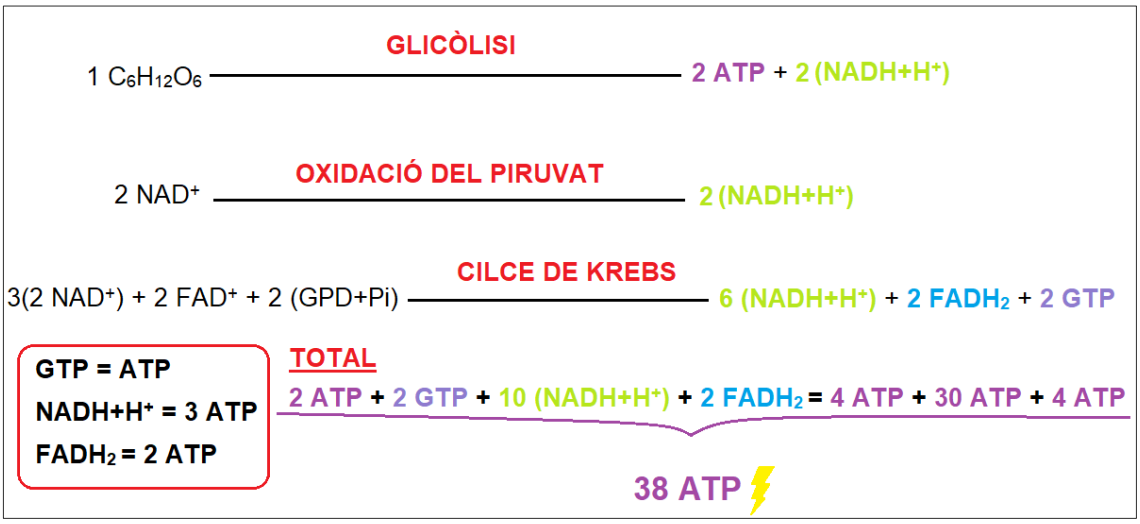
C) La fosforilació oxidativa

Un cop els protons han retornat a l'interior de la matriu mitocondrial a través dels enzims ATP-sintetases, aquests enzims els aprofiten per a la síntesi de molècules d'ATP. Aquests enzims estan constituïts per quatre parts, cadascuna d'elles formada per diverses subunitats de polipèptids que es mouen entre si quan els protons flueixen pel canal interior. Això provoca canvis en tres llocs catalítics que produeixen, cadascun d'ells, la unió d'una molècula d'ADP i un grup fosfat, generant així una molècula d'ATP. L'ATP es forma en absència d'un gradient de protons, però no s'allibera si no és amb una força protó-matriu. Així doncs, el gradient de protons s'encarrega d'alliberar l'ATP de l'ATP sintetasa no de la síntesi de la molècula. Aquest procés és l'únic procés metabòlic cel·lular en el qual intervé l'oxigen molecular, atès que actua com a acceptor final d'electrons, per aquest motiu és la base del que s'anomena metabolisme aeròbic, que es caracteritza per la respiració cel·lular, o consum d'oxigen.



Il·lustració 12: Representació gràfica de la fosforilació oxidativa. Es produeix l'entrada de protons des de l'espai intermembranós (part superior taronja) a la matriu mitocondrial (part inferior groga) per un procés espontani a través del complex ATP-sintetasa. Aquest enzim s'encarrega de la síntesis d'ATP a partir d'ADP, un grup fosfat i l'energia subministrada pel flux de protons (H^+).

2.2.2 Balanç energètic global de la glicòlisi



Il·lustració 13: Balanç global energètic obtingut a partir d'una molècula de glucosa en el catabolisme per respiració. De la glicòlisi s'obtenen 2 ATP i 2 (NADH+H+), de l'oxidació del piruvat s'obtenen 2 (NADH+H+), del cicle de Krebs s'obtenen 6 (NADH+H+), 2 FADH2 i 2 GTP. Cada GTP equival a un ATP, cada NADH+H+ equival a 3 ATP i cada FADH2 equival a 2 ATP, per tant, sumant totes les ATP i les molècules energètiques s'obtenen 38 ATP.

2.3 Catabolisme per fermentació

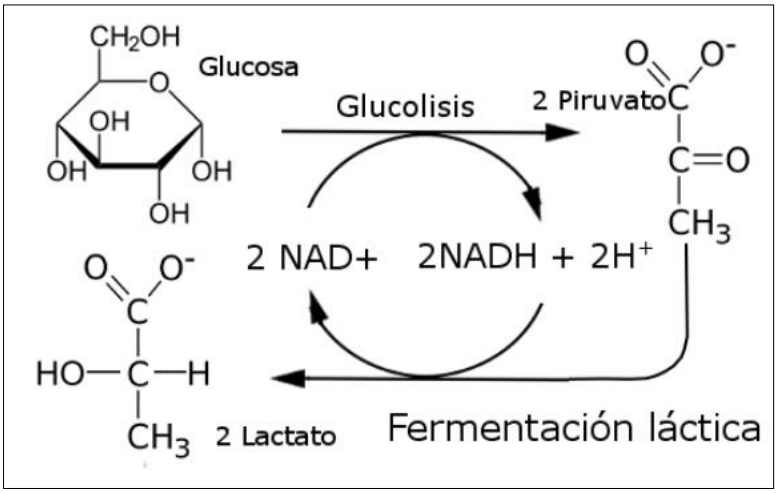
La fermentació es caracteritza per l'extracció d'energia en forma d'ATP, a diferència de la respiració, no consumeix oxigen, per tant, es tracta d'un procés anaeròbic. En aquest procés, no hi intervé la cadena respiratòria i no es canvia la concentració de NAD+. A més a més, l'acceptor final dels electrons sempre és un compost orgànic.

La síntesi de l'ATP es produeix a nivell del substrat, no hi intervenen les ATP sintetases, és per aquest motiu que la fermentació té associada una baixa producció d'energia. Si comparem l'obtenció d'energia en la respiració, on s'obtenen 38 molècules d'ATP, amb aquest procés, que només n'obté dues, es pot observar clarament la diferència.

Existeixen dos tipus de fermentació segons la naturalesa del producte final: la fermentació alcohòlica i la fermentació làctica. En endavant, ens centrarem únicament en la làctica perquè és la que es produeix en les cèl·lules cancerígenes.

2.3.1 La fermentació làctica

En la fermentació làctica, a partir de la glucosa produïda en la glicòlisi, obtenim àcid làctic, per l'acció de l'enzim lactat deshidrogenasa. És pròpia de certs bacteris del gènere *Lactobacillius*, tot i que també es dona en les cèl·lules animals, com les musculars, quan es troben en estat d'hipòxia, estat que es dona quan els animals fan un sobreesforç físic i es queden sense prou oxigen per catalitzar per respiració l'àcid pirúvic.



Il·lustració 14: Esquema de la fermentació làctica. Localitzem el procés al citosol, on a partir d'una molècula de glucosa s'obtenen dues molècules de piruvat mitjançant la glicòlisi procés en el que es produeixen 2 ATP i 2 (NADH+H). Aquest piruvat, produeix dues molècules de lactat gràcies a l'acció de l'enzim lactat deshidrogenasa, consumint els 2 (NADH+H) produïts a la glicòlisi i regenerant el NAD^+.

2.3.1.1 Balanç energètic global de la fermentació làctica

En la fermentació làctica es duen a terme dos processos: la glicòlisi i la fermentació del piruvat a lactat. De la glicòlisi obtenim 2 ATP i 2 (NADH+H) i en la fermentació del piruvat a lactat consumim els 2 (NADH+H) produïts a la glicòlisi, per tant, el balanç global de la fermentació làctica és de 2 ATP.

3. INTRODUCCIÓ A LES CÈL·LULES TUMORALS

El càncer engloba un conjunt de malalties que es caracteritzen per la divisió descontrolada de les cèl·lules del cos. Es tracta d'una malaltia genètica causada per diferents canvis en els gens que controlen el funcionament de les cèl·lules, específicament el seus processos de creixement i divisió.

Aquestes modificacions permeten que la cèl·lula eviti el control del seu desenvolupament, esdevenint així cancerosa. Ja sigui, augmentant la producció d'una proteïna que regula el creixement o generant proteïnes desfigurades que no resultin funcionals i no reparin el dany cel·lular.

Trobaríem anomalies heretades dels progenitors, que resideixen en les cèl·lules germinatives[34] i, per tant, serien presents en cadascuna de les cèl·lules de la descendència. O bé, adquirides al llarg de la vida de l'individu, com a resultat d'errades en l'ADN durant la divisió de les cèl·lules o per exposició a substàncies carcinogèniques[35] que poden alterar la informació genètica.

Hi ha diferents tipus de canvis en l'ADN, alguns afecten als nucleòtids, en que es substitueixen per altres o es suprimeixen per complet. Altres es produeixen en trams més grans d'ADN, poden generar reordenacions, eliminacions o duplicacions de seccions més llargues del material genètic. Sovint es produeixen modificacions epigenètiques[36] en que s'adhereixen o es s`eliminen marques químiques, repercutint en l'expressió dels gens.

Malgrat que totes les cèl·lules cancerígenes presenten canvis genètics, cada càncer té una combinació única d'alteracions genètiques, que poden ser causes o conseqüències de la malaltia. Fins i tot, durant el desenvolupament del càncer apareixen modificacions addicionals, és per això que les cèl·lules cancerígenes poden presentar canvis genètics diferents estant en un mateix tumor.

A l'Annex I d'aquest treball es pot trobar una descripció més detallada dels diferents tipus de càncers, les etapes d'aquesta malaltia i els agents cancerígens.

[34] **Cèl·lules germinatives**: cèl·lula reproductora del cos.
[35] **Substàncies carcinogèniques**: substància que pot causa una alteració en el material genètic de les cèl·lules.
[36] **Modificacions epigenètiques**: mecanismes que regulen l'expressió gènica sense modificar l'ADN.

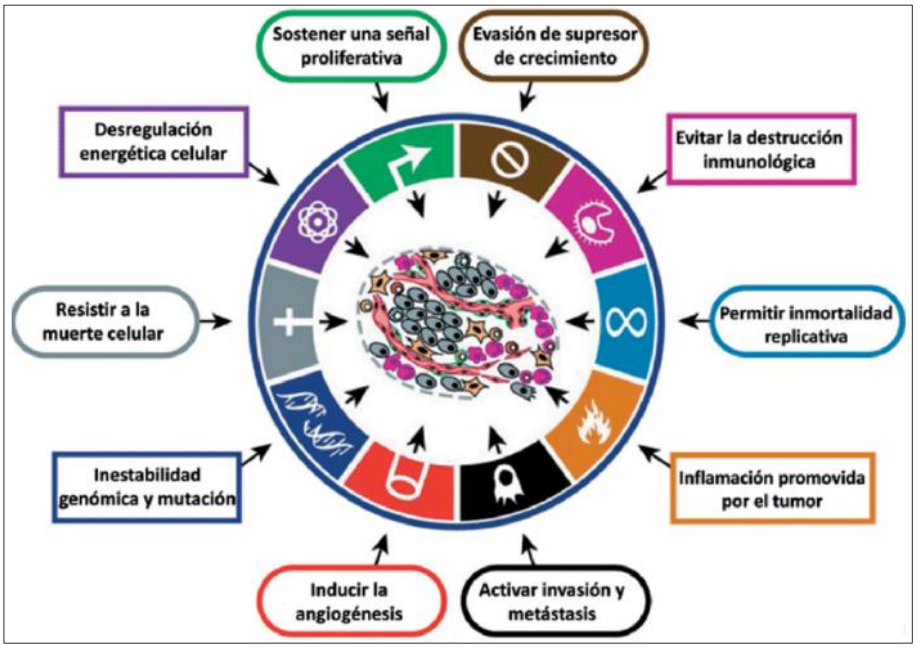
3.1 Hallmarks del càncer

Malgrat que el càncer presenta diferents manifestacions clíniques, s'han pogut establir certs principis comuns que s'observen en totes elles, anomenades Hallmarks del càncer.

Hanahan i Weinburg al 2000 van descriure 6 característiques compartides per les cèl·lules tumorals.

1. Independència dels senyals de creixement
2. Insensibilitat a estímuls que inhibeixen el creixement
3. Invasió i metàstasi
4. Evasió de l'apoptosi
5. Potencial il·limitat de replicació
6. Angiogènesi sostinguda

Al 2011, aquests autors van descriure dos trets característics més: l'evasió de la destrucció immune i la reprogramació del metabolisme energètic.



Il·lustració 15: Esquema dels efectes dels Hallmarks del càncer. La cèl·lula pateix una inflamació promoguda pel tumor i una inestabilitat genòmica que la condueixen a l'evasió dels supressors del creixement (insensibilitat a estímuls que inhibeixen el creixement), al manteniment d'una senyal proliferativa (potencial il·limitat de replicació), a la desregulació energètica cel·lular (reprogramació del metabolisme energètic), a resistir a la mort cel·lular (evasió de l'apoptosi), a induir la angiogènesi (angiogènesi sostinguda), a activar la invasió i la metàstasi (invasió i metàstasi), a permetre la immortalitat de replicació (evasió de l'apoptosi i potencial il·limitat de replicació) i a evitar la destrucció immunològica (evasió de la destrucció immune).

3.1.1 Independència dels senyals de creixement

Les cèl·lules s'estimulen mitjançant l'acció de senyals externs de proliferació, principalment factors de creixement. Aquests, activen receptors presents a la superfície cel·lular, permeten així l'activació de vies de senyalització intracel·lular que regulen la progressió, a través del cicle cel·lular, afavorint la supervivència de la cèl·lula.

En les cèl·lules tumorals, els gens involucrats en les vies de de senyalització presenten mutacions, aquestes utilitzen un o varis mecanismes que mantenen activa la proliferació de manera anormal. Els gens mutats:

- Són capaços de generar la síntesi o estimulació de lligands [37]similars als factors de creixement que estimulen la cèl·lula tumoral.
- També poden expressar nous receptors de membrana que responen a senyals proliferatives, ja siguin presents a l'entorn i/o sintetitzades per la mateixa cèl·lula.
- Augmenten l'expressió de receptors tirosina cinasa [38]en la superfície.
- Presenten mutacions en els receptors de superfície o en les proteïnes de la via de senyalització del receptor, mantenint així a les cèl·lules constitutivament actives.
- Presenten mutacions en les proteïnes responsables de la retroalimentació negativa[39], que permet l'atenuació de la senyal proliferativa.

3.1.2 Insensibilitat a estímuls que inhibeixen el creixement

Els gens supressors de tumors s'encarreguen de la regulació negativa de la divisió cel·lular. Les cèl·lules tumorals augmenten la seva taxa de proliferació mitjançant l'evasió de les diferents vies que regulen del creixement cel·lular.

RB i TP53 són dos gens que han estat àmpliament estudiats, atès que les seves mutacions són comuns a diferents tipus de tumors.

---

[37] **Lligands**: espècie rica en electrons que forma part de l'esfera de coordinació d'un metall, generalment de transició.

[38] **Receptors tirosina cinasa**: conjunt d'enzims associats a la membrana cel·lular que catalitzen la transferència d'un grup fosfat des de l'ATP a un residu de tirosina de una proteïna.

[39] **Retroalimentació negativa**: en el sistema endocrí el que fa és impedir actuar a algun enzim perquè aquest modifiqui la seva acció en algun procés, així un catalitzador fa que es produeixi una substància en específic i el producte pot actuar sobre l'enzim.

3.1.3 Invasió i metàstasi

En el tumor primari, únicament algunes cèl·lules presenten la capacitat de desenvolupar el potencial d'envair el teixit que les envolta i posteriorment teixits més distants, produint la metàstasi. Les cèl·lules tumorals amb capacitat invasiva pateixen un procés anomenat transició epiteli-mesenquimàtica (TEM), en que canvien el seu fenotip provocant una assimilació a les cèl·lules mesenquimàtiques[40]. En aquest procediment, afavoreixen a la invasió mitjançant:

- La pèrdua de les unions adherents.
- El canvi de la seva morfologia epitelial per una més semblant a la dels fibroblasts[41].
- L'augment de l'expressió d'enzims que degraden la matriu extracel·lular i augmenten la seva mobilitat.

Per altra banda, els fibroblasts que envolten les cèl·lules tumorals també pateixen una modificació afavorint el procés carcinogènic i TEM, generant un microambient pro-tumoral, l'estoma reactiu.

A partir de la invasió local i la posterior intravasació en els vasos sanguinis o limfàtics, les cèl·lules transiten a través d'aquestes vies i entren a la parènquima[42] de teixits distants. Concloent així, en la formació de petits nòduls [43]de cèl·lules cancerígenes, que a partir del seu desenvolupament, generaran l'establiment de la metàstasi.

Entre les diferents mutacions que produeixen la invasió i la metàstasi, la més freqüent és la disminució en l'expressió d'E-cadheria en carcinomes, una proteïna fonamental en l'adhesivitat amb altres cèl·lules i amb la matriu extracel·lular.

---

[40] **Cèl·lules mesenquimàtiques**: són cèl·lules que tenen la capacitat de diferenciar-se en diversos tipus de cèl·lules.
[41] **Fibroblasts**: cèl·lules pròpies del teixit conjuntiu encarregades de la síntesi dels components de la matriu.
[42] **Parènquima:** veure Annex I
[43] **Nòduls**: àrees sòlides de teixit, habitualment ben delimitades.

3.1.4 Evasió d'apoptosi

L'apoptosi és el mecanisme que s'encarrega de disminuir el nombre de cèl·lules per a mantenir l'homeòstasi [44]dels teixits. En l'apoptosi hi ha diversos estímuls que produeixen l'activació d'un grup de cisteïnes proteases anomenades caspases. Aquestes, degraden la cèl·lula fins a formar petits corpuscles, els cossos apoptòtics, que són fagocitats [45]per altres cèl·lules. Hi ha dos tipus d'apoptosi, per una banda, la extrínseca que actua mitjançant receptors de mort cel·lular que s'uneixen a la membrana plasmàtica. I, per altra banda, la intrínseca, que s'activa a partir de factors interns i és regulada per les proteïnes Bcl-2. Algunes d'aquestes proteïnes inhibeixen l'apoptosi, les anti-apoptòtiques i altres la promouen, les pro-apoptòtiques, el balanç permet la supervivència o la mort cel·lular davant estímuls apoptòtics.

Les cèl·lules tumorals utilitzen diferents mecanismes per a evadir aquest procés:

- L'alteració en el balanç de proteïnes pro-apoptòtiques i anti-apoptòtiques.
- La disminució de l'activitat de les caspases.
- Amb errors en la senyalització dels receptors de mort.

3.1.5 Potencial il·limitat de replicació

La majoria de les cèl·lules presenten un límit de divisions cel·lulars, anomenat límit de Hayflick. Per a cada divisió cel·lular els telòmers[46] dels cromosomes s'escurcen progressivament, fins a arribar a ser una possible amenaça per a l'estabilitat cel·lular. Quan assoleixen aquesta frontera poden entrar en dos estats no proliferatius: la senescència[47] i la mort per apoptosi.

Només algunes cèl·lules, com les germinals reproductives, poden sobrepassar el límit i dividir-se de manera indefinida, de la mateixa manera que ho fan les cèl·lules tumorals, en un procés anomenat immortalització. En aquestes, s'expressa la proteïna telomerasa, un tipus d'ADN polimerasa, encarregada d'evitar l'escurçament dels telòmers. Realitza la seva funció addicionant segments repetitius als extrems de l'ADN del telòmers. No és present en la majoria de les cèl·lules, no obstant, s'expressa de manera funcional en un 90% de les cèl·lules cancerígenes espontàniament immortalitzades. L'expressió d'aquesta proteïna, juntament amb mutacions que inactiven la funció de p53, eviten la crisi cel·lular i la mort de les cèl·lules tumorals.

---

[44] **Homeòstasi**: conjunt de fenòmens d'autoregulació, conduents al manteniment d'una relativa constància en la composició i les propietats del medi intern d'un organisme.
[45] **Fagocitar**: procés que fan les cèl·lules i alguns organismes unicel·lulars de capturar i digerir partícules sòlides nocives o aliment.
[46] **Telòmers**: extrems dels cromosomes.
[47] **Senescència**: procés iniciat com a resposta a l'estrès i dany ocorregut en una cèl·lula, i constitueix una ruta alternativa de resposta a la mort cel·lular programada i és de vital importància per suprimir la formació de cèl·lules canceroses.

3.1.6 Angiogènesi sostinguda

L'angiogènesi és el procés mitjançant el qual es proporcionen nutrients i oxigen a teixits en formació, a través de la formació de nous vasos sanguinis a partir de vasos existents. L'estimulació d'aquest procés afavoreix al creixement tumoral i la metàstasi.

En els teixits sans, existeix un balanç entre les molècules que regulen les diverses vies de l'angiogènesi, les anti-angiogèniques i les pro-angiogèniques.

La perduda d'aquest equilibri en el teixit tumoral afavoreix el desenvolupament de nous vasos sanguinis, a partir de molècules precursores endotelials[48]. La hipòxia generada en el creixement tumoral estimula la producció de citoquines angiogèniques [49]com VEGF, el factor de creixement de fibroblasts 2 (FGF-2) i el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) entre d'altres.

3.1.7 Evasió de la destrucció immune

Les cèl·lules tumorals són reconegudes pel sistema immune atès que expressen patrons proteics diferents a les cèl·lules sanes, com:

- Mutacions
- Infeccions per virus oncogènics
- Desregulació
- Sobreexpressió

Aquestes proteïnes poden actuar activant les cèl·lules del sistema immune innat o com antígens, activant, doncs, les cèl·lules del sistema immune adaptatiu.

Per una banda, al tractar-se de les cèl·lules d'un mateix individu, existeix un grau d'immuno tolerància, que fa que el reconeixement de les tumorals sigui complicat. I, juntament amb la inestabilitat genòmica característica de les cèl·lules alterades, aquestes canvien constantment de perfil antigènic.

Per altra banda, la sobreexpressió de certes proteïnes que regulen el microambient, afavoreixen el reclutament de cèl·lules altament supressores, com limfòcits T reguladors. Anul·lant així, l'activitat del sistema immune i regulant la neovascularització[50].

---

[48] **Molècules precursores endotelials**: cèl·lules d'un tipus d'epiteli pla simple, d'una sola capa de cèl·lules, que recobreix l'interior de tots els vasos sanguinis, inclòs el cor.
[49] **Citoquines angiogèniques**: proteïnes capaces de coordinar la resposta del sistema immunològic.
[50] **Neovascularització**: desenvolupament de nous vasos sanguinis.

En definitiva, algunes cèl·lules s'aconsegueixen evadir de l'eliminació i entren en una fase d'equilibri, en la es mantenen en un estat de **dormició funcional** de duració indefinida pel sistema immune adaptatiu. Aquest estat és mantingut fins que es generen clons que són irreconeixibles, i, per tant, capaços d'escapar del control i continuar proliferant.

3.1.8 Reprogramació del metabolisme energètic

En condicions normals aeròbiques, les cèl·lules processen glucosa fins a la seva degradació a CO_2 al mitocondri. En les cèl·lules tumorals, el microambient tumoral i certes mutacions condueixen a l'efecte Warburg.

3.1.8.1 L'efecte Pasteur, l'efecte Warburg i la petjada bioenergètica

L'efecte Pasteur, descobert al 1857 pel biòleg francès Louis Pasteur, és un principi de regulació metabòlica que estableix que els mitocondris de les cèl·lules tumorals presenten la seva funció bioenergètica alterada.

Pasteur es va basar en les seves observacions del llevat, que augmentava la seva taxa de creixement mentre disminuïa o frenava la producció d'alcohol. Així, va predir que el flux metabòlic de la glicòlisi en cèl·lules aeròbiques, caracteritzat per un augment del consum de glucosa i de la producció de lactat, depèn de l'energia metabòlica que aporta la fosforilació oxidativa mitocondrial en forma d'ATP.

L'efecte Warburg, descrit pel científic alemany Otto Warburg al 1924, és l'explicació del comportament inusual de les cèl·lules cancerígenes. Va ser guardonat amb el premi Nobel a l'any 1931, al adonar-se que les cèl·lules alterades únicament completaven la glicòlisi, sense realitzar la fosforilació oxidativa, malgrat que es trobessin davant la presència d'oxigen.

Warburg atribuïa aquest fenomen a l'existència d'una alteració en la funció mitocondrial de les cèl·lules tumorals. Va realitzar aquest plantejament, basant-se en les seves observacions dels mitocondris de les cèl·lules cancerígenes. Aquests, eren més petits i presentaven defectes morfològics. Justificava així que el piruvat no pogués entrar als mitocondris i fos desviat per a produir àcid làctic, impedint així la respiració habitual de la glucosa, recolzant doncs l'efecte Pasteur.

Un estudi recent dels investigadors del CMBSO, el grup del Centro de Biologia Molecular (CBMSO) dirigit per José Manuel Cuezva, publicat en Biochemical Journal, liderat per Inmaculada Martínez-Reyes amb la colaboració de María Sánchez-

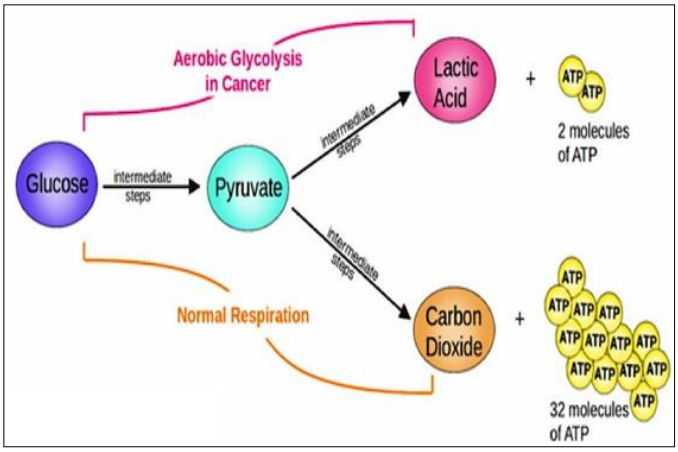
Aragóvan descriu la petjada bioenergètica del càncer com la necessitat d'una alteració en el funcionament dels mitocondris per part del càncer, per al correcte desenvolupament de la malaltia. Atès que aquesta malaltia és incapaç de progressar si els mitocondris funcionen correctament, així doncs, es pot descriure l'activitat energètica dels mitocondris com a supressor tumoral.

La petjada bioenergètica permet quantificar la reducció de l'activitat energètica del mitocondri en càncer de colon, mama i pulmó. Malgrat que els mecanismes que intervenen en la formació del tumor són diferents en el fetge que en el cas del colon, pulmó i mama, en tots ells es produeix una disminució dels nivells d'ATP, molècula energètica produïda pel mitocondri. Per tant, l'afectació en l'activitat mitocondrial és una condició metabòlica comú a tots els tipus de càncer.
És un indicador de pronòstic de la malaltia i pot arribar a predir la resposta del tumor a un tractament amb quimioteràpia. No obstant, encara resulta un aspecte en procés d'investigació en l'actualitat i que encara no s'ha aplicar a nivell clínic.

4. METABOLISME DE LES CÈL·LULES PROLIFERATIVES

En els processos que s'originen en el catabolisme de la glucosa de les cèl·lules sanes, la glicòlisi i la fosforilació oxidativa, aquestes poden arribar a produir al voltant de 36 molècules d'ATP. En canvi, en les cèl·lules tumorals es dona una repetició de la glicòlisi, freqüentment sense completar la fosforilació oxidativa. Així doncs, obtenen únicament 2 molècules d'ATP per a cada glucosa, és per això que requereixen molta quantitat d'aquest monosacàrid per obtenir l'energia necessària per a sobreviure.

Com a conseqüència, la proliferació només es pot produir en situacions on la restricció de l'aportació de glucosa en l'entorn cel·lular sigui inexistent. No obstant, aquesta alteració metabòlica resulta un avantatge que utilitza la malaltia per al seu desenvolupament. La disfunció metabòlica de les cèl·lules cancerígenes els hi permet augmentar la seva capacitat de divisió, produint així clons neoplàstics[51] resistents, que aporten majors capacitats de supervivència i creixement.



Il·lustració 16: Esquema gràfic del balanç energètic obtingut pel metabolisme del càncer (en rosa, part superior de la imatge) en comparació amb la respiració de les cèl·lules sanes (en taronja, part inferior de la imatge).

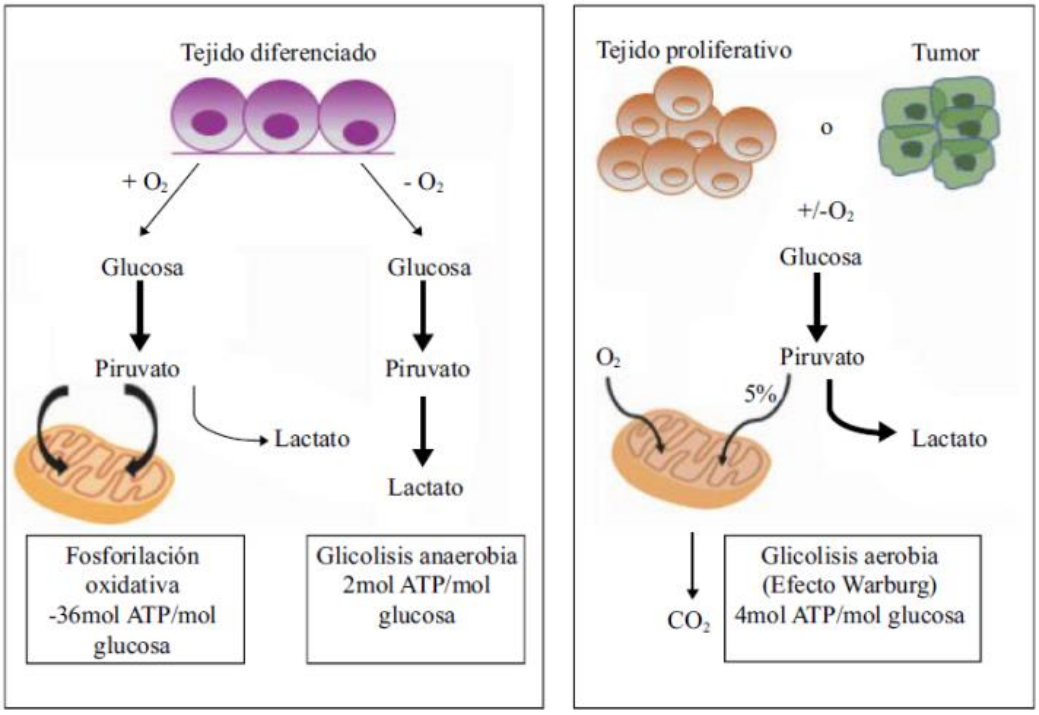
En el fenotip metabòlic[52] de les cèl·lules proliferatives, ja siguin cancerígenes o no, l'expressió dels marcadors del metabolisme energètic ha de diferir de l'expressió de les cèl·lules no proliferatives.

La glicòlisi és una via que proporciona els precursors necessaris per a la biosíntesi de macromolècules, fonamentalment. L'activitat d'aquesta i de les vies encarregades de la provisió d'energia metabòlica estan regulades durant el cicle cel·lular. En la fase oxidativa del cicle cel·lular es requereix l'activitat funcional del mitocondri, en canvi, les fases reductores estan relacionades amb la repressió de la funció mitocondrial i l'estimulació del metabolisme glicolític. De fet, quan es produeix el punt màxim en la síntesi de l'ADN cel·lular coincideix amb l'augment de l'activitat glicolítica i la disminució de la respiració mitocondrial i de la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS[53]). Això és deu, per una banda, a l'acció de reguladors clau de les vies metabòliques que controlen la progressió del cicle cel·lular. I, per altra banda, a factors

[51] **Clons neoplàstics**: cèl·lules idèntiques amb anormalitats genètiques o epigenètiques.
[52] **Fenotip metabòlic**:
[53] **ROS**: veure Glossari.

que reprimeixen la funció bioenergètica del mitocondri, és a dir, participen en la transició metabòlica des de la fase oxidativa fins a la fase reductiva del cicle.

És per això que, el canvi metabòlic que es produeix en les cèl·lules tumorals és degut a l'augment de l'activitat glicolítica, a una alteració en la funció mitocondrial i/o és el resultat de la sinèrgia d'ambdós processos.



Il·lustració 17: Esquema diferencial de les cèl·lules no proliferatives (esquerra) i les cèl·lules proliferatives o tumor (dreta). Les cèl·lules no proliferatives realitzen la respiració de la glucosa en presència d'oxigen, mitjançant la glicòlisi, el cicle de Krebs i la cadena de transport electrònic, i en absència d'oxigen realitzen la fermentació de la glucosa a través de la glicòlisi i la fermentació làctica. En canvi, les cèl·lules proliferatives, tant en presència com en absència d'oxigen, realitzen principalment la fermentació de la glucosa mitjançant la glicòlisi i la fermentació làctica.

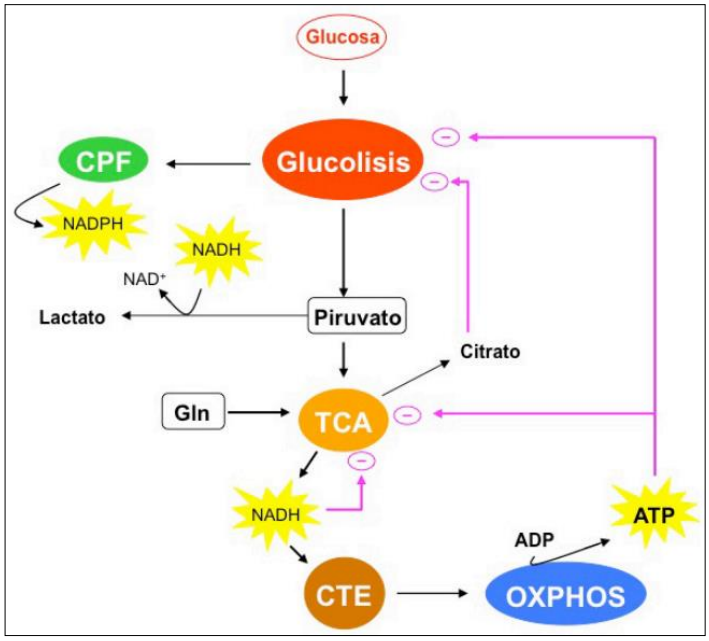
4.1 Reprogramació metabòlica del càncer

El metabolisme energètic cel·lular està regulat per la disponibilitat d'ATP, NADH i alguns intermediaris metabòlics. Com s'ha comentat anteriorment, la glucosa és captada per les cèl·lules mitjançant sistemes de transport específics i, un cop al citoplasma, s'oxida en la glicòlisi generant dues molècules de piruvat i equivalents energètics en forma d'ATP i NADH. En la majoria de les cèl·lules en aerobiosis, el piruvat entra al mitocondri i s'oxida a CO_2, gràcies a l'acció del piruvat deshidrogenasa i els enzims del cicle de Krebs. Els electrons generats durant l'oxidació dels substrats metabòlics són transferits a la cadena respiratòria i generen un gradient electroquímic de protons a ambdós costats de la membrana interna mitocondrial. Aquest gradient de H^+ és utilitzat per la H^+-ATP sintasa en la fosforilació oxidativa per a produir la major part de l'ATP cel·lular. En canvi, en determinades situacions fisiològiques, com és la

hipòxia, o quan existeixen alteracions que comporten una disfunció bioenergètica del mitocondri, el piruvat és reduït a lactat en el citosol per a regenerar NAD^+.

En les cèl·lules no proliferatives, la glucosa és oxidada totalment per l'activitat mitocondrial, produint grans quantitats d'ATP i NADH.

En cèl·lules proliferatives, la demanda de glucosa és major que en cèl·lules no proliferatives, atès que la seva necessitat d'esquelets carbonats per a processos biosintètics és més alta. Aquesta major demanda de glucosa també es deu al fet que oxiden la glucosa parcialment a lactat, degut a la contínua necessitat de proveir-se d'intermediaris metabòlics, de NADPH per a processos biosintètics i dels canvis metabòlics de la pròpia progressió a través del cicle cel·lular. L'augment del flux glicolític i, conseqüentment, de la producció de glucosa és necessari per a mantenir l'homeòstasi cel·lular.



Il·lustració 18: Esquema del metabolisme energètic i la seva regulació. La glucosa s'oxida seqüencialment al citoplasma per acció dels enzims de la glicòlisi per a generar piruvat. Aquest, pot entrar al mitocondri i oxidar-se en el cicle de Krebs o dels àcids tricarboxílics (TCA), o bé, reduir-se a lactat en el citoplasma. La cadena de transport d'electrons (CTE) i la fosforilació oxidativa (OXPHOS) dirigeixen la síntesi d'ATP mitjançant l'ATP sintetasa. El poder reductor utilitzat per a processos biosintètics (NADPH) s'obté a partir dels esquelets carbonats de la glucosa, oxidats al cicle de les pentoses fosfat (CPF). S'indica l'entrada de glutamina al TCA. Les fletxes roses indiquen la regulació negativa exercida per l'ATP, el citrat i el NADH sobre enzims claus del metabolisme energètic.

Degut als canvis en la disponibilitat d'ATP cel·lular, els enzims fosfofructocinasa (PFK) i piruvat cinasa C (PKC) s'encarreguen, mitjançant el control al·lostèric d'aquests, de la regulació de l'activació o repressió de la glicòlisi. No obstant, en alguns casos,

l'activació al·lostèrica dels enzims glicolítics no és suficient per a subministrar els requeriments de la proliferació cel·lular i es necessita de l'expressió gènica.

Aquesta redirecció del metabolisme de les cèl·lules cancerígenes, ha estat atribuïda a la hipòxia[54] del tumor, que pot intervenir en la regulació del metabolisme energètic i provocar una explotació de la glicòlisi com a font de provisió d'ATP en una situació de limitació d'oxigen. No obstant també s'ha considerat que és el resultat de mutacions d'oncogens, gens supressors de tumors i enzims de la via glicolítica i/o del metabolisme oxidatiu mitocondrial. Per altra banda, també s'ha suggerit que l'existència de mutacions en el genoma mitocondrial estan relacionats amb el desenvolupament del fenotip de les cèl·lules canceroses.

4.1.1 Microambient tumoral

El microambient tumoral és l'ambient de l'interior del tumor, aquest sol sotmetre a una tensió a les cèl·lules sanes properes. Això és degut a que, els vasos sanguinis d'un tumor no estan pròpiament desenvolupats i, sovint, presenten estructures virades i defectuoses. A causa d'això, es redueix la capacitat d'administració d'oxigen a les cèl·lules, desenvolupant unes condicions àcides. La distribució errònia dels vasos sanguinis i el creixement incontrolat dels tumors, provoca que algunes cèl·lules tumorals no disposin del suficient oxigen i es trobin en una situació d'hipòxia.

Les cèl·lules tumorals, atès que només realitzen la glucòlisi, no depenen de l'oxigen per a sobreviure, és per aquest motiu que no moren davant les condicions hipòxies. De fet, la falta d'oxigen promou el moviment cel·lular i, conseqüentment, la metàstasi, i proporciona capacitats primitives addicionals que resulten de protecció per a les cèl·lules cancerígenes. Afegint-hi que, la hipòxia genera l'activació d'una proteïna anomenada subunitat alfa del factor 1, HIF-α, la qual genera un increment de la glucòlisi mitjançant la sobreexpressió de transportadors de glucosa, sobretot GLUT1, que augmenten la disponibilitat de la biomolècula a l'interior de la cèl·lula.

No obstant, recentment s'ha observat que no tots els tumors o inclús no totes les cèl·lules d'un mateix càncer adopten una remodelació metabòlica segons l'efecte Warburg. Sinó que es caracteritzen per presentar un fenotip oposat, de tipus respiratori amb un increment en la fosforilació oxidativa mitocondrial. En alguns tumors existeix el que s'ha anomenat com a sinergisme o acoblament metabòlic entre les cèl·lules

[54] **Hipòxia**: estat de deficiència d'oxigen a les cèl·lules, els teixits i l'organisme que necessiten de l'oxigen per a realitzar les seves funcions

estromals[55] sanes i les tumorals. On, per tant, el microambient tumoral resulta clau per a la progressió del càncer. Així, els fibroblasts associats al tumor són glicolítics, seguint el patró de Warburg, i proporcionen lactat a les cèl·lules tumorals oxidatives. Aquestes, per una banda, són capaces d'utilitzar els nutrients com a font d'energia, gràcies al seu elevat metabolisme mitocondrial, la sobreexpresió de MCT1 i LDHB i la inhibició de la glicòlisi. O, per altra banda, poden incorporar els nutrients com a precursors metabòlics del desenvolupament tumoral. La comunicació metabòlica que estableixen es vincula directament amb l'agressivitat del càncer.

4.1.1.1 Situacions que generen microambient tumoral

Per a què les mutacions iniciadores o promotores de tumors persisteixin a la cèl·lula i originin clons tumorals, a nivell de la cèl·lula i del seu microambient han de produir-se dues situacions fonamentals, comunes a tots els tipus tumorals:

- La inflamació tumorigènica
- La inestabilitat genòmica

A) <u>Inflamació tumorigènica</u>

El microambient tumoral es genera gràcies a la interacció entre els diferents tipus de cèl·lules del teixit tumoral. Interactuen les cèl·lules cancerígenes amb un conjunt de cèl·lules que col·laboren al creixement tumoral, atès que proporcionen un suport funcional i nutricional. Aquestes són els fibroblasts anormals, les cèl·lules endotelials i del sistema immune innat [56]i adaptatiu[57].

Durant el procés de formació i creixement d'un tumor, es produeix un estat de inflamació crònica mediat per macròfags [58]i mastòcits [59]que infiltren el tumor i generen factors que promouen el creixement tumoral en totes les seves etapes.

Per una banda, la inflamació generada per l'ambient genera un estrès genotòxic[60], que afavoreix a noves mutacions i, per tant, promou la iniciació tumoral. També, participa

[55] **Cèl·lules estromals**: cèl·lules mesenquimals.
[56] **Sistema immune innat**: conjunt de cèl·lules i mecanismes que defensen un hoste de les infeccions per part d'altres organismes, de manera no específica. Durant una resposta immunitària innata les cèl·lules reconeixen i responen a patògens d'una manera genèrica.
[57] **Sistema immune adaptatiu**: es compon de cèl·lules i processos sistèmics altament especialitzats que eliminen o eviten les amenaces de patògens.
[58] **Macròfags**: cèl·lula amb capacitat immunològica present al teixit conjuntiu.
[59] **Mastòcits**: cèl·lules que tenen el seu origen en la medul·la òssia, on s'originen els precursors immadurs, que tenen un curt recorregut en la sang i que en arribar als teixits, especialment el teixit conjuntiu, es converteixen en mastòcits.

en la promoció, al incrementar la producció de nous vasos sanguinis al voltant del tumor, induint així la proliferació tumoral i la progressió tumoral. Per altra banda, afavoreix la extravasació cel·lular mitjançant la invasió tissular[61], facilitant doncs el desenvolupament de la metàstasi.

B) Inestabilitat genòmica

En les cèl·lules sanes hi ha un tipus de gens que són homòlegs a gens retrovirals[62] relacionats amb el desenvolupament de tumors, anomenats protooncogens, que estan relacionats amb el creixement i proliferació de les cèl·lules sanes. Quan presenten mutacions, s'anomenen oncogens i la seva mutació és de tipus dominant, és a dir, únicament és necessari que un dels al·lels pateixi una mutació per a la proteïna que codifica perdi la seva funció.

Però no són els únics gens que expliquen el desenvolupament tumoral. Trobem els gens supressors de tumors, que controlen la proliferació, la reparació cel·lular i l'apoptosi, la mutació dels quals és de tipus recessiva, és per això que cal que els dos al·lels siguin alterats per a que es produeixi la pèrdua de l'expressió de la proteïna i el conseqüent desenvolupament de la malaltia. Com a resultat de l'alteració, es produeix una anomalia en els mecanismes de control i reparació interns de la cèl·lula que permet el seu creixement i desenvolupament descontrolats, juntament amb l'acumulació d'altres mutacions.

En les cèl·lules no alterades, es produeixen unes 20.000 situacions que afecten a l'ADN i uns 10.000 errors en la replicació d'aquest. És per això que, presenten mecanismes per a la reparació d'aquestes alteracions, en els que estan involucrats els gens de reparació de l'ADN. Quan aquests són mutats, provoquen que les seqüències genètiques no es preservin correctament durant la replicació i es generin nous fragments d'ADN. La disfunció en les proteïnes que codifiquen genera una sensibilitat a agents que alteren l'ADN en les cèl·lules i, per tant, a l'adquisició i acumulació de noves mutacions que afavoreixen la carcinogènesi, ja que no permeten que la cèl·lula defectuosa sigui sotmesa a la senescència o apoptosi.

Totes aquestes mutacions, que poden ser heretades o somàtiques, generen la inestabilitat genòmica característica dels tumors.

---

[60] **Genotòxic**: nociu, que afecta la integritat del material genètic d'una cèl·lula .
Invasió tissular: invasió d'un teixit.

[61] **Invasió tissular**: invasió dels teixits.
[62] **Gens retrovirals**: virus que el seu genoma en fase extracel·lular és d'ARN.

La inestabilitat genòmica sol manifestar-se com a grans anomalies cromosòmiques i canvis en la ploïdia[63], malgrat que també s'observa en petits canvis a nivell nucleotídic, com insercions, delecions o substitucions de nucleòtids.

Les anomalies en els cromosomes tenen lloc durant la transformació maligna, en canvi, la inestabilitat genòmica promou l'adquisició de capacitats que afavoreixen a la progressió tumoral.

Majoritàriament, l'acumulació de mutacions en les cèl·lules tumorals és deguda a que la taxa de mutacions que presenten és major, atès a que presenten una major sensibilitat davant els agents mutàgens.

Un altre aspecte que contribueix a la inestabilitat genòmica és la pèrdua de l'ADN dels telòmers, que genera alteracions al cariotip[64] de les cèl·lules tumorals amb ampliacions o delecions de segments de cromosomes.

4.1.2 Alteracions que produeixen disfunció bioenergètica dels mitocondris i afavoreixen i permeten la supervivència de les cèl·lules tumorals

La revitalització del metabolisme energètic, i per extensió de l'interès mitocondrial en la biologia del càncer, ha experimentat un fort impuls en els últims anys degut a l'interès clínic i biotecnològic que pot suposar el metabolisme de la cèl·lula tumoral com a estratègia per a combatre la malaltia. La majoria dels estudis orientats a entendre les bases moleculars del fenotip altament glicolític del càncer discuteixen l'existència de diferents mecanismes que impliquen a la via glicolítica, a la fosforilació oxidativa o a ambdues rutes metabòliques. Alguns dels gens que han estat més estudiats, degut a la seva presència generalitzada en un considerable nombre de tumors han estat c-MYC, HIFα1, Akt i p53.

[63] **Ploïdia**: nombre de jocs complets de cromosomes d'una cèl·lula.
[64] **Cariotip**: patró cromosòmic d'una espècie expressat a través d'un codi, establert per conveni, que descriu les característiques dels seus cromosomes.

4.1.2.1 c-MYC

L'oncogen c-MYC, el qual es troba sobreexpressat en la majoria de les cèl·lules cancerígenes, esta implicat en la transactivació[65] d'un gran nombre d'enzims de la via glicolítica, entre els l'enzim lactat deshidrogenada A (LDHA) i el transportador de glucosa GLUT1. Aquest oncogen controla l'expressió transcripcional de gens essencials per a la biogènesi mitocondrial, la coordinació d'esdeveniments metabòlics i reguladors que són necessaris per a l'entrada i progressió a través del cicle. Regula, per una banda, la glutaminòlosi[66], una ruta metabòlica important per a la proliferació cel·lular. Per altra banda, és responsable de l'augment de l'expressió de proteïnes que promouen la glicòlisis aeròbica i la tumorigènesi.

4.1.2.2 HIFα1

Es tracta d'una proteïna que actua en el nucli cel·lular activant la resposta a l'escassetat d'oxigen, és a dir, és un factor induïble per hipòxia. Aquesta controla l'expressió de més de 100 gens, entre ells, gens que controlen el desenvolupament dels vasos sanguinis, transportadors de glucosa (GLUT1) i enzims glicolítics o factors de supervivència i invasivitat tumoral. Genera una sobreexpressió que determina dues de les principals característiques de moltes de les cèl·lules tumorals: l'elevada taxa de captació de glucosa i el conseqüent augment de la glicòlisi.

Hi ha dues accions promogudes per HIFα1 que tenen especial rellevància:

- Indueix a l'activitat de la PDK-1 (piruvat deshidrogenasa cinasa), una proteïna que evita que el piruvat de la glicòlisi entri al cicle de Krebs.
- Activa la lactat deshidrogenasa, una proteïna que transforma el piruvat en àcid làctic.

Així doncs, confereix avantatges selectius per a la supervivència i la proliferació tumoral.

4.1.2.3 Akt

L'oncogen Akt regula la proliferació, la supervivència cel·lular i promou l'augment glicolític de manera que resulta fonamental per a la supervivència cel·lular en absència de factors de creixement. La sobreexpresió d'aquest promou l'expressió d'enzims de la via glicolítica, estimulant doncs la glicòlisi, i afavoreix a la transformació cap a un fenotip de creixement invasiu.

---

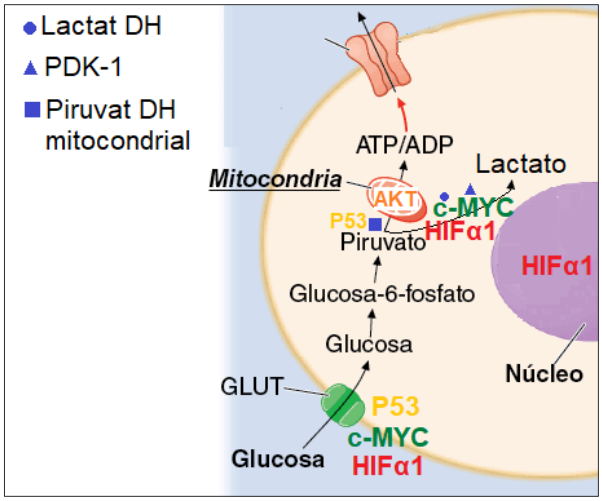
[65] **Transactivació**: increment en la taxa d'expressió gènica deguda a determinats processos biològics o bé d'una manera artificial.
[66] **Glutaminòlisi**: sèrie de reacciones bioquímiques de degradació de l'aminoàcid glutamina.

L'activació de Akt genera defectes en la respiració mitocondrial que proporcionen resistència als fàrmacs i avantatges per a sobreviure en condicions d'hipòxia.

4.1.2.4 P53

P53 és una proteïna codificada per gens supressors de tumors, quan aquests presenten mutacions perd la seva funció i genera la tumorigènesi. Una de les seves funcions és encarregar-se de disminuir l'expressió del transportador de glucosa GLUT1, però quan està alterada actua contràriament, augmentant el flux glicolític cel·lular.

Les mutacions en p53 també comporten una deficiència en la funció mitocondrial, amb la conseqüent disminució de la respiració cel·lular, juntament amb la inactivació de la piruvat deshidrogenasa mitocondrial, enzim responsable de la conversió del piruvat a acetil-CoA. Reforçant així la major dependència de les cèl·lules tumorals de la glicòlisi



Il·lustració 19: Resum esquemàtic de l'acció dels principals enzims que produeixen la disfunció bioenergètica de les cèl·lules cancerígenes. C-MYC actua augmentant l'enzim GLUT1 i el lactat deshidrogenasa. HIFα1 controla l'expressió de GLUT 1 indueix l'activitat del piruvat deshidrogenasa cinasa i activa el lactat deshidrogenasa. Akt genera defectes en la respiració mitocondrial. P53 alterat augmenta l'expressió de GLUT 1 i genera la inactivació de la piruvat deshidrogenasa mitocondrial.

per a l'obtenció d'energia.

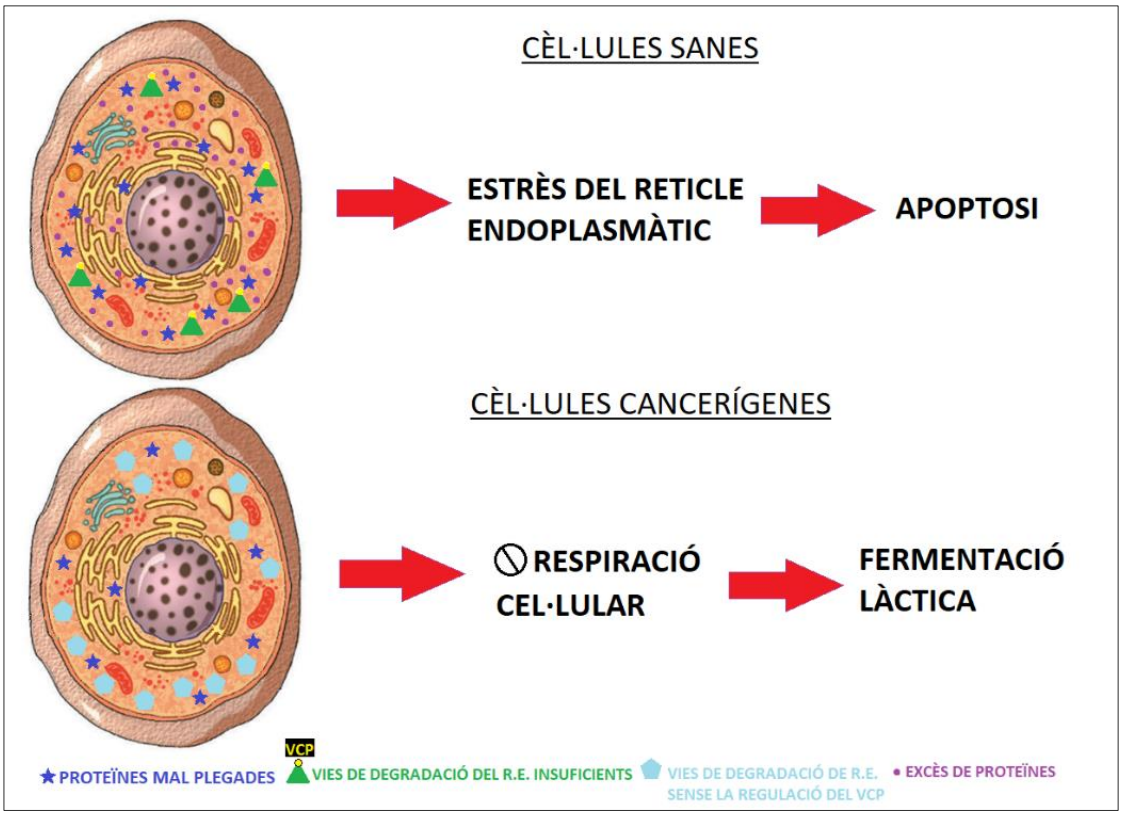
4.1.2.5 P97/VCP (SVIP)

La proteïna p97 també anomenada VCP i SVIP, té propietats supressores de tumors atès que actua com a inhibidor de la degradació associada al reticle endoplasmàtic[67]. El control de la síntesi, el plegament, la modificació i el transport de proteïnes són algunes de les funcions del reticle endoplasmàtic, és per això que té gran influència en l'homeòstasi proteica de les cèl·lules cancerígenes, ja que aquestes pateixen una acceleració de la síntesi de proteïnes i del cicle cel·lular a causa de l'estrès intrínsec i extrínsec, el dèficit de nutrients o bé, la hipòxia.

[67] **Reticle endoplasmàtic**: orgànul cel·lular que únicament es troba en cèl·lules eucariotes format per una xarxa de membranes interconnectades que formen cisternes, tubs aplanats i sàculs comunicats entre si, que intervenen en funcions relacionades amb la síntesi proteica i el transport intracel·lular.

L'augment de la síntesi de proteïnes i del nombre de proteïnes mal plegades generen l'estrès al reticle endoplasmàtic, que acabarà derivant en l'apoptosi. No obstant, les cèl·lules tumorals són capaces d'adaptar el seu reticle endoplasmàtic en resposta a les proteïnes desplegades, mitjançant vies de degradació del reticle, sistema que garanteix la quantitat i la qualitat de les proteïnes en les cèl·lules sanes.

El paper de la proteïna VCP és regular la degradació del reticle endoplasmàtic, per tant, mitjançant la seva inhibició les cèl·lules alterades obtenen, d'una banda, un estrès associat a l'activitat antitumoral, però que són capaces de superar i mantenir l'homeòstasi. D'altra banda, aconsegueixen una regulació estricta de la VCP que els permet fer ús de les vies de degradació del reticle endoplasmàtic, destruint així l'acció de les vies metabòliques que utilitzen la glucosa per a l'obtenció d'energia de forma pausada. Quan p97 és silenciada mitjançant la hipermetilació de l'ADN durant la tumorigènesi, es produeix un esgotament dels enzims mitocondrials i de l'activitat de la respiració oxidativa, i alteracions en un inhibidor del transportador de glucosa GLUT1. Així doncs, SVIP indueix a la reprogramació metabòlica de les cèl·lules tumorals establint una dependència de la glucosa i la glicòlisi aeròbica. Recentment, s'ha identificat que la presència d'una lesió epigenètica en tumors humans és responsable d'originar l'alteració de les vies de degradació, a través de la qual el tumor obté energia i que disminueix la supervivència dels pacients que la tenen.



Il·lustració 20: Esquema gràfic comparatiu de la resposta de les cèl·lules sanes i les cèl·lules cancerígenes davant d'una situació d'excés de proteïnes i de proteïnes mal plegades a la cèl·lula.

BLOC III: Marc pràctic

Com a part pràctica del treball, s'ha realitzat, per una banda, una revisió i comprensió de l'estudi «Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum-associated degradation inhibitor SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming». Per altra banda, una estada a un laboratori de les instal·lacions del IJC, per observar i entendre les tècniques epigenètiques d'avantguarda empleades en l'estudi revisat, i així poder redactar el seu funcionament.

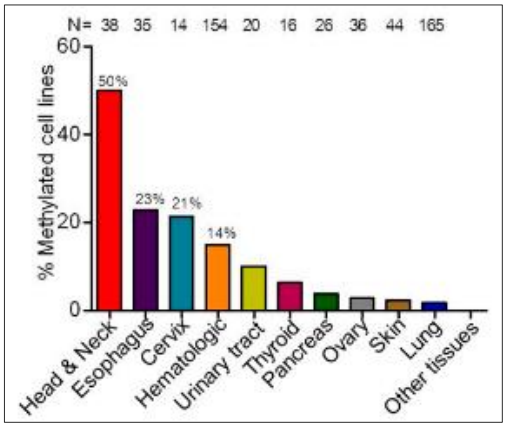
1. LA METILACIÓ DE SVIP

1.1 Silenciament transcripcional de SVIP

La via de degradació del reticle endoplasmàtic, regulada per la VCP, està formada pels gens: VCP, SELENOS, SYVN1, SVIP, AMFR i DERLIN1-3, en tumors humans.

En la investigació «Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum-associated degradation inhibitor SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming» publicada el març del 2019 en el *Journal of Clinical Investigation Insight*, per Pere Llinàs Arias et al, es va realitzar l'estudi de 1001 línies cel·lulars de càncer humà. Es va observar que amb la hipermetilació[68] de l'illa CpG[69] del promotor VCP es pot aconseguir la inactivació dels gens en les cèl·lules transformades, gràcies al silenciament transcripcional[70] que aquesta produeix.

En l'estudi es va observar que, aparentment, les cèl·lules no presentaven lesions genètiques, però mitjançant la tècnica d'inactivació esmentada es va poder determinar quins gens estaven activats i quins no. Aquells que estaven activats en la cèl·lula tumoral es desactivaven i aquells que no ho feien era perquè ja ho estaven. Així doncs, es va determinar que en un 50% de les línies cel·lulars de càncer de cap i coll[71] el



Il·lustració 21: Percentatge de línies cel·lulars metilades de SVIP per tipus de tumor.

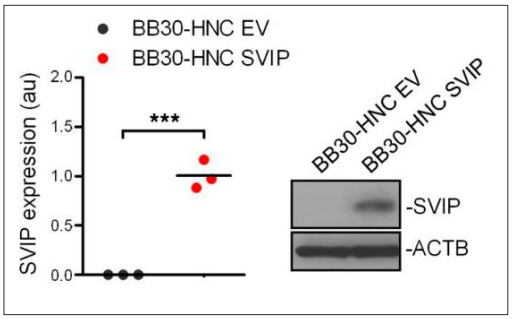
[68] **Hipermetilació**: transferència de grups metil a algunes de les bases citosines (C) de l'ADN situades prèvia i contínuament a una guanina (G). Com que la metilació és fonamental en la regulació del silenciament gènic, pot provocar alteracions en la transcripció genètica sense necessitat que es produeixi una alteració en la seqüència de l'ADN, sent un dels mecanismes responsables de la plasticitat fenotípica.

[69] **Illa CpG**: regions d'ADN que es troben aproximadament en un 40% dels promotors dels gens dels mamífers, en un 70% dels humans, en les que existeix una gran concentració de parells de citosines i guanines enllaçats per fosfats.

[70] **Silenciament transcripcional**: control, regulació i eliminació del material genètic.

gen SVIP estava metilat, en canvi, la resta de gens no. La hipermetilació del SVIP genera una regulació a la baixa del ARNm, és a dir, no es transcriu.

Realitzant tècniques amb PCR quantitativa i Western blot, es va demostrar que tractant el gen SVIP metilat amb un inhibidor de la metilació anomenat 5-aza-2'-desoxicitidina (AZA), es podia restaurar l'expressió del SVIP.



Il·lustració 22: Gràfica que indica la presència del SVIP en les cèl·lules restaurades (vermell) i l'absència d'aquest en cèl·lules amb un vector buit.

Es va contrastar aquesta metilació, pròpia de les cèl·lules tumorals, comparant aquestes cèl·lules amb les de teixits sans en què SVIP no està metilat, mitjançant una tècnica de seqüenciació genòmica per bisulfit.

Per tant, es va determinar que el silenciament del SVIP es produeix únicament en les cèl·lules cancerígenes.

1.1.1 Tècniques epigenètiques

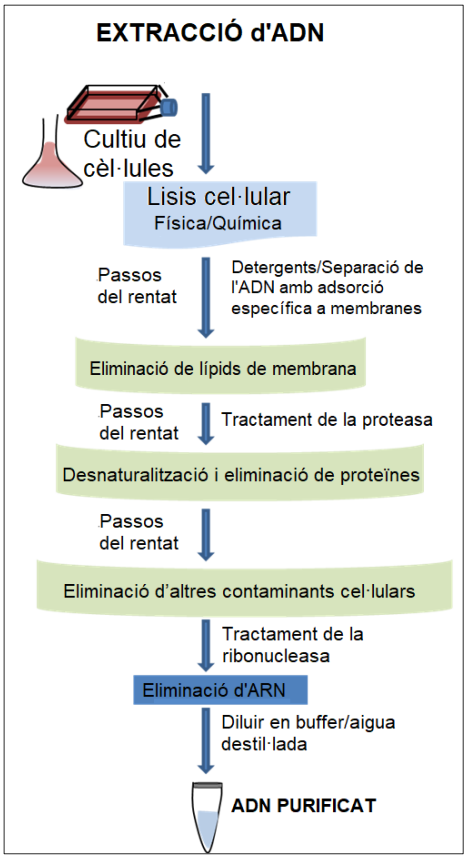
Les tècniques epigenètiques són aquelles que s'utilitzen en l'estudi dels mecanismes que regulen l'expressió dels gens sense una modificació en l'ADN i a partir dels resultats es poden establir les relacions entre les influències genètiques i ambientals que determinen un fenotip.

En l'estada als laboratoris de IJEC vam tractar amb ADN, ARN i proteïnes i vaig poder observar i aprendre diferents tècniques utilitzades en l'estudi en que, mitjançant l'ús i observació de línies cel·lulars (Namalwa 1/2/3, Namalwa A1/A2/A3/A4, Jiy 1/2/3, Jiy A1/A2/A3/A4, MM1S 1/2/3, RPMI 1/2/3, RAMOS 1/2/3, RAMOS A1/A2/A3/A4, HT 1/2/3, HT A1/A2/A3/A4, Karp 1/2/3, Karp A1/A2/A3/A4, L540 1/2/3, HDMYZ 1/2/3, KMHZ 1/2/3) metilades i no metilades amb AZA, es va deduir la metilació del PVRL2 en la línia cel·lular NAVALWA. Aquestes, com els materials i utensilis de laboratori, han estat empleades en la realització de l'estudi de la metilació de SVIP.

[71] **Càncer de cap i coll**: Els càncers que es coneixen en conjunt com càncers de cap i coll, generalment, comencen a les cèl·lules escamoses que revesteixen les superfícies humides i mucoses de l'interior del cap i del coll (per exemple, dins de la boca, del nas i de la gola).

1. EXTRACCIÓ d'ADN

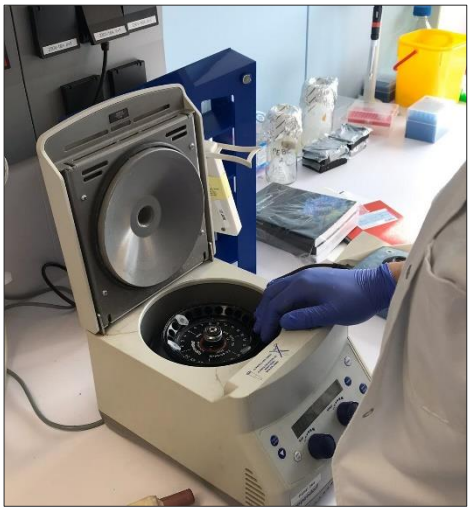
Primerament, es van deixar les mostres d'ADN durant la nit suspeses a 37ºC en un buffer de lisi, amb SDS per degradar les proteïnes. Un buffer de lisi és una solució utilitzada per a trencar les cèl·lules i utilitzar-les en experiments de biologia molecular que analitzen les macromolècules làbils de les cèl·lules, en aquest cas en la transferència Western per extracció d'ADN. A vegades, s'afegeixen detergents per trencar les estructures de la membrana, en aquest cas es va afegir SDS, un compost que actua trencant els enllaços no covalents en les proteïnes, desnaturalitzant-les i provocant que perdin la seva conformació.



Il·lustració 23: Esquema gràfic amb les diferents fases de l'extracció de DNA: lisis cel·lular gràcies a l'efecte de detergents, rentat de la mostra fins elliminar lípis de membrana, proteïnes i altres contaminants cel·lulars i, finalment, eliminació de l'ARN per obtenir l'ADN purificat.

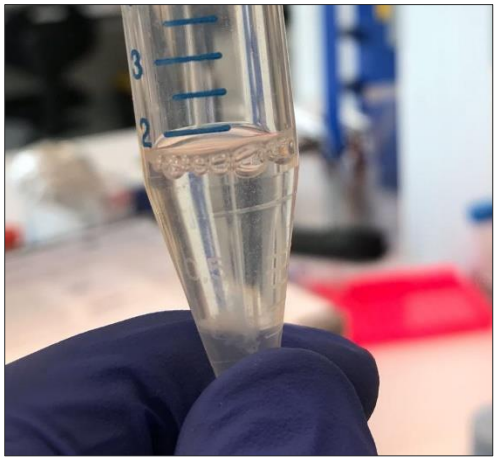
A continuació, es va afegir un tercer volum de clorur de sodi 5M, es va deixar en repòs una nit i es va centrifugar a 20000G durant 15 minuts en fred.

Es van recollir les mostres i es van afegir 0,8 volums d'isopropanol, una substància que permet la precipitació de l'ADN desprès d'una centrifugació, degut a que l'ADN és insoluble en isopropanol. Seguidament, es van tancar i agitar els tubs.

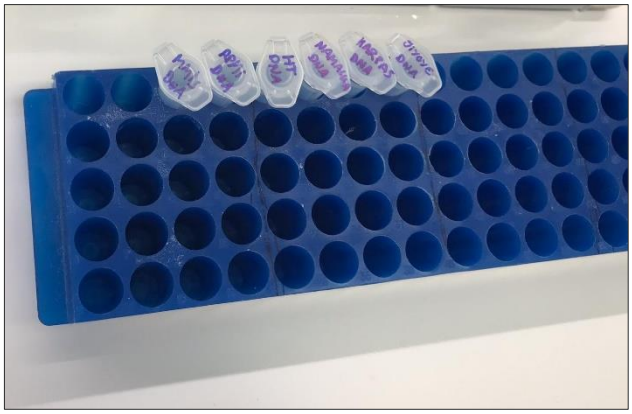


Il·lustració 24: Imatge dels laboratoris IJEC en que s'observa la centrifugació de les mostres d'aquelles meduses que no s'observaven amb claredat

En alguns casos es va donar que la medusa formada per l'ADN precipitat era visible a ull nu, aspecte que va permetre que es pogués pescar, i es va passar a un eppendorf. En altres casos en que no s'observava amb claredat, es van centrifugar els tubs a 4000G en fred, i va ser doncs quan es van tornar visibles, es van col·locar tots els pellets a l'eppendorf i es van netejar amb etanol 70%. Finalment, l'ADN es va deixar assecar desprès de treure l'etanol i es va suspendre en aigua.



Il·lustració 25: Imatge dels laboratoris de l'IJEC en que s'observa una medusa d'ADN a ull nu.



Il·lustració 26: Imatge dels pellets en els eppendorfs, desprès de que totes les meduses fossin visibles.

2. CONVERSIÓ BISULFIT

La conversió bisulfit consisteix en incubar entre 15 i 20 hores en presència de bisulfit l'ADN extret a seqüencia que es fragmenta per a facilitat la posterior desnaturalització a la que es sotmetrà per separar les dues cadenes d'ADN. El bisulfit actua desaminant les citosines de l'ADN convertint-les en uracil, però és incapaç d'actuar sobre aquelles que es trobin metilades.

A continuació, es produiria l'ampliació de la regió que es vol tractar amb la PCR i la seva posterior seqüenciació. Finalment, es compara la seqüència obtinguda amb la d'un control que no s'ha sotmès a l'acció del bisulfit: aquelles citosines que no estiguessin metilades apareixen com a tals en el control, mentre que en la mostra tractada seran substituïdes per una timina.

En el laboratori es va realitzar aquesta tècnica agafant 2 µg d'ADN extret que s'afegiren a 130 µL de bisulfit per a la conversió de les citosines metilades protegides. Seguidament, es va fer una reacció de biovac i es va centrifugar en cicles d'1 minut a 98ºC durant 16h. El següent pas va estar la purificació amb el kit en columna amb detergents per netejar l'ADN.

3. PCR QUANTITATIVA

La PCR quantitativa és una tècnica variant de la reacció en cadena de la Polimerasa (PCR) utilitzada per ampliar i discriminar la quantitat d'ADN present en una mostra. Es realitza en un termociclador que permet, per una banda, que un feix de llum amb una longitud d'ona determinada incideixi sobre cada mostra i, per altra banda, és capaç de

detectar la fluorescència emesa pel fluorocrom excitat. Aquest termociclador escalfa i refreda ràpidament les mostres, aprofitant les qualitats fisicoquímiques dels àcids nucleics i les qualitats enzimàtiques de l'ADN polimerasa.

El procés doncs, consisteix en un seguit de canvis de temperatura, anomenats cicles, que es repeteixen entre 25 i 40 vegades, cadascuna amb un mínim de tres etapes:

- Primera (al voltant de 95ºC): permet la separació dels àcids nucleics de la doble cadena
- Segona (al voltant de 50-60ºC): permet l'alineament dels encebador a l'ADN motlle.
- Tercera (al voltant de 68-72ºC): facilita la polimerització per part de l'ADN polimerasa.

PCR SEMIQUANTITATIVA: Es realitza mitjançant la comparació de mostres. Es dona a una mostra el valor 1 i s'observa i es compara la resta de mostres amb aquesta per atorgar diferents valors. El que interessava observar les mostres tractades amb AZA i les no tractades, i veure si quan estan tractades hi ha més expressió o no. Per tant, és un anàlisi relatiu, no absolut.

PCR BISULFIT: Desprès d'extreure ADN i realitzar la conversió Bisulfit es pot realitzar una PCR per amplificar la regió que ens interessa, en aquest cas es tractava de la regió promotora dels gens seleccionats, i poder seqüenciar-la.

4. WESTERN BLOT

És una tècnica analítica utilitzada per identificar proteïnes específiques en una mescla complexa de proteïnes. Consta de tres etapes: la separació per mida, la transferència a un suport sòlid i, per últim, la visualització mitjançant el marcatge de proteïnes utilitzant anticossos primaris i/o secundaris apropiats.

EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA

Es van mesclar els pellets resuspesos en Laemli bafer, els vam bullir 5 minuts a 95ºC i vam sonicar-les al sonicador. Un aparell que emet ultrasons que trenquen les interaccions intramoleculars que afecten a l'ADN. Amb el nanogram es va quantificar.

ELECTROFORESI EN GEL DE POLIACRILAMIDA

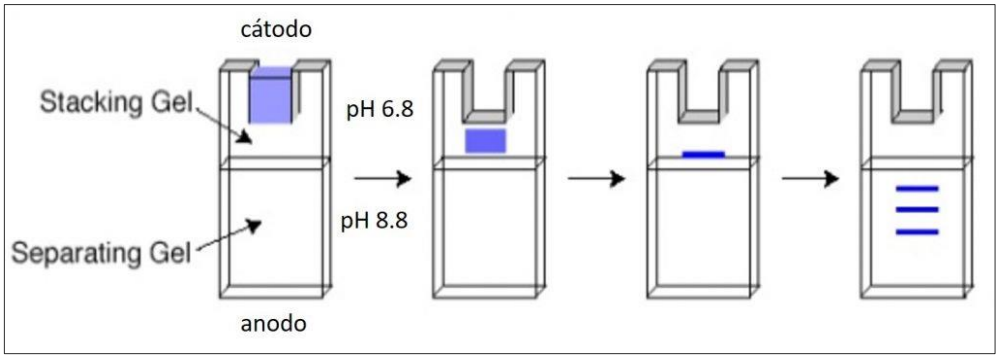
Es tracta d'una tècnica que permet la separació d'una mescla de proteïnes segons el seu pes molecular en un camp elèctric. Perquè això es produeixi són necessàries dues forces oposades: el camp elèctric que dona la mobilitat a la proteïna en base a la seva càrrega y un suport sòlid que retindrà les proteïnes en base a la seva interacció deguda a la grandària. L'objectiu és fer que el moviment de la proteïna en el suport

sòlid, és a dir, el gel, per acció del camp elèctric sigui exclusivament proporcional al seu pes molecular.

El gel és un hidrogel de poliacrilamida que esta format per una gran quantitat d'aigua retinguda en un suport molecular altament porós i reticulat, que resulta un material d'una certa viscositat, un semi sòlid o un sòlid tou. Aquest actua com a suport, es produeix la separació de proteïnes en forma de bandes segons el seu pes molecular gràcies a la fricció de les molècules de la proteïna amb l'estructura del gel.

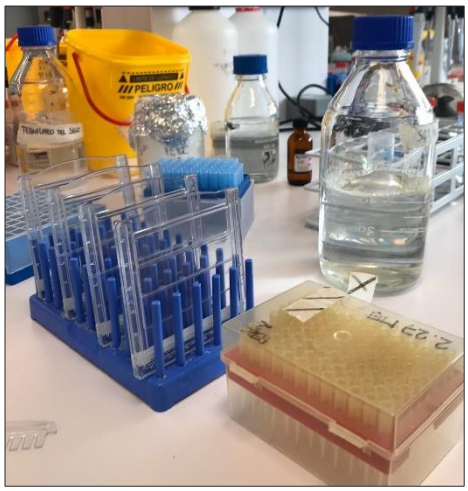
El procés consta de diferents components, per una banda, el gel, que consta de dues parts: el gel concentrador (stacking) i el gel separador (resolving/separating). Abans de que les proteïnes entrin al gel separador, passen per un gel concentrador, a pH 6,8, que evita que les proteïnes es dispersin en el gel i provoca que totes les proteïnes de les mostres s'alineïn en una fina banda que entra al mateix temps i a la mateixa velocitat en el gel concentrador.

Un

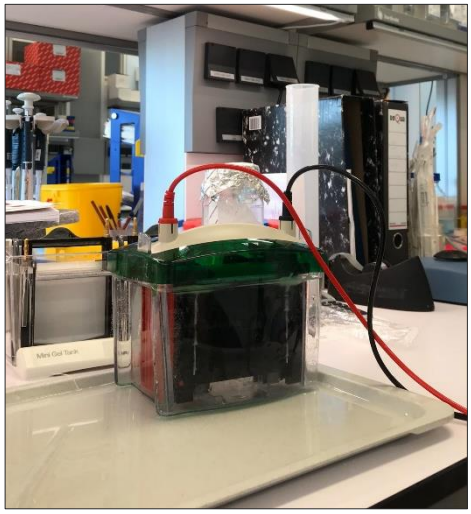


Il·lustració 27: Separació electroforètica. El gel concentrador (stacking) alinea la proteïnes en una fina banda que entra al mateix temps i velocitat en el gel separador, on es separen segona el seu pes molecular.

altre element són els elèctrodes en la cubeta que estableixen el camp elèctric que aportarà la mobilitat electroforètica. També trobem el tampó d'electroforesis que permet la conducció elèctrica i conté components fonamentals en la separació: la glicina i el Tris-HCl. Per últim, la pròpia mostra que es prepara utilitzant un tampó de càrrega o de ruptura que conté quatre components: SDS, mercaptoetanol, glicerol i blau de bromofenol.

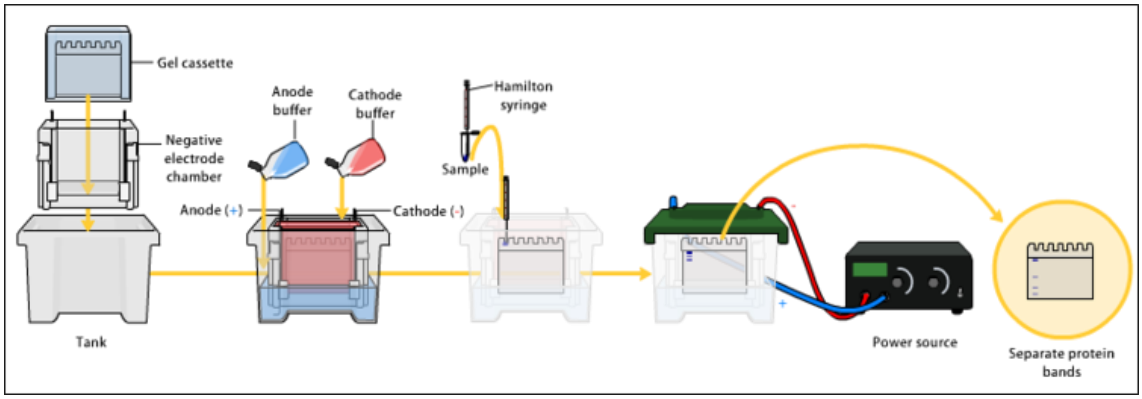


Il·lustració 28: Imatge del laboratori de l'IJEC en que s'observa la preparació dels gels de poliacridamida



Il·lustració 29: Imatge del laboratori de l'IJEC en que s'observa el procés de l'electroforèsi.

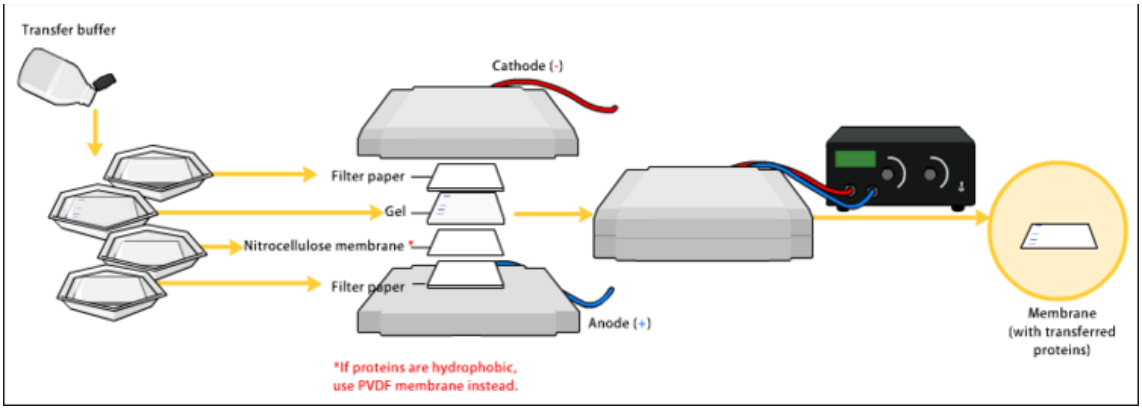
A continuació es produeix la transferència de les proteïnes separades per mida del gel a una membrana adsorbent per poder buscar la proteïna d'interès i anticossos específics contra aquesta.



Il·lustració 30: Esquema gràfic dels diferents processos de l'electroforèsi, amb l'introducció del gel, els buffers d'ànode i de càtode, i l'establiment de corrent elèctric fins a obtenir les bandes separades de proteïna.

TRANSFERÈNCIA AMB ELECTROTRANSFERÈNCIA

Perquè les proteïnes siguin accessibles a la detecció per anticossos, es transfereixen des del gel de poliacrilamida a una membrana, una tècnica per a realitzar aquest procés és l'electrotransferència, que es basa en un corrent elèctric i un tampó de transferència. Primerament, s'apilen diferents elements en el següent ordre, del pol negatiu o càtode al pol positiu o ànode: esponja, papers de filtre amb buffer de transferència, gel, membrana, papers de filtre amb buffer de transferència i esponja. Aquest muntatge, anomenat col·loquialment "sandwich", es disposa en el sistema de transferència i s'aplica el corrent elèctric, la magnitud del qual dependrà dels materials empleats. Les proteïnes del gel es desplaçaran del pol positiu i quedaran atrapades per la membrana, finalment es tenyeix el gel per comprovar que això s'ha produït.



Il·lustració 31: Esquema gràfic del funcionament de l'electrotransferència, amb l'addició del buffer de transferència, el muntatge del "Sandwich" i l'establiment del corrent elèctric per acabar obtenint el traspàs de les proteïnes des del gel a la membrana.

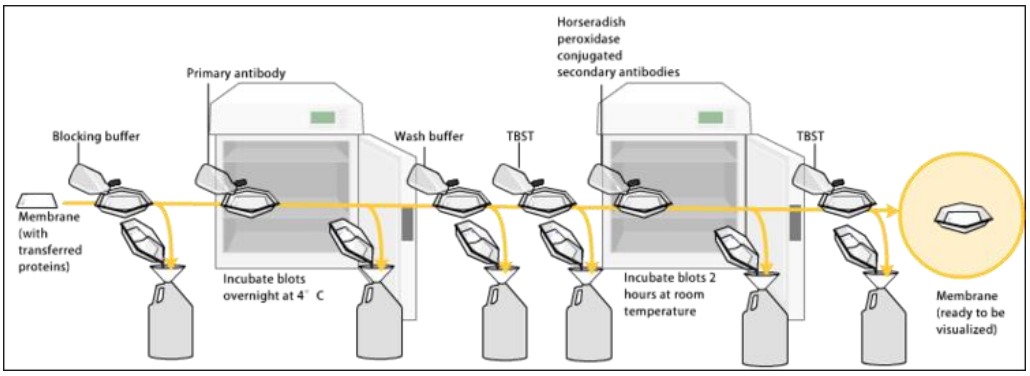
BLOQUEIG

La membrana necessita unir-se amb les proteïnes de manera inespecífica, per tant, es necessari bloquejar els llocs d'unió que han quedat lliures desprès de la transferència, per evitar que l'anticòs s'uneixi a aquests llocs i dificulti la distinció del complexe antígen-anticòs que es forma amb la proteïna que es busca.

Aquest procés consisteix en la incubació de la membrana amb una solució de proteïnes, com la caseïna o llet en pols, perquè s'uneixin als llocs d'unió de la membrana que no estiguin ja ocupats per les proteïnes transferides. D'aquesta manera, l'anticòs s'unirà a l'antigen específic.

DETECCIÓ

En la detecció es comprova la presència en la membrana d'una determinada proteïna. Es produeix mitjançant un mètode de dos passos. Primerament, s'uneix un anticòs primari a la proteïna buscada, aquest s'aconsegueix introduint la proteïna a un animal, com un conill o una cabra. La presència d'aquesta desencadena una resposta immune que produeix un anticòs, el qual s'incuba amb la membrana. A continuació, es produeix un rentat de la membrana per eliminar l'anticòs primari que no s'ha unit i s'exposa a l'anticòs secundari, que reconeix una regió específica del primer anticòs. Aquests, solen provenir d'animals, és a dir, un anticòs secundari "anti ratolí" és aquell capaç de reconèixer gairebé tots els anticossos primaris obtinguts de ratolins.



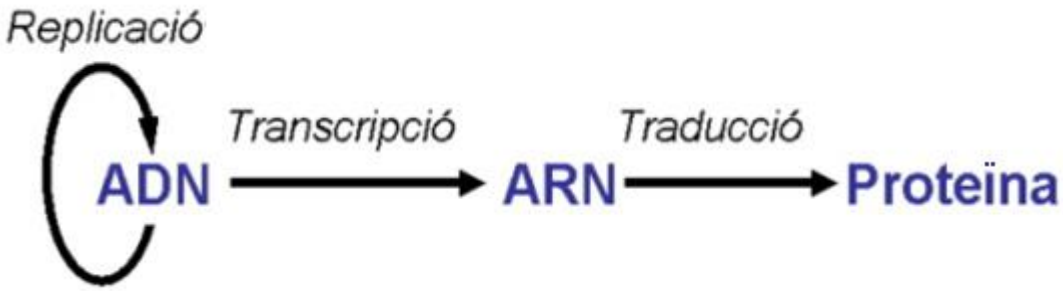
Il·lustració 32: Esquema gràfic del mètode de detecció de dos passos, en que s'uneix un anticòs primari a la proteïna buscada i s'exposa a l'anticòs secundari, que reconeix una regió específica del primer anticòs.

MARCATGE FLUORESCENT

Consisteix en la unió de l'anticòs secundari a un element que emet una quantitat de llum constant quan s'exciten de manera constant, permetent doncs una detecció fluorescent molt precisa. En el laboratori es va utilitzar la proteïna ACRRP, la quantitat de senyal lluminosa que emet ens mostra la senyal del primer anticòs i, per tant, de la proteïna.

1.1.2 Complementarietat dels resultats obtinguts

Les informacions que s'obtenen en les tècniques del Western Blot i de la PCR quantitativa són complementàries, atès que ens mostren l'expressió de les proteïnes. Perquè es formi una proteïna hi ha d'haver l'ARN que la codifiqui i aquest depèn de l'expressió de l'ADN, de que el promotor estigui actiu i s'estigui duent a terme la transcripció.



Il·lustració 33: Esquema gràfic de la replicació de l'ADN, la transcripció a ARN i la traducció a proteïna que mostra els diferents mecanismes dels quals depèn l'expressió de les proteïnes.

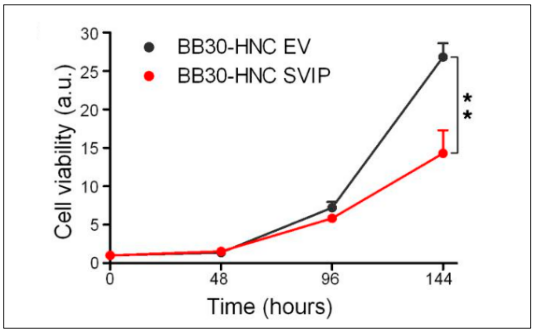
2.1 Característiques supressores de tumors del SVIP

Per analitzar el paper del SVIP en el creixement de tumors es va estudiar l'efecte que té la recuperació de la seva expressió en les cèl·lules. Es va realitzar introduint vectors amb el gen en algunes cèl·lules i vectors buit en altres.

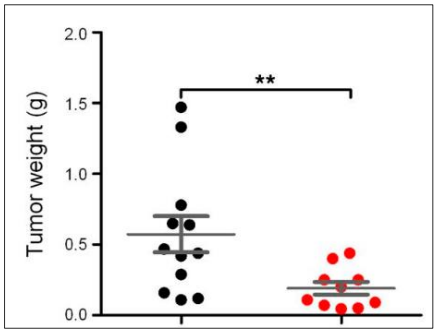
A partir d'aquí, es va observar que les cèl·lules amb el vector amb SVIP expressaven la seva transcripció i la presència d'aquest generava una reducció significativa del creixement tumoral. És per això que, la reducció del SVIP fomentava el creixement mitjançant l'altra expressió del marcador de proliferació CCND1, un gen que codifica la proteïna ciclina D1, encarregada de l'increment dràstic i a intervals de la seva concentració en el cicle cel·lular.

Es va poder observar que els tumors de les cèl·lules que recuperaven l'expressió de gen SVIP pesaven menys que aquelles en que s'havia introduït un vector buit.

Determinant doncs, que el gen SVIP té propietats similars a les dels supressors de tumors.



Il·lustració 34: La transfecció de SVIP redueix la viabilitat de les cèl·lules (en vermell)



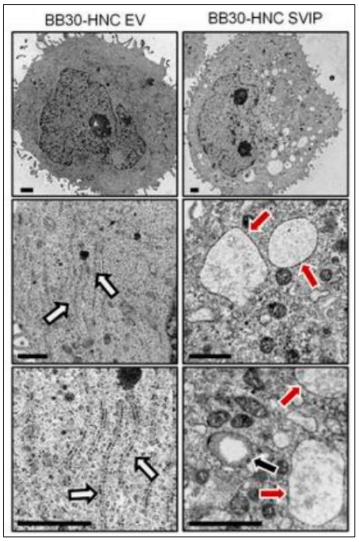
Il·lustració 35: La transfecció del gen SVIP disminueix el pes del tumor (vermell)

2.2 Restauració del SVIP

Anteriorment, s'havia demostrat que la sobreexpressió del gen SVIP generava una acumulació de proteïnes mal plegades que provocaven l'estrès prolongat del reticle endoplasmàtic.

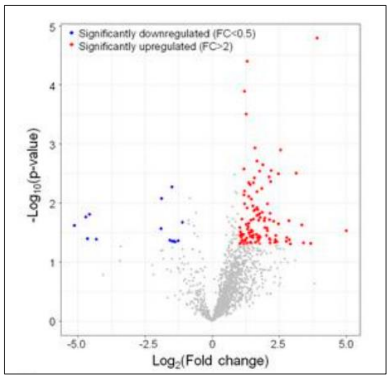
Mitjançant l'observació del fenotip cel·lular i molecular de les línies cel·lulars es va observar l'efecte de l'expressió del SVIP en l'estrès del reticle. Es va poder determinar que es produïa la formació de vacúols derivats del reticle endoplasmàtic, autofagosomes[72] i proteïnes proapoptòtiques[73], atès que es donava un augment de les proteïnes que generaven l'estrès.

Així doncs, es va arribar a la conclusió que les cèl·lules cancerígenes metilaven el gen SVIP per a reduir l'estrès del reticle endoplasmàtic i mantenir l'homeòstasi de les proteïnes, necessària per a la supervivència.



Il·lustració 36: La recuperació del gen SVIP indueix a la dilatació del reticle endoplasmàtic i genera vacúols intracel·lulars derivats d'aquest (senyals amb fletxes vermelles).

2.3 Inducció d'un canvi metabòlic de SVIP



Il·lustració 37: Gràfic del 88% de proteïnes que es van expressar al restaurar SVIP (en vermell)

2.3.1 Recuperació de proteïnes

Mitjançant la tècnica de Western blot es va observar l'acumulació de proteïnes poliubiquitinades[74] que es degradaven en les cèl·lules que contenien una metilació del gen SVIP.

Per identificar proteïnes l'expressió de les quals depengués del SVIP es va realitzar un marcat isotòpic estable d'aminoàcids en cultiu cel·lular (SILAC) amb les cèl·lules que havien recuperat el gen i aquelles que tenien un vector buit. Els resultats van ser que un 88% de les proteïnes es van expressar amb la recuperació del gen, és per això que es pot afirmar que el SVIP millora els nivells de proteïna, però no modifica els nivell d'ARN d'aquestes.

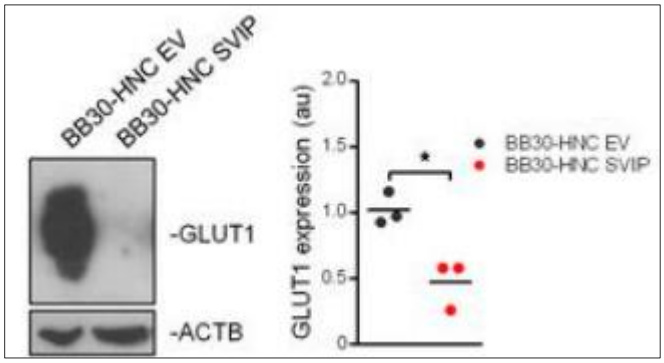
[72] **Autofagosomes**: vesícules de doble membrana que capturen material citoplasmàtic i el transporten fins als liposomes o vacúols, on es degraden per mitjà d'enzims hidrolítics.
[73] **Proapoptòtiques**: proteïnes que poden promoure el desenvolupament de tumors.
[74] **Poliubiquitinades**: que estan marcades per la proteïna ubiquitina, que pot marcar cèl·lules per a que es destrueixin.

2.3.2 Disminució de la captació de glucosa

En les cèl·lules cancerígenes amb vectors buits, es van observar concentracions altes de GLUT 1, tant a nivell de presència de proteïna com d'ARN, mitjançant la tècnica de Western blot i la PCR quantitativa.

La recuperació del gen SVIP s'associa a la disminució del transcrit de GLUT 1, un transportador de glucosa. Per tant, SVIP hipermetilat influeix en la alta transcripció de GLUT1, és a dir, les cèl·lules augmenten la captació de glucosa.

Així doncs, es produeix una sobreexpressió d'aquest transportador de glucosa en tumors, per obtenir la glucosa necessària per sobreviure, que està associada a un augment de la fermentació làctica, i per tant, a la formació de lactat. Es va poder observar que en la restauració de SVIP disminuïen els nivells de lactat. Per tant, es compleix una característica comuna de les cèl·lules canceroses: la dependència de la glucosa per a estimular la glicòlisi en la fermentació.



Il·lustració 38: La recuperació de l'activitat de SVIP provoca una menor expressió de GLUT1 en els nivell de proteïna (esquerre) i ARNm (dreta).

2.3.3 Canvi del fenotip de glicòlisi aeròbica

Es va descobrir que la metilació d'SVIP induïa a alts nivells d'expressió de l'enzim glicolític hexocinasa 1 i baixos nivells de l'enzim mitocondrial UCP2.

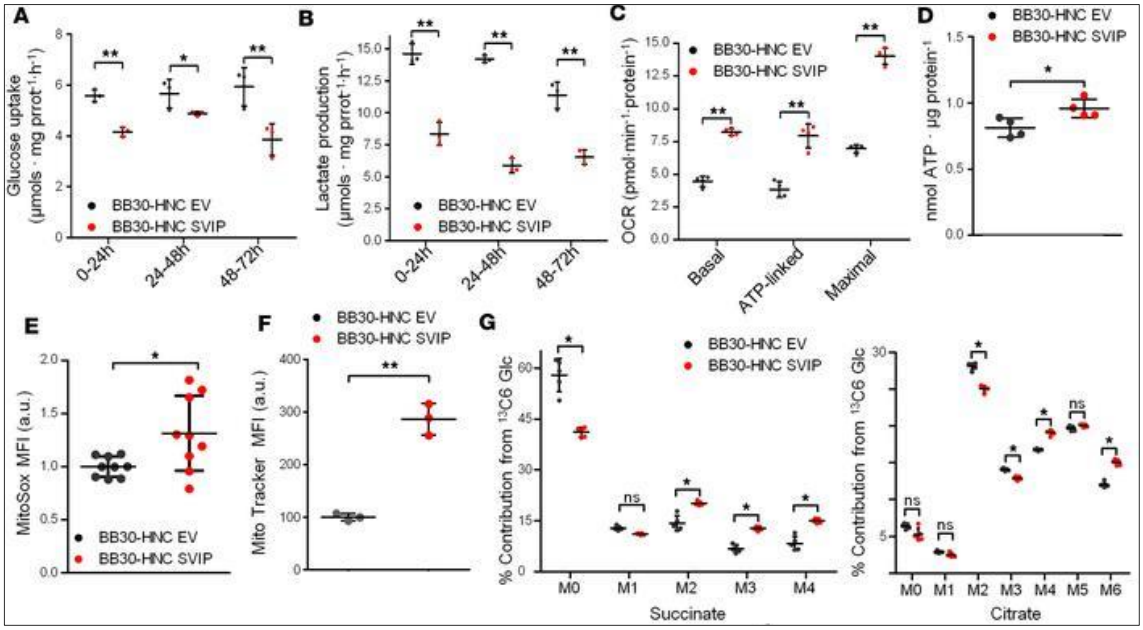
En canvi, en les cèl·lules que havien recuperat l'expressió de SVIP es produïa la recuperació de proteïnes. Algunes d'aquestes proteïnes recuperades són components del metabolisme mitocondrial: SUCLG2, que actua en el cicle de Krebs, NDUFB8 i MT-CO2, que participen en la fosforilació oxidativa, i SLC25A5 que és un portador mitocondrial. Aquestes van ser identificades mitjançant Western blot i PCR quantitativa.

En les cèl·lules que es va recuperar el gen SVIP disminueix la transcripció de GLUT1, i és per això que es podria produir un mecanisme compensatori associat amb l'aparició de proteïnes del metabolisme mitocondrial, en comptes de ser un efecte directe del SVIP sobre la degradació de proteïnes.

Més endavant, també es va constatar que en presència del SVIP la cèl·lula consumia una major quantitat d'oxigen i produïa alts nivells d'ATP, un augment de ROS mitocondrial, de la massa mitocondrial, de l'ús del cicle de Krebs i un major flux de glucosa cap als mitocondris.

Així doncs, es relaciona la recuperació de l'expressió del gen SVIP en cèl·lules cancerígenes amb la presència de proteïnes del metabolisme mitocondrial. I, per tant, s'indica un canvi del metabolisme de la fermentació làctica a la respiració mitocondrial de la glucosa.

En general, les dades obtingudes indiquen que les cèl·lules cancerígenes que alberguen la pèrdua de SVIP associada a la metilació de l'ADN depenen de la glucosa i la fermentació làctica per a obtenir l'energia cel·lular necessària per a la supervivència, mentre que la restauració del gen promou l'ús de la respiració mitocondrial.



Il·lustració 39: A) Les línies cel·lulars que recuperaven el gen SVIP (en vermell) redueixen la captació de glucosa. B) Les línies cel·lulars que recuperaven el gen SVIP redueixen la producció de lactat. C) Les línies cel·lulars que recuperaven el gen SVIP consumeixen més oxigen. D) Les línies cel·lulars que recuperaven el gen SVIP produeixen més ATP. E) En les línies cel·lulars que recuperaven el gen SVIP augmenta la presència de ROS mitocondrial. F) Les línies cel·lulars que recuperaven el gen SVIP augmenten la massa mitocondrial. G) Les línies cel·lulars que recuperaven el gen SVIP produeixen un major flux de glucosa cap als mitocondris.

Els autors de l'article van realitzar un contrast dels resultats obtinguts amb dades extretes del projecte The Cancer Genome Atlas (TCGA), en les que també es va demostrar que la presència de la hipermetilació de l'illa CpG del gen SVIP en diferents tipus de tumors: un 37% en cap i coll, un 19% en cervicals i un 10% en esòfag. Els quals, també presentaven una regulació a la baixa de la seva transcripció, per tant, es confirmava que la metilació de l'ADN produïa la inactivació de la transcripció del gen i, per tant, disminuïa l'expressió del gen SVIP. Això, generava un augment dels marcadors d'estrès del reticle endoplasmàtic, la sobreexressió dels transportadors de glucosa GLUT1 i disminuïa la supervivència dels pacients que la patien. Per tant, es podia utilitzar la hipermetilació del SVIP com a marcador de pronòstic potencial de resultats deficients per neoplàsies malignes.

2.3.4 Ús a nivell terapèutic

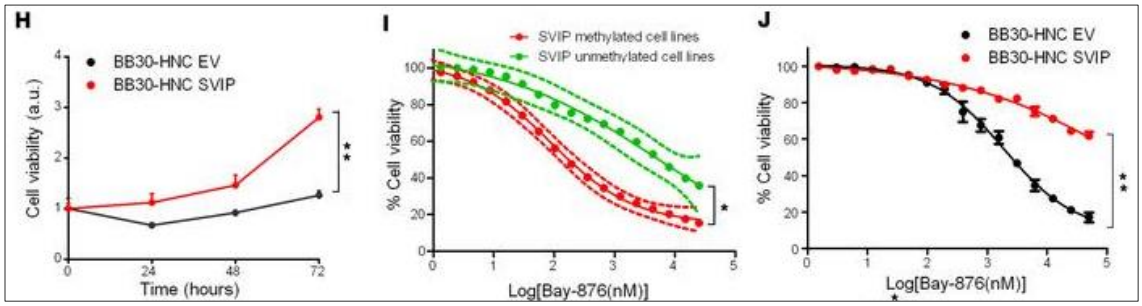
En l'estudi, es pretenia utilitzar la dependència de la glucosa de les cèl·lules cancerígenes amb deficiència epigenètica de SVIP amb fins terapèutics. Per aquest motiu, van examinar, amb tècniques ex vivo[75] i in vivo[76], si els nivells d'expressió de

[75] **Ex vivo**: experiment realitzat a l'exterior de l'organisme en un ambient artificial fora de l'organisme amb les mínimes alteracions de les condicions naturals.

SVIP afectaven al creixement dependent de glucosa. Aquest estudi es va realitzar en un medi amb baix contingut de glucosa, en el que van afegir les cèl·lules que contenien un vector buit i van observar que no hi podien créixer. En canvi, la recuperació de SVIP permetia el seu creixement en aquest medi.

A continuació, van utilitzar Bay-876, un inhibidor específic de GLUT1 i van contemplar les diferents sensibilitats que presentaven les cèl·lules davant d'aquest. Les cèl·lules metilades eren més sensibles al bloqueig de captació de glucosa, en canvi, les cèl·lules que havien patit una restauració del gen SVIP presentaven resistència a Bay-876.

Van realitzar una prova in vivo amb ratolins als que se'ls hi havia introduir tumors per a comprovar l'efecte de l'inhibidor, el resultat va ser que en general no van presentar toxicitat evident. Per tant, es té en compte la possibilitat de fer ús de bloquejadors de la captació de la glucosa en el tractament del càncer.



Il·lustració 40: H) Les línies cel·lulars que recuperaven el gen SVIP (en vermell) augmenten el creixement cel·lular amb un medi amb glucosa (experiment ex vivo). I) Les línies cel·lulars amb el gen SVIP metilat presenten una menor viabilitat davant Bay-876 (en vermell), en canvi les línies cel·lulars que recuperaven el gen SVIP (en verd) presenten més viabilitat (experiment ex vivo). J) Les línies cel·lulars amb el gen SVIP metilat (en negre) són significativament més sensibles a la inhibició del creixement mitjançant el tractament amb Bay-876 (experiment ex vivo).

2.4 Síntesi dels resultats

Les cèl·lules cancerígenes pateixen un estrès metabòlic i proteotòxic intracel·lular, juntament amb un microambient hostil, que han de superar per a poder sobreviure i proliferar. Per adaptar-se, utilitzen diferents mecanismes per a controlar les vies que regulen la quantitat i la qualitat de les proteïnes en la cèl·lula, és a dir, les vies de degradació del reticle endoplasmàtic.

Un d'aquests mecanismes es produeix mitjançant el silenciament associat a la hipermetilació de l'illa CpG del SVIP, un inhibidor de la degradació del reticle endoplasmàtic. Aquest, interactua amb la VCP/p97, un enzim responsable de la

[76] **In vivo**: experiment realitzat a l'interior de l'organisme o a un teixit d'un organisme viu.

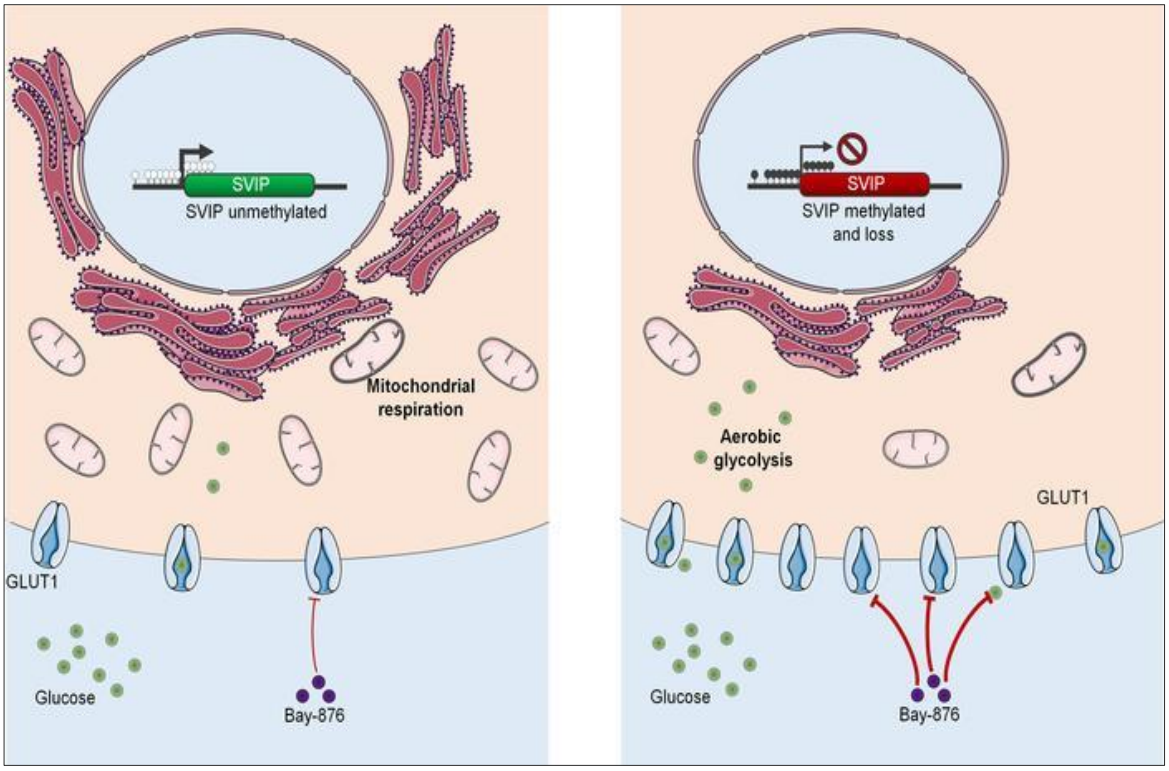
degradació del reticle, i la seva pèrdua resulta una manera efectiva per a la cèl·lula cancerígena per a tractar l'estrès del reticle endoplasmàtic.

La restauració del gen SVIP augmenta aquest l'estrès que, conseqüentment, bloqueja el creixement de les cèl·lules tumorals i produeix l'augment de l'expressió d'una gran quantitat de proteïnes, moltes de les quals són necessàries per al metabolisme mitocondrial. Això, suggereix un paper important del SVIP en la regulació del metabolisme de les cèl·lules cancerígenes.

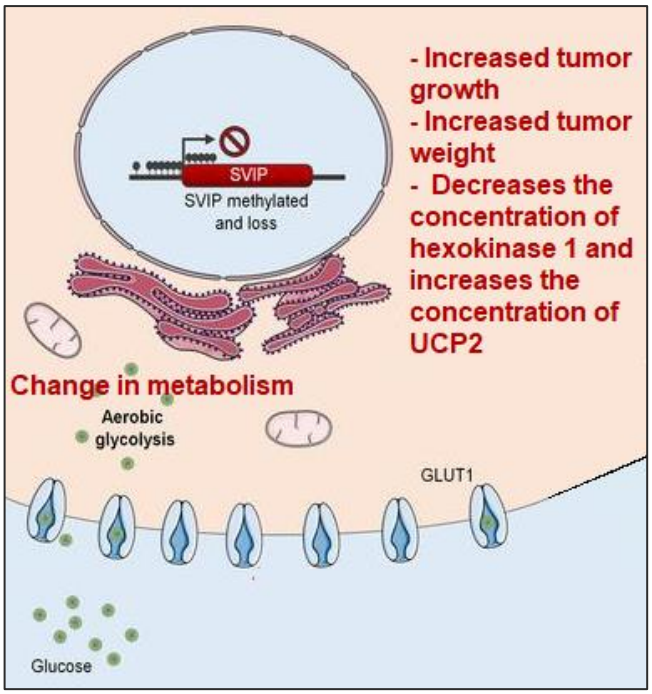
Un dels aspectes més comuns dels tumors humans és la presència de l'efecte Warburg, caracteritzat per la fermentació làctica. Aquest fenotip metabòlic es distingeix, entre altres aspectes, per una major captació de glucosa i producció de lactat independentment de la concentració d'oxigen, una major taxa de glicòlisis i un nivell reduït de fosforilació oxidativa a través del cicle de Krebs. Malgrat que la producció energètica de la glicòlisi és molt inferior a la de la respiració de la glucosa completa, aquest canvi en el metabolisme resulta una selecció positiva en les cèl·lules cancerígenes degut a la producció de metabòlits de la glucosa, que promouen el creixement i un augment en la producció d'ATP no oxidativa.

Aquestes cèl·lules, arriben a expressar l'efecte Warburg gràcies a canvis genètics i epigenètics. Segons l'estudi analitzat, es va deduir que el silenciament epigenètic del SVIP és un mètode freqüent mitjançant el qual els tumors, de tipus cap i coll sobretot, aconsegueixen aquest objectiu. Les cèl·lules que contenen aquesta alteració epigenètica, es caracteritzen per una major captació de glucosa i producció de lactat, una menor massa i activitat mitocondrial i una major dependència de la glucosa. En canvi, la restauració del gen SVIP converteix el fenotip de Warburg en un de respiració mitocondrial.

Les cèl·lules amb el defecte epigenètic del SVIP, presenten alts nivells de GLUT 1, una proteïna responsable de la captació cel·lular, en línies cel·lulars i tumors primaris, mentre que in vitro, aquestes cèl·lules tenen una gran dependència de la glucosa per al seu creixement. Aquestes, són molt sensibles a Bay-876, un inhibidor específic de GLUT1, mentre que la recuperació de SVIP produeix resistència al medicament. Aspecte que pot resultar significatiu en el context clínic, perquè els tumors humans que sobreexpressen GLUT1 generalment s'associen a un mal pronòstic en els pacients.



Il·lustració 41: (Esquerra) Representació gràfica de la cèl·lula amb el gen SVIP sense metilar, en la qual la glucosa entra a la cèl·lula pels transportadors de glucosa GLUT1 i es produeix la respiració de la glucosa a través dels mitocondris. A més a més, Bay-876 no afecta al funcionament de la cèl·lula. (Dreta) Representació gràcia de la cèl·lula amb el gen SVIP metilat, en la qual la glucosa entra a la cèl·lula pels transportadors de glucosa GLUT1, els quals estan sobreexpressats, i es produeix la respiració de la glucosa a través de la fermentació làctica. On Bay-876 afecta en els transportadors de glucosa impedint el seu funcionament.



I·lustració 42: Representació gràfica dels efectes de la metilació d'SVIP. Per una banda, augmenta el creixement tumoral a traves de l'augment de CCND1, un marcador de proliferació que codifica la proteïna Ciclina D1, i conseqüentment, augmenta el pes del tumor, inhibint així les propietats supressores de tumors de SVIP. També, disminueix l'estrès del reticle endoplasmàtic mitjançant la degradació de les proteïnes poliubiquitinades que li permet mantenir l'homeòstasi. Per altra banda, augmenta la concentració de GLUT 1 i la de l'enzim glicolític Hexocinasa 1 i disminueix la de l'enzim mitocondrial UCP 2. És per això que podem afirmar que, es produeix un canvi en el metabolisme, es deixa de produir la respiració mitocondrial i es passa

CONCLUSIONS

Si bé l'elaboració d'aquest treball ha estat un procés llarg i laboriós, no ha estat menys interessant i enriquidor. A continuació s'exposaran els diferents objectius amb les seves respectives valoracions, així com la hipòtesi proposada inicialment.

Estudiar els processos metabòlics que intervenen en l'obtenció d'energia de les cèl·lules.

Gràcies a la investigació realitzada i havent disposat de material i informació actualitzada, he pogut estudiar a nivell teòric el funcionament, el control i les diferents molècules que participen del metabolisme cel·lular. Centrant-me posteriorment en el catabolisme i els diferents processos mitjançant els quals la cèl·lula produeix la transformació de molècules orgàniques o biomolècules complexes en molècules senzilles, i en l'emmagatzematge de l'energia química despresa. L'anàlisi del funcionament d'aquests mecanismes m'ha permès entendre la activitat catalítica de les cèl·lules sanes, i m'ha estat de gran utilitat per comprendre la diferència entre aquesta i les vies de degradació que segueixen les cèl·lules cancerígenes per obtenir energia i adoptar les seves característiques proliferatives i agressives.

Definir les vies que utilitzen les cèl·lules cancerígenes per aconseguir energia i per a proliferar, tenint en compte els factors, reconeguts científicament en l'actualitat, que generen alteracions en el seu metabolisme.

L'estudi dels diferents mecanismes interns que segueix la malaltia del càncer per a tenir el control o evadir dels mecanismes antitumorals, per tal de mantenir el ràpid creixement i desenvolupament dels tumors, m'ha permès comprendre el funcionament del seu metabolisme alterat. Fent una recerca en investigacions anteriors en que ja s'havia descrit que aquesta malaltia presentava la funció mitocondrial bioenergètica alterada, amb l'efecte Pasteur, que les cèl·lules únicament completaven la glicòlisi i no realitzaven la fosforilació oxidativa malgrat la presència d'oxigen amb l'efecte Warburg. Per últim, recentment s'ha observat una necessitat en les cèl·lules tumorals de contenir una alteració en la funció dels mitocondris, definint la seva activitat energètica com a supressor tumoral, amb la petjada bioenergètica. Aquesta última, està essent estudiada actualment atès que la reducció de producció d'ATP és comú en tots els tipus de càncer i aquest aspecte podria ser de gran interès de cara a tractaments contra la malaltia.

Contrastar el motiu pel qual les cèl·lules tumorals segueixen una determinada via glicolítica.

Observats els assumptes que es donen durant l'aparició i posterior progressió del càncer, tractats en l'anterior objectiu, vaig decidir focalitzar la recerca en l'estudi de la reprogramació metabòlica del càncer, com l'activació de l'activitat glicolítica definia el fenotip metabòlic proliferatiu i la seva conseqüent agressivitat en les cèl·lules. Atenent a que aquesta activació podria esta produïda per diferents factors, vaig realitzar una definició del microambient tumoral i com la situació d'hipòxia dels tumors podia derivar en l'augment de la concentració del transportador de glucosa GLUT 1. Seguidament, em vaig centrar en dos factors que contribuïen a l'establiment del microambient tumoral la inflamació tumoral i la inestabilitat genòmica, dirigint la recerca als diferents gens que comunament generaven aquesta inestabilitat, per acabar concloent amb l'observació i estudi del gen SVIP.

Com a part pràctica del treball, realitzar, per una banda, una revisió i comprensió de l'estudi basat en la inducció a la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses que produeix SVIP i, per altra banda, una experiència a un laboratori de les instal·lacions del IJC, per observar i entendre les tècniques epigenètiques d'avantguarda empleades en l'estudi revisat.

Gràcies a la meva estada ens els laboratoris vaig poder comprendre diferents conceptes bàsics d'epigenètica que desconeixia que em van ser claus per a la descripció del l'article *Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum–associated degradation inhibidor. SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming.* Sobretot, van resultar-me molt útils l'observació i participació de tècniques com l'extracció d'ADN, la conversió bisulfit, la PCR quantitativa, el protocol Western Blot, que inclou l'electroforesi i l'electrotransferència. Així doncs, a partir de l'article vaig extreure que la metilació del gen SVIP és una de les alteracions epigenètiques responsables de la reprogramació metabòlica de la malaltia del càncer.

Aprofitar la pràctica de laboratori per acostar-me i establir contacte físic amb el món de la recerca, els seus mètodes, el seu instrumental i les seves instal·lacions.

L'experiència de laboratori, gràcies al suport de l'IJEC, em va permetre acomplir aquest darrer objectiu sent veritablement interessant i enriquidora per concedir-me l'oportunitat d'acostar-me a la realitat del món de la investigació i la recerca.

La validació dels diferents objectius ens porta a la demostració de la hipòtesi inicial:

Els canvis metabòlics que, seguint el fenotip descrit per l'efecte Warburg, inhibeixen la respiració mitocondrial de la glucosa en favor de la fermentació làctica, són mediats per alteracions epigenètiques.

Gràcies a la descripció de l'estudi vaig saber que un exemple d'alteració genètica que produïa els canvis metabòlics en la cèl·lula tumoral era la metilació d'SVIP en els càncers de cap i coll. Aquesta, per una banda, augmenta el creixement tumoral a traves de l'augment de CCND1, un marcador de proliferació, i conseqüentment, augmenta el pes del tumor, inhibint així les propietats supressores de tumors de SVIP. Per altra banda, augmenta la concentració del transportador de glucosa GLUT 1 i la de l'enzim glicolític Hexocinasa 1 i disminueix la de l'enzim mitocondrial UCP 2. És per això que podem afirmar que, es produeix un canvi en el metabolisme, es deixa de produir la respiració mitocondrial i es passa a produir la fermentació làctica.

Havent finalitzat el treball, puc dir que el concloc donant compliment als objectius que em vaig proposar inicialment i validant la meva hipòtesi. He pogut constatar allò que ja sabia i aclarir diferents llacunes pel que fa als factors que determinen la redirecció metabòlica de la malaltia del càncer. Ara sé exactament que es tracta d'alteracions epigenètiques, com la metilació la sobreexpressió de diferents gens, i com s'està abordant el seu estudi en l'actualitat, especialment pel que fa al paper del gen SVIP.

El fet d'haver pogut disposar d'informació actualitzada i d'haver pogut treballar amb la col·laboració de professionals com en Pere Llinàs, bioquímic del laboratori de l'IJEC, m'ha brindat l'oportunitat de conèixer els avenços d'avantguarda en l'àmbit d'estudi del càncer. Descobrint així que, malgrat que han estat significant els avenços que s'han aconseguit en l'estudi d'aquesta malaltia, encara queda molt de camí per recórrer. És

necessària molta investigació per comprendre la malalta i intentar minimitzar al màxim les possibles repercussions de la teràpia contra el càncer en la resta de cèl·lules sanes del cos, garantint els resultats favorables i evitant les morts que aquesta provoca. Són múltiples les fites que es poden assolir amb el tractament amb Bay 876, un inhibidor específic de GLUT1 al qual les cèl·lules tumorals són molt sensibles, mentre que la recuperació de SVIP produeix resistència al medicament. De ser assolides les expectatives de fer-ne ús a nivell terapèutic, implicarien un gran pas en la diagnosi i tractament de la malaltia. Tot apunta a que la meta és cada vegada més propera gràcies a l'exhaustiu treball que s'efectua des dels diferents centres d'investigació d'arreu del món.

La meva recerca m'ha permès observar la importància de l'estudi científic, realment m'ha portat a admirar a aquelles persones perseverants que aconsegueixen mitjançant l'estudi arribar a conclusions que poden resultar determinants per a la vida. I això, m'ha encoratjat a seguir esforçant-me dia rere dia per arribar algun dia a participar d'investigacions que resultin profitoses i eficients, sempre amb l'objectiu de garantir la salut i les millores en la vida de les persones.

BIBLOGRAFIA

Gustavo F. Gonzales Rengifo, Cynthia Gonzales Castañeda, Diego Espinosa Guerinoni, Cristina Rojas Tubeh, Sobre expresión de genes de las enzimas de la vía glicolítica en células cancerígenas. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172859172007000300011 *Darrera consulta: Juny 2019*

Ken Peeters, Frederik Van Leemputte, Baptiste Fischer, Beatriz M. Bonini, Hector Quezada, Maksym Tsytlonok, Dorien Haesen, Ward Vanthienen, Nuno Bernardes, Carmen Bravo Gonzalez-Blas, Veerle Janssens, Peter Tompa, Wim Versées & Johan M. Thevelein, Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. https://www.nature.com/articles/s41467-017-01019-z *Darrera consulta: Juny 2019*

Oscar H. Martínez-Costa**,** Glicolisis, efecto Warburg y flexibilidad metabólica tumoral. https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/1063-glicolisis-efecto-warburg-y-flexibilidad-metabolica-tumoral *Darrera consulta: Juny 2019*

Pere Llinàs-Arias, Margalida Rosselló-Tortella, Paula López-Serra, Montserrat Pérez-Salvia, Fernando Setién, Silvia Marin, Juan P. Muñoz, Alexandra Junza, Jordi Capellades, María E. Calleja-Cervantes, Humberto J. Ferreira, Manuel Castro de Moura, Marina Srbic, Anna Martínez-Cardús, Carolina de la Torre, Alberto Villanueva, Marta Cascante, Oscar Yanes, Antonio Zorzano, Catia Moutinho, and Manel Esteller. Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum–associated degradation inhibitor SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming https://insight.jci.org/articles/view/125888 *Darrera consulta: Novembre 2019*

Santillana, Biologia 2n de Batxillerat sèrie observa

WEBGRAFIA

Arturo Valle Mendiola, Isabel Soto Cruz, Metabolisme energético y Cáncer https://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2014/vre142f.pdf *Darrera consulta: Agost 2019*

Asociación Española contra el Cáncer, Fases y etapas del cáncer https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/fases *Darrera consulta: Agost 2019*

BD, Etapas del Cáncer https://www.crbard.com/es-ES/patients-caregivers/cancer/cancer-stages-facts *Darrera consulta: Agost 2019*

Cáncerquest, El Cáncer por tipo https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/cancer-por-tipo *Darrera consulta: Agost 2019*

Cáncerquest, genes del cáncer https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/genes-de-cancer *Darrera consulta: Agost 2019*

Catherine Sánchez N.Dra., Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S071686401370659X *Darrera consulta: Agost 2019*

CNN, ¿Hay alguna relación entre el cáncer y el azúcar? https://cnnespanol.cnn.com/2017/10/27/hay-alguna-relacion-entre-el-cancer-y-el-azucar/amp/ *Darrera consulta: Juny 2019*

Cristina Muñoz-Pinedo, Grupo de Regulación de la Muerte Celular. Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), El metabolismo del cáncer es diferente del de las células que no proliferan. Los oncogenes y los genes supresores de tumores modifican el metabolismo para adaptar el uso de nutrientes al crecimiento celular. https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/acercate-nuestros-cientificos/261-cristina-munoz-agosto-2013-el-metabolismo-del-cancer *Darrera consulta: Agost 2019*

Diego González, Nuevos hallazgos sobre la relación entre el azúcar y el cáncer. https://www.elplural.com/autonomias/nuevos-hallazgos-sobre-la-relacion-entre-el-azucar-y-el-cancer_126611102_amp *Darrera consulta: Juny 2019*

Dr. Ananya Mandal, Clasificación del Cáncer https://www.news-medical.net/health/Cancer-Classification-(Spanish).aspx *Darrera consulta: Agost 2019*

Dr. Jason Fung, El efecto Warburg y el cáncer. https://www.dietdoctor.com/es/el-efecto-warburg-y-el-cancer *Darrera consulta: Juny 2019*

El metabolisme cel·lular. Catabolisme. https://blocs.xtec.cat/cnduc/files/2009/11/metab07pp.pdf *Darrera consulta: Juliol 2019*

El Mundo, Descubierta la huella bioenergética del cáncer https://www.elmundo.es/elmundosalud/2002/12/03/cancer/1038944114.html *Darrera consulta: Setembre 2019*

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer http://www.cicancer.org/es/biologia-molecular-y-cncer-el-paradigma-genetico *Darrera consulta: Agost 2019*

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Los genes implicados en procesos tumorales http://www.cicancer.org/es/los-genes-implicados-en-procesos-tumorales *Darrera consulta: Agost 2019*

Instituto Nacional del Cáncer, ¿Qué es el Cáncer? https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es *Darrera consulta: Agost 2019*

Instituto Nacional del Cáncer, Cánceres de Cabeza y Cuello https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/hoja-informativa-cabeza-cuello *Darrera consulta: Novembre 2019*

Instituto Nacional del Cáncer, Diccionario del Cáncer: Hiperplasia https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/hiperplasia*Darrera consulta: Agost 2019*

Instituto Nacional del Cáncer, Genética del cáncer https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica *Darrera consulta: Agost 2019*

Introducció al metabolismo.

https://blocs.xtec.cat/adultspremi/files/2012/10/1.07.Introducci%c3%b3almetabolisme.pdf *Darrera consulta: Juliol 2019*

Javier Yanes, La fatal relación entre azúcar y cáncer: a los tumores les encanta la glucosa. https://www.elespanol.com/ciencia/salud/20171123/264224311_0.amp.html *Darrera consulta: Juny 2019*

José M. Cuezca, La huella metabólica del cáncer file:///C:/Users/CARO/Downloads/580-2529-1-PB.pdf *Darrera consulta: Setembre 2019*

Kristin Suleng, Cómo el azúcar afecta al metabolismo del cáncer. https://elpais.com/elpais/2017/11/24/buenavida/1511534186_704340.amp.html *Darrera consulta: Juny 2019*

Metabolisme.

http://www.xtec.cat/centres/a8046657/seminaris/nat/BIO-2/METABOLISME2.pdf

Darrera consulta: Juliol 2019

Metabolismo de una célula normal, Cancer Quest. https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/metabolismo *Darrera consulta: Agost 2019*

Odile Fernández, Las células tumorales son adictas a la glucosa. http://oncologiaintegrativa.org/web/tumores-cancer-adicto-glucosa/ *Darrera consulta: Juny 2019*

Oscar H. Martínez-Costa, Glicolisis, efecto Warburg y flexibilidad metabólica tumoral https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/1063-glicolisis-efecto-warburg-y-flexibilidad-metabolica-tumoral *Darrera consulta: Agost 2019*

Sergio Álvarez, El metabolismo de la célula tumoral https://naukas.com/2019/04/10/el-metabolismo-de-la-celula-tumoral/ *Darrera consulta: Agost 2019*

SINC, Descubren el mecanismo que permite al cáncer sobrevivir sin glucosa. https://www.agenciasinc.es/Noticias/Descubren-el-mecanismo-que-permite-al-cancer-sobrevivir-sin-glucosa *Darrera consulta: Juny 2019*

Universidad Autónoma de Madrid, Descubren las vías de señalización que permiten la progresión del cáncer de colon http://www.uam.es/ss/Satellite/es/1242652871049/1242665655219/notcientifica/notCientific/Descubren_las_vias_de_senalizacion_que_permiten_la_progresion_del_cancer_de_colon.htm *Darrera consulta: Setembre 2019*

Uvic, Anàlisi del metabolismo del càncer http://premisrecerca.uvic.cat/sites/default/files/webform/analisi_del_metabolisme_del_cancer_-_uvic.pdf *Darrera consulta: Agost 2019*

Valeria Perasso, 10 gráficos para entender el grave impacto del cáncer en el mundo. https://www.bbc.com/mundo/noticias/2016/02/160203_cancer_graficos_impacto_men *Darrera consulta: Juny 2019*

Wikipedia, Anaplasia https://es.wikipedia.org/wiki/Anaplasia *Darrera consulta: Agost 2019*

Wikipedia, Cáncer https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer *Darrera consulta: Agost 2019*

Wikipedia, Desfosforilació https://ca.wikipedia.org/wiki/Desfosforilaci%C3%B3 *Darrera consulta: Novembre 2019*

Wikipedia, Displasia https://es.wikipedia.org/wiki/Displasia *Darrera consulta: Agost 2019*

Wikipedia, Efecto Pasteur https://es.wikipedia.org/wiki/Efecto_Pasteur *Darrera consulta: Setembre 2019*

Wikipedia, Especie reactiva de oxígeno https://es.wikipedia.org/wiki/Especie_reactiva_de_ox%C3%ADgeno *Darrera consulta: Novembre 2019*

Wikipedia, Hiperplasia https://es.wikipedia.org/wiki/Hiperplasia *Darrera consulta: Agost 2019*

Wikipedia, Illa CpG https://ca.wikipedia.org/wiki/Illa_CpG *Darrera consulta: Novembre 2019*

Wikipedia, Macròfag https://ca.wikipedia.org/wiki/Macr%C3%B2fag *Darrera consulta: Novembre 2019*

Wikipedia, Mastòcit https://ca.wikipedia.org/wiki/Mast%C3%B2cit *Darrera consulta: Novembre 2019*

Wikipedia, Pepsina https://ca.wikipedia.org/wiki/Pepsina *Darrera consulta: Novembre 2019*

Wikipedia, Sistema immunitari adaptatiu https://ca.wikipedia.org/wiki/Sistema_immunitari_adaptatiu *Darrera consulta: Novembre 2019*

Wikipedia, Sistema immunitari innat https://ca.wikipedia.org/wiki/Sistema_immunitari_innat *Darrera consulta: Novembre 2019*

Wikipedia, Ubiquitina https://ca.wikipedia.org/wiki/Ubiquitina *Darrera consulta: Novembre 2019*

Xavier Duran, Investigadors catalans descobreixen com atacar càncers deixant-los sense energía. https://www.ccma.cat/324/investigadors-catalans-descobreixen-com-atacar-cancers-deixant-los-sense-energia/noticia/2909621/ *Darrera consulta: Juliol 2019*

GLOSSARI

A

Acetil-CoA: molècula intermediària clau del metabolisme que intervé en un gran nombre de reaccions bioquímiques.

Àcid pantotènic o Vitamina B_5: vitamina hidrosoluble necessària per a la formació del coenzim A i considerada crítica en el metabolisme i síntesi de glúcids, lípids i proteïnes.

Aldosa: monosacàrid amb un grup aldehid.

ATP-sintetasa: complex enzimàtic de membrana que combina la síntesi i/o hidròlisi d'ATP amb el transport de protons a través d'una membrana.

Autofagosomes: vesícules de doble membrana que capturen material citoplasmàtic i el transporten fins als liposomes o vacúols, on es degraden per mitjà d'enzims hidrolítics.

C

Cadena transportadora d'electrons: sèrie de transportadors d'electrons que es troba a la membrana interna mitocondrial, que mitjançant reaccions bioquímiques produeix ATP.

Càncer de cap i coll: Els càncers que es coneixen en conjunt com càncers de cap i coll, generalment, comencen a les cèl·lules escamoses que revesteixen les superfícies humides i mucoses de l'interior del cap i del coll (per exemple, dins de la boca, del nas i de la gola).

Cariotip: patró cromosòmic d'una espècie expressat a través d'un codi, establert per conveni, que descriu les característiques dels seus cromosomes.

Cèl·lules estromals: cèl·lules mesenquimals.

Cèl·lules germinatives: cèl·lula reproductora del cos.

Cèl·lules hiperplàsies: cèl·lules que mostren aparença de ser sanes al microscopi, però que poden convertir-se en cancerígenes.

Cèl·lules mesenquimàtiques: són cèl·lules que tenen la capacitat de diferenciar-se en diversos tipus de cèl·lules.

Cetosa: monosacàrid amb un grup cetona.

Citocromoxidasa: últim enzim de la cadena de transport d'electrons del mitocondri.

Citocroms: proteïnes encarregades del transport de l'energia química.
Citoquines angiogèniques: proteïnes capaces de coordinar la resposta del sistema immunològic.
Citosol: líquid que es localitza a l'interior de les cèl·lules.
Clons neoplàstics: cèl·lules idèntiques amb anormalitats genètiques o epigenètiques.

D

Desfosforilació: procés essencial per treure els grups fosfat d'un compost orgànic (com l'ATP) per hidròlisi.

E

Electronegativitat: capacitat d'un àtom per atraure els electrons quan forma un enllaç químic en una molècula.

Enzims catabòlics al·lostèrics: enzims que canvien la seva conformació al unir-se'ls un efector.

Estructura terciària: disposició tridimensional dels àtoms que formen l'enzim.

Exvivo: experiment realitzat a l'exterior de l'organisme en un ambient artificial fora de l'organisme amb les mínimes alteracions de les condicions naturals.

F

FAD: coenzim que intervé en les reaccions metabòliques d'oxidació-reducció.

Fagocitar: procés que fan les cèl·lules i alguns organismes unicel·lulars de capturar i digerir partícules sòlides nocives o aliment

Fenotip metabòlic: conjunt de caràcters del metabolisme d'un individu com a resultat de la interacció entre el seu genotip i el medi.
Fibroblasts: cèl·lules pròpies del teixit conjuntiu encarregades de la síntesi dels components de la matriu.
Fosfata alcalina: enzim hidrolasa que suprimeix grups fosfats de diferents tipus de molècules, com els enzims.

G

Genotòxic: nociu, que afecta la integritat del material genètic d'una cèl·lula .
Gens retrovirals: virus que el seu genoma en fase extracel·lular és d'ARN.

Glucosa: monosacàrid formar per 6 àtoms de carboni.

Glutaminòlisi: sèrie de reacciones bioquímiques de degradació de l'aminoàcid glutamina.

H

Heteroproteïna: molècules que presenten una part proteica i una altre no proteica.

Hidròlisi: catàlisi (trencament) d'un enllaç químic a través de l'adició d'aigua.

Hipermetilació: transferència de grups metil a algunes de les bases citosines (C) de l'ADN situades prèvia i contínuament a una guanina (G). Com que la metilació és fonamental en la regulació del silenciament gènic, pot provocar alteracions en la transcripció genètica sense necessitat que es produeixi una alteració en la seqüència de l'ADN, sent un dels mecanismes responsables de la plasticitat fenotípica.
Hipòxia: estat de deficiència d'oxigen a les cèl·lules, els teixits i l'organisme que necessiten de l'oxigen per a realitzar les seves funcions.
Homeòstasi: conjunt de fenòmens d'autoregulació, conduents al manteniment d'una relativa constància en la composició i les propietats del medi intern d'un organisme.

I

Illa CpG: regions d'ADN que es troben aproximadament en un 40% dels promotors dels gens dels mamífers, en un 70% dels humans, en les que existeix una gran concentració de parells de citosines i guanines enllaçats per fosfats.
Invasió tissular: invasió d'un teixit.

Invasió tissular: invasió dels teixits.

Invivo: experiment realitzat a l'interior de l'organisme o a un teixit d'un organisme viu.

L

Lligands: espècie rica en electrons que forma part de l'esfera de coordinació d'un metall, generalment de transició.

M

Macròfags: cèl·lula amb capacitat immunològica present al teixit conjuntiu.

Mastòcits: cèl·lules que tenen el seu origen en la medul·la òssia, on s'originen els precursors immadurs, que tenen un curt recorregut en la sang i que en arribar als teixits, especialment el teixit conjuntiu, es converteixen en mastòcits.

Matriu mitocondrial: espai aquós comprès dins la membrana mitocondrial interna.

Membrana de les crestes mitocondrials: membrana interna de la mitocondri caracteritzada per tenir replecs en forma de crestes.

Membrana plasmàtica: bicapa lipídica que delimita la cèl·lula.

Mitocondris: orgànuls cel·lulars encarregats de subministrar la major part de l'energia necessària per a l'activitat cel·lular.

Modificacions epigenètiques: mecanismes que regulen l'expressió gènica sense modificar l'ADN.

Molècules precursores endotelials: cèl·lules d'un tipus d'epiteli pla simple, d'una sola capa de cèl·lules, que recobreix l'interior de tots els vasos sanguinis, inclòs el cor.

N

NAD+: coenzim que s'encarrega de l'intercanvi de protons i electrons i de la producció d'energia de totes les cèl·lules.

Neovascularització: desenvolupament de nous vasos sanguinis.

Nòduls: àrees sòlides de teixit, habitualment ben delimitades.

Nucleòtid: unitats estructurals bàsiques dels àcids nucleics, compostes per molècules d'àcid fosfòric, un glúcid de cinc carbonis, és a dir, una pentosa, i bases nitrogenades.

O

Oligoelements: bioelements que es presenten en molt baixa proporció.

P

Parènquima: cèl·lules proliferatives que formen un tumor

Pepsina: enzim que segreguen algunes vàlvules de l'estómac dels vertebrats i que intervé en la digestió de les proteïnes.

Pepsinogen: proenzim precursor de la pepsina.

Ploïdia: nombre de jocs complets de cromosomes d'una cèl·lula.

Poliubiquitinades: que estan marcades per la proteïna ubiquitina, que pot marcar cèl·lules per a que es destrueixin.

Principis nutritius exògens: nutrients formats a l'exterior del cos.

Proapoptòtiques: proteïnes que poden promoure el desenvolupament de tumors.

R

Reacció endotèrmica: reaccions que absorbeixen energia de l'entorn.

Reacció exotèrmica: reaccions que desprenen energia a l'exterior.

Reaccions químiques immediates: es produeixen sense la intervenció d'energia externa, s'efectuen posant en contacte les substàncies.

Receptors tirosina cinasa: conjunt d'enzims associats a la membrana cel·lular que catalitzen la transferència d'un grup fosfat des de l'ATP a un residu de tirosina de una proteïna.

Reticle endoplasmàtic: orgànul cel·lular que únicament es troba en cèl·lules eucariotes format per una xarxa de membranes interconnectades que formen cisternes, tubs aplanats i sàculs comunicats entre si, que intervenen en funcions relacionades amb la síntesi proteica i el transport intracel·lular.

Retroalimentació negativa: en el sistema endocrí el que fa és impedir actuar a algun enzim perquè aquest modifiqui la seva acció en algun procés, així un catalitzador fa que es produeixi una substància en específic i el producte pot actuar sobre l'enzim.

Ribozims: àcids ribonucleics (ARN) amb capacitat enzimàtica.

ROS: inclouen ions d'oxigen, radicals lliures i peròxids tant inorgànics com orgànics. Són generalment molècules molt petites altament reactives a causa de la presència d'una capa d'electrons de València no aparellada. Aquestes espècies es formen de manera natural com a subproducte del metabolisme normal de l'oxigen i tenen un important paper en la senyalització cel·lular. No obstant això, en èpoques d'estrès ambiental els seus nivells poden augmentar en gran mesura, la qual cosa pot generar

danys significatius a les estructures cel·lulars, una situació coneguda com a estrès oxidatiu.

S

Senescència: procés iniciat com a resposta a l'estrès i dany ocorregut en una cèl·lula, i constitueix una ruta alternativa de resposta a la mort cel·lular programada i és de vital importància per suprimir la formació de cèl·lules canceroses.

Silenciament transcripcional: control, regulació i eliminació del material genètic.

Sistema immune adaptatiu: es compon de cèl·lules i processos sistèmics altament especialitzats que eliminen o eviten les amenaces de patògens.

Sistema immune innat: conjunt de cèl·lules i mecanismes que defensen un hoste de les infeccions per part d'altres organismes, de manera no específica. Durant una resposta immunitària innata les cèl·lules reconeixen i responen a patògens d'una manera genèrica.

Substàncies carcinogèniques: substància que pot causa una alteració en el material genètic de les cèl·lules.

T

Telòmers: extrems dels cromosomes.

Tilacoides: vesícula que forma part de l'estructura de la membrana interna del cloroplast.

Transactivació: increment en la taxa d'expressió gènica deguda a determinats processos biològics o bé d'una manera artificial.

Sumari d'annexos

I. Tipus de càncer 3

Tipus cel·lular 3

Tipus de teixit 4

Tumors benignes o malignes 4

II. Etapes del càncer 5

Segons la gravetat i propagació 5

Etapa 0 6

Etapa I 6

Etapa II 6

Etapa III 7

Factors en l'evolució del càncer 7

Hiperplàsia 7

Displàsia 8

Neoplàsia 8

Neoplàsia benigne 8

Neoplàsia maligna o càncer 9

III. Agents cancerígens 10

IV. Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum–associated degradation inhibitor SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming ... ¡Error! Marcador no definido.

I. Tipus de càncer

Trobem més de de 100 tipus de càncer, en general reben el nom de l'òrgan o teixit on es formen. Però també es poden descriure segons el tipus de cèl·lula afectada. Així doncs, aquesta malaltia es pot classificar basant-se en les funcions i ubicacions de les cèl·lules en que s'origina.

Tipus cel·lular

Segons el tipus de cèl·lula on s'origina la malaltia es pot anomenar de les següents maneres:

- CARCINOMA: es tracta d'un tumor originat en les cèl·lules epitelials, les encarregades de revestir la superfície de la nostra pell i òrgans. També són presents en les vies respiratòries i l'aparell digestiu. És el tipus de càncer més comú, representa un 80-90% dels casos.

- SARCOMA: és un tumor que es produeix al múscul, l'os, el cartílag, al teixit adipós, al teixit conjuntiu, als vasos sanguinis, als vasos limfàtics, en tendons i lligaments. L'osteosarcoma és el càncer d'ossos més comú.

- LEUCEMIA: càncer que té lloc als glòbuls blancs de la sang o als seus precursors, aquests afecten a la medul·la òssia, que és on es formen aquestes cèl·lules. Aquest tipus no forma tumors sòlids, sinó que, un gran nombre de glòbuls blancs alterats, cèl·lules leucèmiques, s'acumulen a la sang i a la medul·la òssia, desplaçant així els glòbuls sans de la sang. Degut a la baixa concentració d'aquestes cèl·lules no afectades, el cos pateix dificultats per a transportar l'oxigen als teixits, per al control de les hemorràgies i per a combatre les infeccions.

- LINFOMA: aquest tipus afecta a les cèl·lules originades a la medul·la espinal, els limfòcits, aquelles que forment part del sistema immunitari, per tant, afecten al sistema limfàtic. Altera els ganglis o vasos limfàtics en llocs específics com l'estómac, el cervell o els intestins, entre d'altres.

- MIELOMA: es tracta d'un tumor que involucra a cèl·lules plasmàtiques, responsables de la producció d'anticossos en resposta a infeccions. Té lloc a les cèl·lules del plasma de la medul·la. Tot i que, les cèl·lules de mieloma s'acumulen a la medul·la òssia, formen tumors als ossos de tot el cos.

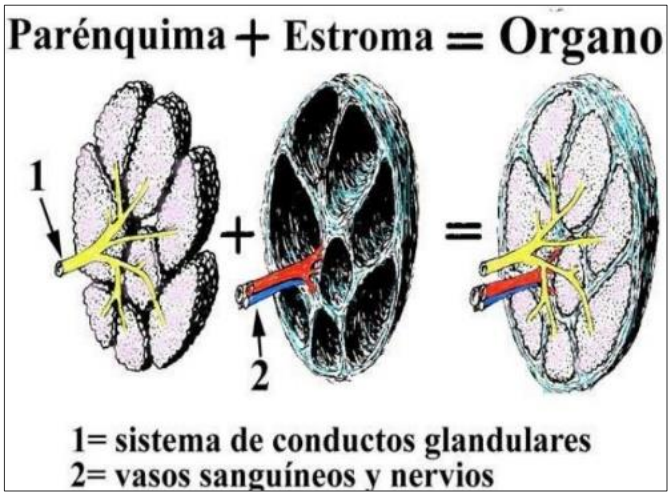
Tipus de teixit

D'altre banda podem classificar els càncers i anomenar-los segons l'òrgan o teixit que es veu afecta

- Càncer de cervell
- Càncer de mama
- Càncer de cervical
- Càncer colorectal
- Càncer renal
- Càncer de fetge
- Càncer de pulmó
- Càncer d'ovaris
- Càncer pancreàtic
- Càncer de pròstata
- Càncer de pell
- Càncer d'estómac
- Càncer de tiroides

Tumors benignes o malignes

Quan les cèl·lules es reprodueixen sense interrupció poden agrupar-se formant masses anomenades tumors. La majoria de càncers produeixen tumors, no obstant, alguns com la leucèmia no ho fan. Tots, benignes i malignes, tenen dos components bàsics en la seva estructura, d'una banda, les cèl·lules proliferatives que formen el tumor, el parènquima, i, d'altra, el seu estroma de sosteniment, constituït pel teixit connectiu i vasos sanguinis.

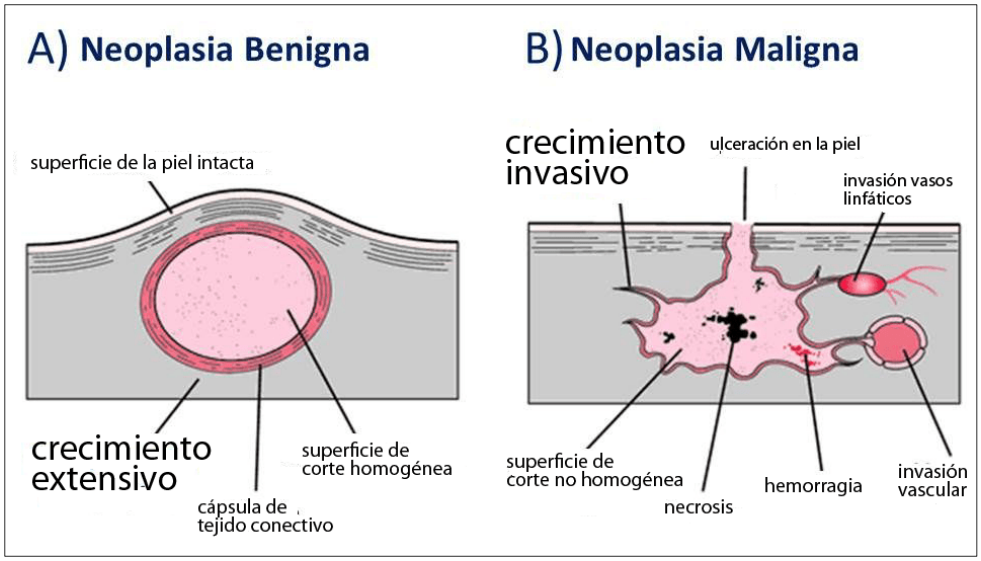


Il·lustració 1: Esquema del parènquima i l'estroma. El parènquima (dreta), constituït per les cèl·lules que formen el tumor i el sistema de conductes glandulars. L'estroma (centre), format pel teixit connectiu i els vasos sanguinis. La unió del parènquima i l'estroma es troba formant els òrgans.

Quan aquests són cancerígens són malignes i, per tant, s'estenen a teixits propers. En el seu creixement les cèl·lules alterades poden desprendre's i

traslladar-se, mitjançant el sistema sanguini o limfàtic, a altres teixits formant altres tumors llunyans a l'original.

En canvi, al contrari que els tumors malignes, els que són benignes no s'estenen ni envaeixen teixits propers. No obstant, poden arribar a tenir una mida considerable i, per aquest motiu, s'han d'extirpar. A diferència dels malignes, no acostumen a créixer de nou.



Il·lustració 2: Esquema diferencial d'un tumor benigne (esquerre), que manté la pell intacta, té una superfície homogènia, consta d'una càpsula de teixit connectiu i es caracteritza per mantenir un creixement extensiu, i d'un maligne (dreta), que provoca ulceració a la pell, invasions vasculars i als vasos limfàtics, que conté necrosis, una superfície no homogènia i es caracteritza per tenir un creixement invasiu.

II. Etapes del càncer

Segons la gravetat i propagació

La malaltia del càncer passa per diferents etapes segons de quin tipus de càncer es tracti. No obstant, es pot generalitzar amb un seguit d'etapes o fases que permeten classificar la malaltia segons la gravetat i com sigui la propagació d'aquesta, des del seu punt d'origen fins a la resta del cos.

La duració d'aquest procés en adults, malgrat que depèn del tipus de càncer, sol oscil·lar entre mesos i dècades. Aquest, es produeix amb més velocitat en els infants, atès que pot arribar a durar uns pocs mesos. Això és deu a la immaduresa de les cèl·lules, que permet que es divideixin més ràpidament que les cèl·lules d'un càncer adult, generant així que el desenvolupament de la malaltia es produeixi en menor temps.

Les diferents etapes es diferencien amb números, aquells més baixos impliquen que el càncer no s'ha propagat massa, i aquells més elevats

impliquen que la malaltia s'ha propagat a diverses parts del cos i, per tant, és més greu i més difícil de tractar. La majoria segueixen les següents etapes: etapa 0, etapa I, etapa II, etapa III i etapa IV.

Etapa 0

En aquesta etapa les cèl·lules pateixen diferents modificacions que els hi aporten capacitats per a la multiplicació desordenada i per a la invasió. No es pot diagnosticar ni genera simptomatologia. És l'etapa més llarga de la malaltia, pot arribar a durar fins a 30 anys, i també se l'anomena fase d'inducció.

Etapa I

En la primera etapa, que en adults acostuma a durar entre 5 i 10 anys, el càncer es troba en el lloc on s'ha originat i no s'ha propagat a teixits, ganglis limfàtics ni òrgans propers, per aquest motiu també s'anomena a aquesta etapa "in situ". Mitjançant una intervenció quirúrgica es pot extirpar completament el tumor, amb altes probabilitats de que la malaltia sigui curable.

Tampoc presenta símptomes o molèsties en el pacient, però en alguns tipus de càncer es pot arribar a diagnosticar mitjançant tècniques de detecció precoç. Alguns exemples són el càncer de mama, de coll uterí i de colon.

Etapa II

En la segona etapa o fase d'invasió local, la lesió comença a estendre's fora del seu lloc d'origen, envaint així teixits i òrgans adjacents. En aquesta etapa l'aparició dels símptomes dependrà del tipus de càncer, del seu creixement i de la seva localització.

En l'edat adulta pot arribar a durar entre 1 i 5 anys.

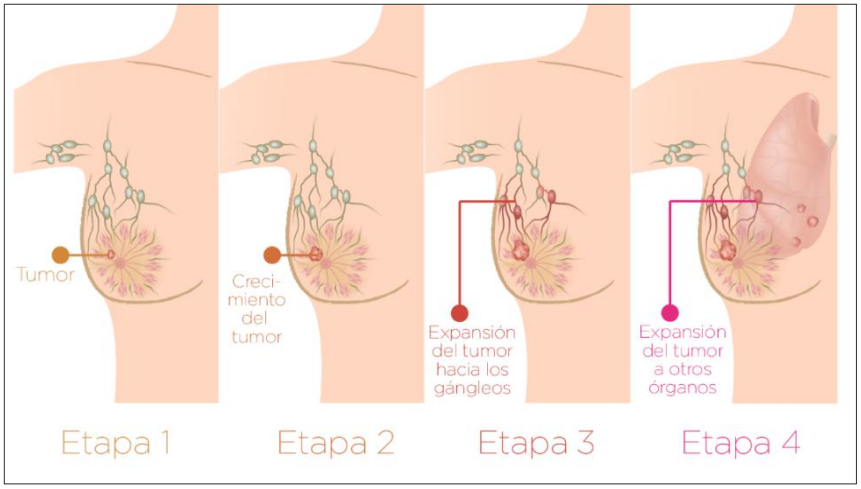
La malaltia es caracteritza com a avançada i es presenten diferents símptomes, que són complexes i depenen del tipus de tumor, la localització i el grau d'extensió de la metàstasi.

Etapa III

Per últim, la tercera etapa és en la que la malaltia ha adquirit un estat molt avançat i resulta progressiva i irreversible, és per això que s'anomena càncer terminal.

Es produeix quan el cos del malalt no respon als tractament i pateix múltiples símptomes que disminueixen la seva qualitat de vida i generen un gran malestar.

L'àrea de la medicina que s'encarrega d'atendre als pacients en aquesta fase de la malaltia és la medicina pal·liativa.



Il·lustració 3: Esquema de les etapes del càncer de mama. En la primera i segona es produeix l'aparició del tumor i el seu creixement, en la tercera aquest es comença a expandir cap als ganglis i en la quarta s'expandeix a altres òrgans.

Factors en l'evolució del càncer

L'evolució de cada càncer conté múltiples factors que interactuen entre sí, aquests varien segons el tumor i el pacient. No obstant, se'n descriuen alguns de forma general.

Els tumors sòlids pateixen una sèrie de processos segons avança i evoluciona la malaltia passant per les diferents etapes. Els tumors de cèl·lules sanguínies passen a través d'un procés similar, però aquestes no estan limitades a una única ubicació en el cos.

Hiperplàsia

La hiperplàsia és l'augment de la mida d'un òrgan o teixit, degut a l'augment del nombre de les cèl·lules que formen la regió del teixit. S'inicia amb la divisió descontrolada d'una cèl·lula alterada que acaba generant un excés de cèl·lules.

Aquestes, tenen una aparença de cèl·lules sanes però n'hi ha masses, és a dir, no són cèl·lules canceroses però poden arribar a ser-ho.

Displàsia

La displàsia engloba el conjunt de canvis genètics addicionals irreversibles que es produeixen en les cèl·lules hiperplàsies[77], durant la seva maduració, que provoquen l'incapacitat de mantenir l'equilibri i controlar la divisió de les cèl·lules per part dels mecanismes reguladors. Així doncs, causen una alteració de la morfologia i de la seva funció cel·lular, portant a un creixement continu i anormal, que deriva en un cúmul de cèl·lules desorganitzades, que normalment forma un bony o tumor.

Pot arribar a desaparèixer espontàniament, però es sol extirpar mitjançant cirurgia, mètodes químics o làser.

Les cèl·lules adquireixen un aspecte anormal, no són canceroses. No obstant, la displàsia també pot acabar provocant una neoplàsia, atès que les cèl·lules pateixen alteracions atípiques que afecten a la seva mida, forma i organització. Això pot indicar que es troben en una fase d'evolució cap a la transformació en una neoplàsia, per aquest motiu es pot classificar la displàsia com a canvi preneoplàstic.

Neoplàsia

Consisteix en la formació d'una massa anormal de teixit, també anomenada tumor, que pot resultar benigna, quan s'estén localment, o maligna, quan tenen un comportament agressiu i comprimeixen teixits propers.

Neoplàsia benigne

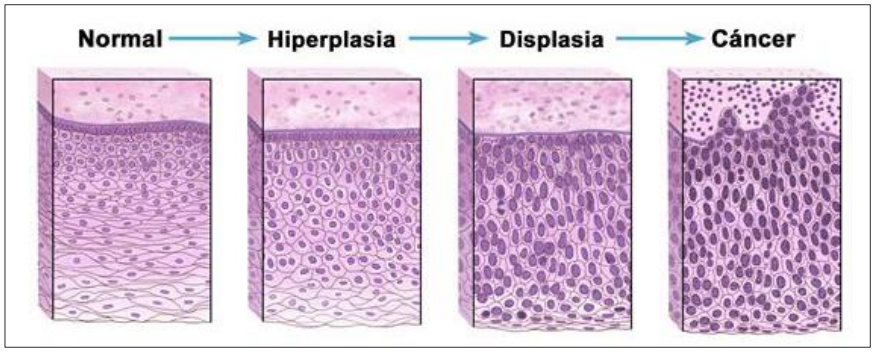
En la neoplàsia benigne les cèl·lules es contenen en la localització inicial i no envaeixen altres teixits. És fàcilment curable amb una cirurgia, atès que totes les cèl·lules anormals es troben en una mateixa ubicació. Són menys letals que els tumors malignes, però poden arribar a causar greus problemes en la salut, atès que si arriben a mides considerables, poden pressionar òrgans. No obstant, alguns es consideren potencialment aptes per a ser invasius i es tracten com a neoplasmes malignes.

[77] **Cèl·lules hiperplàsies:** cèl·lules que mostren aparença de ser sanes al microscopi, però que poden convertir-se en cancerígenes.

Neoplàsia maligna o càncer

Els neoplasmes malignes tenen l'habilitat d'envair teixits fora del teixit local, és per això, que resulten més perillosos. Les cèl·lules presenten variacions en la seva forma, mida i les seves funcions, és per això, que deixen de realitzar les seves funcions per a adquirir noves propietats que configuren el caràcter maligne, passen a ser cèl·lules poc diferenciades. La malignitat del tumor és determina per l'agressivitat de les cèl·lules que el formen, que li permeten una major o menor capacitat d'invasió.

El càncer utilitza diferents vies per a estendre's per l'organisme, com la propagació local en que s'infiltra en teixit veïns i, per altra banda, la propagació a distància, que es produeix quan un grup de cèl·lules malignes es desprèn del tumor original per a traslladar-se, produint així la metàstasi. Majoritàriament, es propaguen pels vasos sanguinis i limfàtics. Es considera que com més gran i menys diferenciat és un tumor, més probabilitats té de produir metàstasi.



Il·lustració 4: Esquema d'un teixit que pateix els diferents estats que generen una neoplàsia maligna o càncer. D'un teixit normal es passa a una hiperplàsia, caracteritzada per un augment del nombre de cèl·lules aparentment sanes. A continuació, en la displàsia, es produeixen canvis genètics en les cèl·lules que eviten la regulació de la divisió cel·lular, generant així un creixement continu i anormal que derivarà en la formació d'un tumor, que pot ser benigne o maligne. En el cas del càncer, el tumor resulta maligne que té un comportament agressiu i comprimeix teixits propers.

III. Agents cancerígens

Coneixent que la malaltia és fruit d'una alteració, es poden distingir diferents factors que generen aquesta alteració, malgrat que encara és motiu d'investigació l'origen exacte que genera i produeix el desenvolupament del càncer. S'atribueix a mutacions espontànies dels gens, a la predisposició genètica hereditària o per l'acció de factors que encara no han estat identificats com a responsables de produir càncer.

Un 40% dels casos, aproximadament, es formen degut a l'acció dels anomenats agents externs, són aquells que actuen sobre l'organisme causant alteracions als gens de les cèl·lules. És per això, que amb millores dels hàbits, com evitar el consum de tabac, begudes alcohòliques i realitzant una dieta equilibrada acompanyada d'exercici, es poden controlar en certa mesura. Però, per una banda, també trobem altres agents externs que es presenten com a factors de risc que no es poden regular amb tanta facilitat, com:

- Factors químics: l'amiant, l'arsènic, el benzè, el cadmi, el mercuri, el níquel, el plom, els hidrocarburs clorats, la naftilamina, la nicotina i el quitrà.
- Factors físics: radiacions ionitzants com els rajos X, radiació gamma, alfa i beta, radiacions no ionitzants com els camps electromagnètics, les radiacions ultraviolades, les infraroges, les radiacions que emet la pròpia escorça terrestre i els residus nuclears.

La capacitat de produir càncer d'aquests factors depèn de la quantitat de dosi rebuda i el temps d'exposició a la substància o radiació.

Per altra banda, trobem:

- Factor biològics: infeccions persistents provocades per virus, com el virus del papil·loma humà responsable del càncer de coll uterí, el virus de l'hepatitis B, que provoca càncer de fetge, o l'*helicobacter pylori* que genera càncer d'estómac.