

# IMMUNOTERÀPIA EN CÀNCER DE PULMÓ



Niwy

## RESUMEN

El càncer de pulmón es el segundo cáncer en número de muertes en España. Las terapias más comúnmente usadas para tratarlo son la quimioterapia, la radioterapia y las intervenciones quirúrgicas. En los últimos años la inmunoterapia se ha ido desarrollando a pasos de gigante, sobre todo gracias al descubrimiento de los receptores PD-1, PD-L1 y CTLA-4, llamados inhibidores de puntos de control. Estos receptores son utilizados por las células cancerígenas para deshabilitar a las células del sistema inmunitario y evitar que las destruyan. Al conocerlas, se han podido desarrollar inmunoterapias que bloquean estos receptores y permiten que las células inmunitarias detecten y destruyan el cáncer.

Estos descubrimientos han hecho que la inmunoterapia se haya posicionado como una de las terapias principales aplicadas para tratar distintos cánceres, entre ellos el cáncer de pulmón y el cáncer de piel. Estas terapias se administran mediante medicamentos, que son más efectivos y provocan menos efectos secundarios en los pacientes que otras terapias. De estos medicamentos, los usados para tratar el cáncer de pulmón son el Nivolumab, el Pembrolizumab y el Atezolizumab.

En este trabajo se exponen los distintos parámetros implicados en la inmunoterapia, así como la clasificación de esta; el cáncer de pulmón y la aplicación de la inmunoterapia en este cáncer. La búsqueda bibliográfica está complementada con prácticas en un laboratorio de investigación y una entrevista al Premio Nobel de medicina del 2018, el Dr. James Allison.

## ABSTRACT

Lung cancer is the second cancer in number of deaths in Spain. The most used therapies for treating it are chemotherapy, radiotherapy, and surgical interventions. In the last few years, immunotherapy has been developing quickly, especially thanks to the discovery of the PD-1, PD-L1 and CTLA-4 receptors, called checkpoint inhibitors. These receptors are used by cancer cells to disable immune cells and to avoid being destroyed. Knowing this has allowed the development of new immunotherapies that block those receptors and allow the immune cells to detect and to destroy cancer.

These discoveries have made immunotherapy become one of the most used therapies for treating different cancers, such as lung and skin cancer. These therapies are administered using drugs, which are more effective and cause less side effects than other therapies. Among these drugs, the ones used for lung cancer treatment are Nivolumab, Pembrolizumab and Atezolizumab.

This project shows the different factors implied in immunotherapy as well as its different types, lung cancer, and the application of immunotherapy in this cancer. The bibliographic research is complemented with procedures in a research laboratory and an interview with 2018 medicine Nobel Prize winner, Dr. James Allison.

## Agraïments

A la meva tutora del treball de recerca, per creure en mi i ajudar-me en cada pas del camí.

A la doctora x i al Programa Argó, per les oportunitats úniques que m'han donat.

Al doctor James P. Allison, per proporcionar-me una visió ampla i experimentada del camp de la immunoteràpia.

A la meva família i amics, per donar-me suport en tot moment i no deixar que em desanimés.

Moltes gràcies.

## ÍNDEX

Introducció.....	1
1. La immunitat .....	3
2. El procés immunitari .....	4
2.1. Mecanismes defensius no específics.....	4
2.1.1. Barreres defensives primàries o externes .....	5
2.1.2. Barreres defensives secundàries o internes.....	6
2.2. El sistema immunitari.....	7
2.2.1. Sistema limfàtic.....	8
2.2.2. Cèl·lules immunitàries.....	8
2.3. Tolerància immunitària.....	10
3. Immunoteràpia.....	12
3.1. Usos .....	13
3.2. Beneficis .....	14
3.3. Riscos i efectes secundaris.....	14
4. Tipus d'immunoteràpia .....	15
4.1. Teràpia amb anticossos monoclonals .....	15
4.2. Inhibidors de punt de control.....	15
4.3. Teràpia amb cèl·lules CAR-T.....	16
4.4. Teràpia vírica.....	16
4.5. Vacunes.....	17
5. Càncer de pulmó .....	18
5.1. Causes .....	18
5.2. Síntomes .....	19
5.3. Tipus.....	19
5.4. Eines de diagnòstic.....	20
5.5. Tractaments.....	21

6. Immunoteràpia en càncer de pulmó .....	24
6.1. Funcionament .....	24
6.2. Mètode d'aplicació .....	25
6.3. Efectes secundaris .....	25
6.4. Eficàcia .....	26
7. Pràctiques al laboratori .....	27
7.1. Extracció i cultiu de cèl·lules .....	28
7.2. Expressió del marcador a les 24/72/96 hores .....	31
7.3. Resultats .....	34
8. Entrevista al Dr. James P. Allison .....	35
Conclusions .....	37
Llistat de referències .....	39
Bibliografia .....	39
Webgrafia .....	39
Annexos .....	43
A. Procediment de rentats .....	43
B. Entrevista original al Dr. James P. Allison .....	44
C. Glossari .....	45
D. Recull de fotos pràctiques .....	47

## Introducció

La meva passió per la investigació i els tractaments mèdics m'ha acompanyat durant tota la vida. Sempre m'ha interessat la feina que es fa al laboratori així com el camí que recorre un descobriment fins arribar als pacients. Però sobretot, el que m'ha atrapat i encisat més són els avenços per a fer tractaments menys invasius i concrets.

Quan va arribar el moment d'escollir el tema del treball de recerca, tenia clar que volia fer-lo d'algun tema actual i amb una utilitat real. Com que no tenia una idea definida sobre què el volia fer, vaig consultar la llista de proposicions de temes del Programa Argó de la Universitat Autònoma de Barcelona. Me'ls vaig llegir pràcticament tots, però només un dels temes em va quedar gravat. Guiat des de la universitat per la doctora x, el tema d'immunoteràpia em va captivar completament. Com deia abans, sempre he tingut interès per les teràpies molt específiques i poc invasives, com la immunoteràpia. La immunoteràpia és una teràpia poc coneguda per la població en general però que poc a poc ha anat guanyant importància i a mesura que les investigacions i assajos clínics han començat a donar fruit s'ha anat guanyant el seu lloc en el món de la recerca biomèdica.

Vaig tenir la sort d'ésser seleccionada pel Programa Argó, cosa que em va facilitar tant la recerca bibliogràfica — vaig tenir accés a les biblioteques i serveis de la UAB, que em va permetre accedir a articles i estudis mèdics als quals no hauria pogut tenir accés per cap altra via — com la part pràctica.

Així doncs, només em faltava acotar el tema. Al principi, volia dedicar el treball exclusivament als processos immunoterapèutics que es duen a terme abans de realitzar transplants, però no tenia clar cap a on desembocaria el treball, així que vaig decidir decantar-me per la immunoteràpia aplicada a càncers. Escollir sobre quin càncer ho volia fer va ser fàcil, emocionalment estava lligada al càncer de pulmó, que havia causat la mort del meu avi l'any abans que jo nasqués.

A partir d'aquí em vaig marcar els meus objectius:

- Entendre el funcionament de la immunoteràpia.
- Conèixer les causes i els tipus de càncer de pulmó.
- Ser capaç d'explicar com s'aplica la immunoteràpia en un càncer de pulmó.

Aquests tres objectius m'han ajudat a encarrilar la recerca bibliogràfica del meu treball, així com a marcar-ne l'estructura. Per començar, havia de conèixer com funcionen tant el procés immunitari com totes les cèl·lules i molècules que hi ha implicades. Un cop ja tenia la base clara, vaig poder començar a concretar el funcionament de la immunoteràpia i com actua en el càncer de pulmó, per acabar culminant-ho tot en el punt 6, que dona títol a aquest treball.

Per complementar el treball vaig tenir l'oportunitat de visitar els laboratoris d'immunologia de l'hospital Germans Tries i Pujol, on es van dur a terme les pràctiques que explico en detall a l'apartat 7.

D'altra banda, el guanyador del Premi Nobel de medicina de l'any 2018 pel descobriment dels receptors CTLA-4 (receptors claus en la immunoteràpia), el dr. James P. Allison va tenir l'amabilitat de concedir-me una entrevista via correu electrònic, amb la qual tanco aquest treball.

Abans d'entrar en el treball en si m'agradaria comentar que totes aquelles paraules que estan en cursiva al text es troben definides al glossari (Annex C).

## 1. La immunitat

Segons el Diccionari de l'Institut d'Estudis Catalans (DIEC2), la immunitat és l' "Estat del cos de poder resistir el desenvolupament d'una malaltia determinada"; en altres paraules, el nostre cos és capaç d'evitar que desenvolupem una patologia determinada. Hi ha dos factors que poden impedir que desenvolupem una malaltia: la resistència innata i la immunitat adquirida. La resistència innata és inespecífica (és la mateixa per a tots els antígens) i no té *memòria immunològica*. Respon ràpidament i crea inflamació, cosa que fa iniciar la resposta de la immunitat adquirida. Hi actuen els mecanismes defensius no específics.

En canvi, la immunitat adquirida és específica i té *memòria immunològica*, és a dir, reconeix els antígens amb què ja ha tingut contacte i els combat amb els anticossos corresponents. Quan ens posem en contacte amb un antigen nou, no tenim immunitat adquirida i la resposta immunològica és més difícil de configurar perquè no tenim anticossos específics per a aquell patogen. Per això desenvolupem patologies que no hem tingut abans (o que han patit alguna modificació) amb més freqüència que no pas les que ja hem tingut i superat amb èxit.

Dins de la immunitat adquirida trobem dues branques diferents, l'activa i la passiva. La diferència principal és on es generen els anticossos. Si es generen dins del propi organisme i per tant esdevenen part de la *memòria immunològica*, parlem d'immunitat activa. En canvi, si es generen fora de l'individu i són introduïts posteriorment a l'organisme (esdevenint per tant d'efecte temporal i sense passar a formar part de la *memòria immunològica*), estem parlant d'immunitat passiva.

En els dos casos pot ser una immunitat natural o artificial, depenent de com s'ha adquirit. En el cas de la immunitat activa, és natural quan s'aconsegueix després de superar una infecció i artificial quan és mitjançant la vacunació (s'introdueixen antígens lleugerament modificats o desactivats per provocar una resposta i la creació d'anticossos sense tenir el risc de contraure la malaltia). La



passiva s'aconsegueix naturalment a través de la placenta i artificialment per introducció de sèrums amb anticossos (*seroteràpia*).

Immunitat adquirida	Activa	Passiva
Natural	En superar la patologia	Per la placenta
Artificial	Per inoculació d'antígens (vacunació)	Mitjançant sèrums amb anticossos ( <i>seroteràpia</i> )

Figura 1: Taula de divisions de la immunitat adquirida. Elaboració pròpia.

## 2. El procés immunitari

El procés immunitari és el conjunt d'accions que duu a terme el nostre cos per tal de combatre els agents patògens, indiferentment de si provenen de l'exterior (virus, bacteris) o de l'interior del nostre organisme (cèl·lules cancerígenes). Les partícules o microorganismes que provoquen una resposta immunitària s'anomenen antígens.

Aquest procés involucra diversos sistemes, òrgans, teixits i cèl·lules de l'organisme humà, alguns dels quals ofereixen defenses específiques (mecanismes defensius específics) i d'altres que no (mecanismes defensius no específics).

### 2.1. Mecanismes defensius no específics

Els mecanismes defensius no específics representen la primera defensa del nostre cos envers els antígens. Es troben tant a l'exterior com a l'interior del nostre cos i responen de la mateixa manera a tots els antígens, és a dir, no tenen una resposta personalitzada. Es divideixen en dos grans grups: les barreres defensives primàries i les secundàries.

### 2.1.1. Barreres defensives primàries o externes

Les barreres defensives primàries o externes del nostre cos configuren la nostra protecció superficial, encarregada de no deixar entrar els agents patògens al nostre cos. Estan formades per la pell, les mucoses i la microbiota intestinal. Aquestes barreres impedeixen l'entrada d'agents externs al nostre cos, evitant així infeccions i patologies.

La defensa més extensa del nostre cos és la pell. És gairebé impossible de travessar per als microorganismes, tant pel seu gruix com pels diferents processos que s'hi duen a terme. El primer procés, la *queratinització* i *descamació* de les capes més superficials de la pell, impedeix que s'hi formin colònies de microorganismes degut al canvi constant de la pell. El segon procés, la secreció de suor, dona lloc a un pH lleugerament massa àcid per a la supervivència dels microbis. Tot i això, la pell es pot penetrar fàcilment quan hi ha ferides o altres lesions.

Les secrecions mucoses són les encarregades de fer de barrera a les obertures naturals que presenta el nostre cos (boca, fosses nassals, vies respiratòries, anus, etc.). Les secrecions recobreixen l'interior de les obertures per tal de protegir el forat i evitar l'entrada dels antígens. Depenent de la zona on es troben, aquestes mucoses tenen composicions i maneres d'actuar diferents. Per exemple, les secrecions mucoses de la zona nasal, bucal (saliva) i dels ulls (llàgrimes) contenen l'enzim *lisozim*, capaç de trencar la paret bacteriana. En canvi, l'epiteli vaginal i els conductes de l'aparell digestiu contenen secrecions àcides que creen un ambient on és pràcticament impossible que hi hagi vida.

Finalment tenim la microbiota intestinal, que a part de fer la digestió, impedeix que els microorganismes patògens proliferin competint pels nutrients que arriben a l'estómac i alliberant substàncies inhibidores.

Sense aquesta primera línia de protecció, les cèl·lules del sistema immunitari serien incapaces de combatre tots els antígens als quals el nostre organisme s'exposa cada dia. Per tant, són un element clau en la protecció del cos.

## 2.1.2. Barreres defensives secundàries o internes

Les barreres defensives secundàries o internes es posen en marxa quan els antígens aconseguen superar les barreres externes i entrar a l'interior del nostre organisme. Aquestes barreres són, igual que les primàries, inespecífiques. Entre les cèl·lules que en formen part trobem leucòcits de tipus fagocitari (monòcits i neutròfils) i les cèl·lules assassines naturals (cèl·lules natural killers).

El monòcits i els neutròfils duen a terme el procés de fagocitosi. Aquest procés consisteix en englobar els microorganismes en vacúols fagocítics i destruir-los mitjançant enzims hidrolítics continguts dins dels lisosomes. Per facilitar aquest procés, es duu a terme la *resposta inflamatòria* que té com a finalitat aïllar i destruir els agents patògens, i que està regulada pels basòfils i els mastòcits.

### Monòcits

Els monòcits constitueixen menys del 10% del total de leucòcits del nostre organisme. Viuen d'un a tres dies a la sang; després es desplacen cap a teixits o òrgans i es converteixen en macròfags, unes cèl·lules més grans i amb més capacitat fagocítica. A més a més, també formen part de la *resposta inflamatòria*.

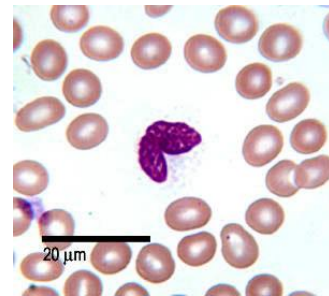


Figura 2: Monòcit fotografiat a través d'un microscopi. Font: [https://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood\\_wbc.php](https://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood_wbc.php) [Data de consulta: 2/10/21]

### Neutròfils

Els neutròfils constitueixen més del 60% del total de leucòcits del nostre organisme. N'hi ha una gran quantitat en circulació per la sang i viuen de 6 a 10 hores. A la medul·la òssia se'n produeixen aproximadament 100 000 milions al dia. La funció principal dels neutròfils és combatre bacteris i fongs, i s'autodestruïen després d'actuar.

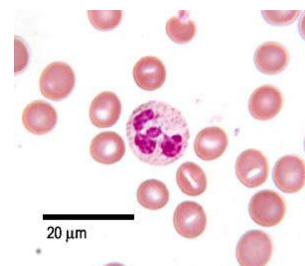


Figura 3: Neutròfil fotografiat a través d'un microscopi. Font: [https://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood\\_wbc.php](https://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood_wbc.php) [Data de consulta: 2/10/21]

## Cèl·lules Natural Killers

Les cèl·lules assassines naturals o natural killers (cèl·lules NK) alliberen una sèrie de substàncies que provoquen la *lisi cel·lular*. Actuen contra infeccions produïdes per virus i contra les cèl·lules tumorals.

## Basòfils

Els basòfils tenen receptors d'IgE i, juntament amb els mastòcits, són responsables de produir la *resposta inflamatòria*. També provoquen les reaccions d'hipersensibilitat immediata.

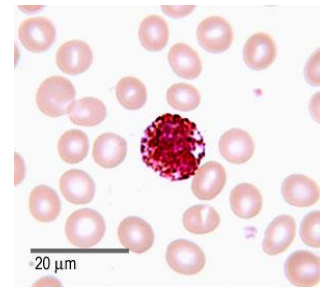


Figura 4: Basòfil fotografiat a través d'un microscopi. Font: [https://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood\\_wbc.php](https://www.histology.leeds.ac.uk/blood/blood_wbc.php)  
[Data de consulta: 2/10/21]

## Sistema del complement

El sistema del complement està format per 20 proteïnes (globulines) i es troba al plasma sanguini. La seva funció consisteix en alliberar histamina durant la resposta inflamatòria. La histamina augmenta la permeabilitat dels vasos sanguinis i facilita que hi arribin més immunoglobulines.

## 2.2. El sistema immunitari

El sistema immunitari és el conjunt de cèl·lules i molècules encarregades de la immunització. És l'última defensa del nostre cos envers l'atac de patògens. Actua de manera diferent amb cada patògen, i per això es classifica com a una defensa específica. Una altra característica important del sistema immunitari és que té *memòria immunològica*, cosa que li permet reconèixer els antígens amb els quals ja ha estat en contacte i per tant, crear una resposta immunitària més ràpida i precisa.

### 2.2.1. Sistema limfàtic

El sistema limfàtic té una estructura que es podria considerar similar al sistema circulatori. Està format pels vasos limfàtics, per on circula la *limfa*.

En diferents punts del cos hi ha nòduls limfàtics, també anomenats ganglis. Els principals es troben al coll, les aixelles, l'abdomen i l'engonal. També formen part del sistema limfàtic les *amígdals* i el *tim*.

Els ganglis produeixen cèl·lules immunitàries i filtren la *limfa* per eliminar els agents patògens o cèl·lules cancerígenes que hi podria haver. Quan en detecten, produeixen més glòbuls blancs i s'inflen. Aquest augment del volum pot arribar a ser perceptible des de l'exterior del cos.

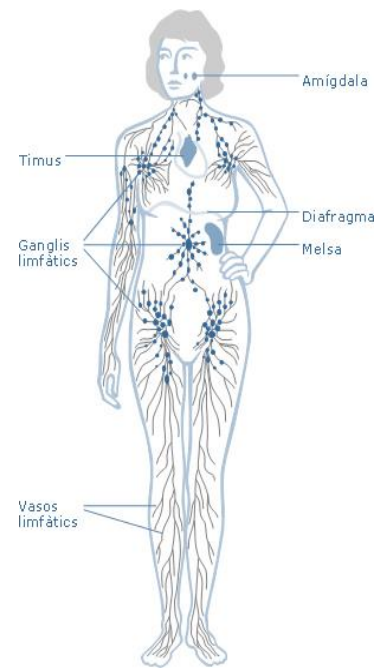


Figura 5: El sistema limfàtic i les seves parts. Font: <https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/cancer/tipus-de-cancer/limfoma-no-hodgkin-lnh/el-sistema-limfatic-i-lnh> [Data de consulta: 3/10/21]

### 2.2.2. Cèl·lules immunitàries

Un cop s'han detectat els antígens, la resposta immunitària específica (duta a terme per les cèl·lules de resposta lenta) es desenvolupa en tres fases. Primer, s'identifica l'antigen. Després, s'activen les cèl·lules o molècules que es necessiten per eliminar-lo i finalment s'executa la resposta immunitària.

## LIMFÒCITS

Els limfòcits es troben a la sang i a la *limfa*, i es caracteritzen per tenir un nucli gran i poc citoplasma. Es divideixen en limfòcits o cèl·lules B i limfòcits o cèl·lules T.

Els limfòcits B s'originen a la medul·la òssia i són responsables de la resposta humoral. Un cop madures, les cèl·lules B circulen per tot el cos a través del sistema limfàtic. La resposta humoral consisteix en la secreció d'anticossos que s'uneixen a la superfície dels antígens. Això va acompanyat d'una sèrie de

processos, entre els quals hi ha la formació i mutació de l'isotip i la neutralització de toxines i patògens.

Els limfòcits T maduren en el *tim* i són responsables de la resposta cel·lular. No produeixen anticossos, tot i que alguns dels receptors de la seva membrana són anticossos. Hi ha diversos tipus de limfòcits T amb diferents funcions. Els del primer tipus s'anomenen citotòxics, i s'ocupen de destruir cèl·lules infectades per virus o bacteris mitjançant l'alliberació de citotoxines. En canvi, els limfòcits col·laboradors activen els limfòcits B i la proliferació dels limfòcits T citotòxics. Els limfòcits T reguladors s'ocupen d'aturar la immunitat al final d'una reacció immunològica i els de memòria es generen després de l'activació dels primers limfòcits T per emmagatzemar-se contra possibles atacs del mateix microorganisme.

## ANTICOSSOS

Els anticossos o immunoglobulines són produïts pels limfòcits B, concretament pels limfòcits plasmàtics anomenats leucòcits. Poden enganxar-se a la superfície d'un limfòcit i fer de receptor o alliberar-se i circular lliurement per la sang. Es divideixen en cinc classes principals: IgA, IgD, IgM, IgE i IgG. Cada una d'aquestes classes té unes funcions diferents.

La seva estructura bàsica està formada per dues cadenes lleugeres (L) i dues cadenes pesants (H). A part, tenen una regió variable de cadenes pesants i una zona central amb aminoàcids anomenada "zona frontissa". La molècula es configura tridimensionalment en una forma semblant a la lletra Y. Els diferents tipus d'anticossos es diferencien entre ells pel tipus de cadenes pesants que presenten.

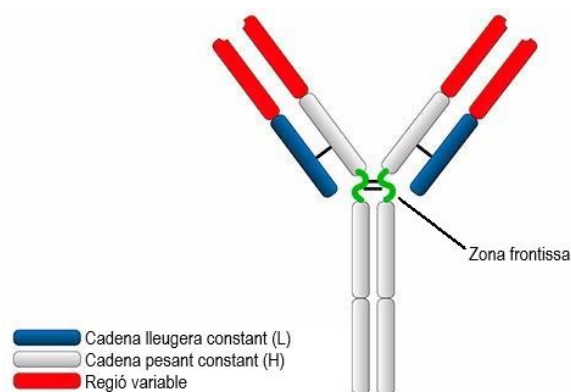


Figura 6: Estructura bàsica dels leucòcits. Editada amb Paint 3D a partir d'una imatge base. Font: [https://www.3tres3.com/articulos/inmunitad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura\\_38562/](https://www.3tres3.com/articulos/inmunitad-humoral-especifica-1-2-ig-tipos-y-estructura_38562/) [Data de consulta: 13/09/21]

- **IgA:** Les IgA representen el 10% de les immunoglobulines circulants. Poden unir-se entre elles formant dímers i trímers, és a dir, conjunts de dues o tres molècules respectivament. Es produeixen en estructures limfoides de sota la pell i es troben a la sang i a les secrecions; són col·laboradores de les barreres primàries.
- **IgD:** Les IgD actuen com a receptors d'antígens específics a la membrana cel·lular dels limfòcits B.
- **IgE:** Les IgE es troben principalment als teixits, la sang en conté una concentració molt baixa. Són les causants de la majoria d'al·lèrgies.
- **IgG:** Les IgG són les immunoglobulines més nombroses, representen el 75% del total. Són capaces d'activar el *sistema del complement* i els fagòcits.
- **IgM:** Les IgM representen el 10% del total d'immunoglobulines i són les encarregades de combatre els virus.

### 2.3. Tolerància immunitària

La tolerància immunitària és la capacitat del sistema immunitari de reconèixer les cèl·lules pròpies del nostre organisme i no generar una resposta immunitària cada cop que detecta una cèl·lula seva. Té *memòria immunològica*, per la qual cosa només cal que identifiqui cada tipus de cèl·lula un cop per determinar si és del propi organisme o no. Quan aquesta tolerància immunitària no funciona correctament o hi ha alguna deficiència en la seva regulació apareixen les *malalties autoimmunitàries*. Aquesta tolerància es pot induir mitjançant reguladors o inhibidors.

Els limfòcits T i B aprenen a identificar les cèl·lules i altres substàncies presents al cos com a propis de l'organisme i desenvolupar-hi tolerància al principi de la seva maduració. Per evitar que es generin limfòcits defectuosos que podrien desembocar en trastorns autoimmunitaris hi ha dos tipus de mecanismes de

control de la tolerància immunitària, que reben el nom de tolerància central i tolerància perifèrica.

La tolerància central s'encarrega d'eliminar els limfòcits T o B que causen reaccions autoimmunitàries quan encara estan en fase de maduració. D'aquesta manera s'assegura que tots els limfòcits que entren en circulació funcionen correctament.

Quan la tolerància central falla, entra en joc la tolerància perifèrica, que s'encarrega de detectar i eliminar els limfòcits T i B defectuosos que hi ha en circulació.

Aquests dos mecanismes de control garanteixen que els limfòcits que circulen pel cos funcionen correctament. Malgrat tot, cap sistema és perfecte i les reaccions autoimmunitàries són presents en la vida de moltes persones.



### 3. Immunoteràpia

La immunoteràpia és un tipus de teràpia biològica relativament recent, el primer experiment en aquest camp data del segle XIX. L'any 1893, el Dr. William Coley va publicar un article on explicava la seva experiència injectant un bacteri anomenat *Streptococcus erysipelatis* en pacients amb càncer. El Dr. Coley va comprovar que hi havia pacients als quals el càncer els desapareixia completament. Durant els seus més de 40 anys de carrera va tractar pràcticament 900 pacients amb aquest mètode, aconseguint un percentatge d'èxit del 10%.

En aquell moment no se sabia ben bé com ni perquè funcionava, i la comunitat mèdica es va decantar per tractaments més segurs i eficaços. Tot i així, es va seguir investigant el sistema immunitari i les possibles aplicacions de la immunoteràpia. Durant la primera meitat del segle XX es van fer avenços en el coneixement del sistema i les cèl·lules immunitàries; però fins la dècada del 1960 pràcticament no es va tornar a parlar d'immunoteràpia. Durant la dècada del 1970, la teoria de la tolerància immunològica de Frank Burnet va ser acceptada i durant la dècada següent la recerca en aquest camp es va centrar en la recerca d'anticossos que poguessin destruir tumors. L'any 1982, el doctor James Allison va descobrir un antigen receptor en les cèl·lules T que semblava facilitar el procés de la immunoteràpia. A partir d'aquell moment la investigació en immunoteràpia no es va tornar a abandonar, i es va arribar al descobriment que va marcar un abans i un després en aquest camp: el descobriment dels inhibidors de punts de control.

### 3.1. Usos

Existeixen diferents tipus d'immunoteràpia, que poden tenir usos molt diversos en funció del seu objectiu.

#### **Immunoteràpia en malalties autoimmunitàries**

La immunoteràpia aplicada a les *malalties autoimmunitàries* reeduca els limfòcits del pacient per aconseguir que tornin al seu estat normal i deixin de considerar cèl·lules sanes de l'organisme com una amenaça. Representa un avantatge envers les teràpies immunodepressores perquè no deixa al pacient desprotegit, sinó que regula el seu sistema immunitari. Algunes de les *malalties autoimmunitàries* que es poden tractar amb immunoteràpia són l'artritis, certs tipus de lupus i l'esclerosi múltiple.

#### **Immunoteràpia en transplantaments**

La immunoteràpia aplicada abans i després dels transplantaments serveix per evitar que el cos rebutgi l'òrgan o el teixit trasplantat. També minimitza les infeccions que es deriven de l'operació. Es poden aplicar immunodepressors o cèl·lules T reguladores que indueixen la tolerància immunològica. La segona opció és més recomanable perquè, com en el cas de les *malalties autoimmunitàries*, s'evita deixar el cos completament desprotegit.

#### **Immunoteràpia en càncer**

La immunoteràpia utilitzada contra el càncer és capaç d'eliminar les cèl·lules cancerígenes i evitar que el càncer es torni a estendre. Els diferents tipus d'immunoteràpia que s'utilitzen per combatre el càncer estan explicades en el punt següent.

#### **Altres immunoteràpies**

Una altra aplicació de la immunoteràpia és per combatre les al·lèrgies o l'asma mitjançant anticossos monoclonals. També s'utilitza un altre tipus d'immunoteràpia que pot servir per combatre qualsevol tipus de patologia. Aquesta teràpia fa servir immunomoduladors que intensifiquen el sistema

immunitari en general per aconseguir que produeixi una resposta immunològica més potent.

### 3.2. Beneficis

El benefici principal de la immunoteràpia és que va dirigida a un grup determinat i delimitat de cèl·lules i no afecta a les cèl·lules sanes del voltants, cosa que redueix dràsticament el nombre d'efectes secundaris. A més a més, quan s'aplica una immunoteràpia, el càncer o la malaltia té menys probabilitats de tornar a estendre's, gràcies a la memòria immunològica; és a dir, és una solució a llarg termini.

Un altre benefici és que pot funcionar en malalties on cap dels altres tractaments ha funcionat o pot fer que els tractaments que s'estan aplicant siguin més efectius. En resum, és una teràpia específica, adaptable i que es conserva en el temps.

### 3.3. Riscos i efectes secundaris

La immunoteràpia, com totes les altres teràpies, comporta alguns riscos. El risc principal és que el cos no reaccioni al tractament, reaccioni només parcialment o fins i tot que tingui una reacció adversa. Un altre possible risc és que el sistema immunitari resulti excessivament estimulat i comenci a atacar cèl·lules sanes.

Els efectes secundaris solen ser lleus i es poden tractar amb facilitat. De fet, s'assemblen bastant als que podria causar una grip o un constipat. Els més comuns són la fatiga, les reaccions a la pell (irritacions, granissa, etc.) o la febre.

## 4. Tipus d'immunoteràpia

Els diferents tipus d'immunoteràpia es divideixen segona a quines cèl·lules van dirigides i l'efecte que hi produeixen. Les immunoteràpies més utilitzades per tractar càncers són les que treballen amb anticossos monoclonals, les que inhibeixen els punts de control de les cèl·lules, les que funcionen amb cèl·lules T i les que utilitzen virus. Cada immunoteràpia és personalitzada per al pacient que la rep, i s'escull la més adequada per a ell segons una sèrie de paràmetres, com ara la quantitat i qualitat de les cèl·lules immunològiques del pacient al cos i la seva activitat (si estan sanes o debilitades) o el tipus i l'extensió del càncer.

### 4.1. Teràpia amb anticossos monoclonals

La teràpia amb anticossos monoclonals consisteix en la síntesi en un laboratori d'anticossos preparats per atacar el càncer o la patologia que s'està patint. També rep el nom de teràpia dirigida. És pot configurar de tal manera que ataqüi les cèl·lules malignes o perquè es posicionin al teixit on es trobin les cèl·lules per evitar que puguin proliferar i que rebin subministraments, impeding així la seva supervivència.

### 4.2. Inhibidors de punt de control

Els inhibidors de punt de control formen part del mecanisme que utilitzen les cèl·lules tumorals per passar desapercebudes i no generar una resposta immunològica. Les cèl·lules cancerígenes tenen una proteïna anomenada PD-L1 capaç d'interactuar amb un receptor que tenen les cèl·lules immunitàries anomenat PD-1. El receptor PD-1 és el que dona el senyal per a activar o desactivar la resposta immunitària, i en ser manipulat amb el PD-L1 no envia cap senyal d'alerta.

El que fa aquest tipus d'immunoteràpia és bloquejar la connexió entre el PD-1 i el PD-L1 per tal que les cèl·lules T puguin generar un senyal d'alarma i el propi

El sistema immunitari del pacient ataca el càncer. Alguns dels medicaments utilitzats són el Nivolumab, el Pembrolizumab i l'Atezolizumab. S'administren per via intravenosa cada dues, tres, quatre o sis setmanes.

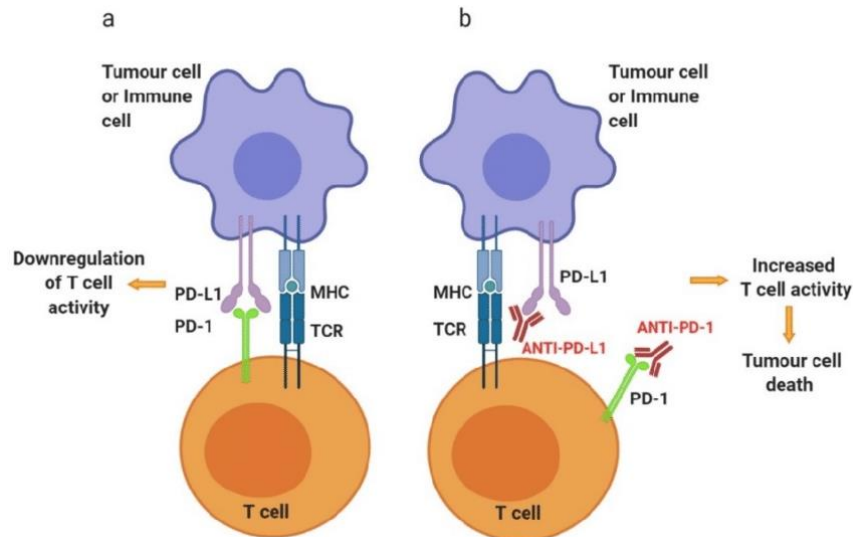


Figura 7: a) Inhibidors de punt de control en funcionament. b) Immunoteràpia desactivant els inhibidors de punt de control. Font: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-PD-1-and-anti-PD-1-PD-L1-mechanisms-of-action-on-T-cell\\_fig3\\_342750704](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-PD-1-and-anti-PD-1-PD-L1-mechanisms-of-action-on-T-cell_fig3_342750704) [Data de consulta: 10/10/21]

Un altre tipus de receptor, el CTLA-4, té una funció similar. La immunoteràpia dirigida al CTLA-4 s'administra utilitzant el medicament Imilimumab, administrat per via intravenosa una vegada cada sis setmanes.

### 4.3. Teràpia amb cèl·lules CAR-T

La teràpia amb cèl·lules CAR-T consisteix en l'extracció i modificació de cèl·lules T del pacient. La modificació de les cèl·lules consisteix en substituir un dels receptors de la cèl·lula per un receptor d'antigen quimèric (CAR per les seves sigles en anglès, chimeric antigen receptor). Després, fan reproduir les cèl·lules CAR-T i les introdueixen de nou al pacient perquè ataquin les cèl·lules cancerígenes.

### 4.4. Teràpia vírica

La teràpia vírica consisteix en injectar un virus modificat al laboratori per tal que ataquí només les cèl·lules cancerígenes. Aquest virus s'injecta directament al

tumor i a mesura que es va reproduint les cèl·lules cancerígenes van morint. Mentre moren, les cèl·lules alliberen una proteïna que permet que el sistema immunitari reconegui les altres cèl·lules que la continguin i així ajudar en la tasca de destruir el tumor.

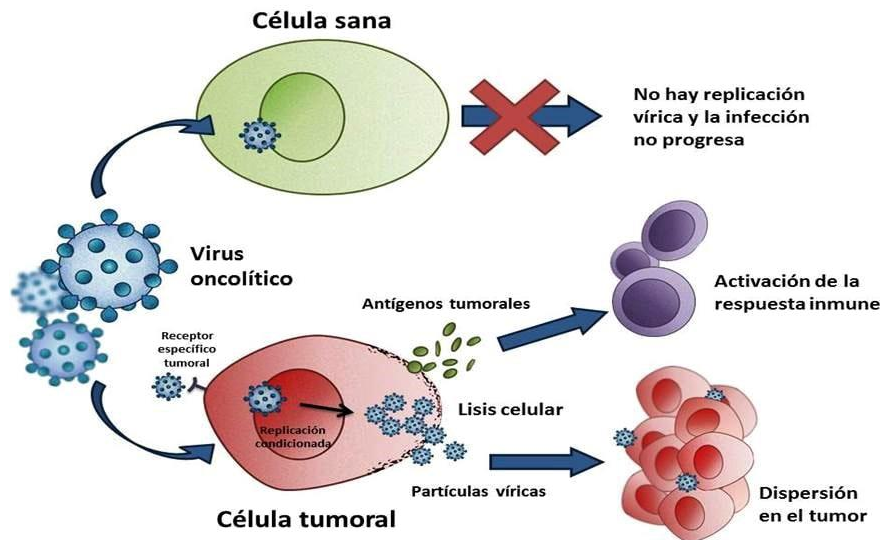


Figura 8: Funcionament de la teràpia vírica Font: <https://www.rafer.es/innovacion-laboratorio-clinico/los-virus-aliados-contra-el-cancer/> [Data de consulta: 10/10/21]

#### 4.5. Vacunes

Tot i que encara està en fase experimental, una de les branques de la immunoteràpia treballa en una mena de vacunes. S'utilitza sobretot en casos de càncer, i consisteix en extreure una mostra del càncer i de cèl·lules dendrítiques del pacient per tal que les cèl·lules dendrítiques identifiquin a les altres com a malignes. D'aquesta manera, un cop tornen a introduir les cèl·lules dendrítiques a l'organisme reconeixen les cèl·lules cancerígenes i ataquen el tumor.

## 5. Càncer de pulmó

Com indica el seu nom, el càncer de pulmó és comença a desenvolupar als pulmons. Pot afectar tant homes com dones, tot i que és més freqüent en homes. L'any 2020 es van diagnosticar 2 206 771 casos de càncer de pulmó al món, un 11,4% del total de casos de càncer diagnosticats. A Espanya, és el segon càncer més freqüent en homes i el quart en dones.

És el càncer que causa més morts mundialment i també a Espanya. L'edat mitjana a la qual es diagnostica és als 65 anys.

### 5.1. Causes

Tot i que no hi ha una causa específica que faci desenvolupar el càncer de pulmó, sí que existeixen uns *factors de risc* que fan augmentar les possibilitats d'un individu de desenvolupar aquest càncer. No és un càncer hereditari, tot i que tenir-ne múltiples antecedents familiars fa augmentar el risc de patir aquest tipus de càncer.

En el cas del càncer de pulmó, el *factor de risc* principal és el tabac. Un 90% dels pacients amb càncer de pulmó són o han estat fumadors. El fum del tabac debilita les cèl·lules dels pulmons, així que les persones que fumen molt o durant molt de temps augmenten encara més el risc de desenvolupar càncer. Els *fumadors passius* també tenen aquest *factor de risc*, perquè les seves cèl·lules pulmonars també estan debilitades.

Un altre *factor de risc* és l'exposició a l'amiant, el níquel o el radó; especialment si és durant un període de temps prolongat, per exemple si es té contacte amb aquestes substàncies a la feina (mineria, indústria tèxtil, aïllaments, etc.).

## 5.2. Síntomes

La simptomatologia del càncer de pulmó sovint no està present en estadis inicials del càncer, sinó que els símptomes comencen a aparèixer quan ja està bastant desenvolupat. Això impedeix que es pugui diagnosticar en les primeres etapes del desenvolupament i que moltes vegades quan es diagnostica ja està en etapes tant avançades que no hi ha res a fer. També és possible que el càncer no causi cap símptoma i que es diagnostiqui per casualitat en fer una radiografia per algun altre motiu.

Els símptomes més freqüents són tos persistent (també pot ser amb sang), dificultats respiratòries (sensació de falta d'aire, *dispnea*, etc.), dolor toràcic, fatiga, pèrdua de pes i pèrdua de gana. També hi ha altres símptomes que apareixen amb menys freqüència com ara canvis de veu, dolors ossis, mal de cap, paràlisis facial i vòmits.

## 5.3. Tipus

Hi ha dos tipus principals de càncer de pulmó, que es distingeixen segons el tipus de cèl·lula que els origina. Són els de cèl·lula petita i els de cèl·lula no petita.

Els de cèl·lula petita o microcítics són els menys freqüents, representen tan sols el 20% del total de càncers de pulmó diagnosticats. Es caracteritzen per ser molt agressius i de creixement ràpid. Solen començar a desenvolupar-se als bronquis principals (els que es troben al centre del tòrax). Formen tumors molt grans que creen metàstasi amb facilitat.

Els càncers de pulmó de cèl·lula no petita es divideixen en tres grans grups:

- Els carcinomes escamosos els pateixen el 40% dels diagnosticats, són de creixement lent i apareixen exclusivament en persones fumadores.
- Els adenocarcinomes constitueixen el 30% dels diagnosticats, apareixen a les zones perifèriques del pulmó i tenen tendència a fer metàstasi.



- Els carcinomes de cèl·lules grans són el tipus menys freqüent, afecten el 10% dels diagnosticats. Apareixen en cèl·lules grans i són més agressius que els altres càncers de cèl·lula no petita.

#### 5.4. Eines de diagnòstic

Abans de començar a buscar un possible tumor, s'han d'analitzar els símptomes del pacient i també informació sobre els *factors de risc* de càncer de pulmó. Després d'aquest pas, es fa una placa de raig X al tòrax i els professionals valoren si s'ha de continuar l'estudi del pacient. En cas afirmatiu, es procedeix a localitzar el tumor.

Per tal de localitzar el tumor es duen a terme proves de diagnòstic per la imatge. Primer, es fa un escàner o tomografia computada de tòrax (TC). Aquesta prova permet veure tots els òrgans de la zona del tòrax i l'abdomen. Per complementar la TC, també es realitza una tomografia amb emissió de positrons (PET-TC). En aquesta prova, s'administra un marcador que és atret per les cèl·lules tumorals. S'administra per tot el cos i serveix per descartar possibles tumors a altres zones del cos.



Figura 9: TC d'un pacient amb càncer de pulmó.  
Font: <https://www.uchealth.com/pulmonary-insights/tackling-lung-cancer-multidisciplinary-approach-screening-research/> [Data de consulta: 10/10/21]

Un cop confirmada la presència del tumor, es realitza una biòpsia amb una mostra del teixit tumoral per tal de distingir el tipus de càncer i decidir el tractament més adient. El mètode d'extracció de la mostra depèn de la localització i extensió del tumor. La menys invasiva és la fibronoscòpia, que consisteix en introduir un endoscopi pel nas o per la boca. Es realitza amb *anestèsia local* i permet veure l'interior dels bronquis pulmonars. Si el tumor està situat en aquella zona, se n'extreu una mostra amb l'endoscopi. Un altre

mètode és la punció pulmonar guiada amb una tomografia computada, que consisteix en la introducció d'una agulla fina a través del tòrax. També es fa amb *anestèsia local*, però és una mica més invasiva. Si amb aquestes proves no es pot realitzar un diagnòstic clar, és realitza una intervenció quirúrgica. En aquest cas, és necessari utilitzar *anestèsia general*.

Quan ja es tenen els resultats de les proves, es classifica el càncer. Els diferents estadis depenen de la mida del tumor, de la profunditat d'ocupació del teixit proper i de si les cèl·lules canceroses s'han disseminat i han format metàstasi a altres parts del cos. El mètode de classificació s'anomena TNM. La T fa referència a la mida del tumor, la N als ganglis pulmonars i la M a la presència de metàstasi. Hi ha quatre estadis, que van des d'un càncer lleu (estadi I) a un càncer terminal (estadi IV).

## 5.5. Tractaments

El tractament escollit dependrà totalment del tipus de càncer. Un cop fetes les proves de diagnòstic, un comitè de professionals format per pneumòlegs, radiòlegs, oncòlegs i cirurgians toràcics (entre altres experts en el tema) trien el tractament més adequat per a cada cas. El tractament s'escull tenint en compte les característiques del pacient, el tipus de tumor i l'estadi del càncer. Algunes de les característiques dels pacients que juguen un paper important en la decisió del tractament són la seva edat i les malalties prèvies.

### **Tractament quirúrgic**

El tractament quirúrgic sol ser el recomanat per a pacients en estadis inicials del càncer de pulmó que en general tinguin un bon estat de salut, perquè quan encara no ha fet metàstasi i té els límits definits pot eliminar el tumor completament. Un 30% dels pacients amb càncer de pulmó poden rebre tractament quirúrgic.

Depenent de la ubicació i l'extensió del tumor hi ha diferents tipus d'operacions, que van des de la resecció sublobar atípica, on només s'extirpa la part del lòbul pulmonar afectada, fins a la pneumonectomia, on s'extirpa tot el pulmó afectat,

passant per la segmentectomia, en què s'extirpa el segment del lòbul afectat, i la lobectomia, on s'extirpa el lòbul que conté el tumor.

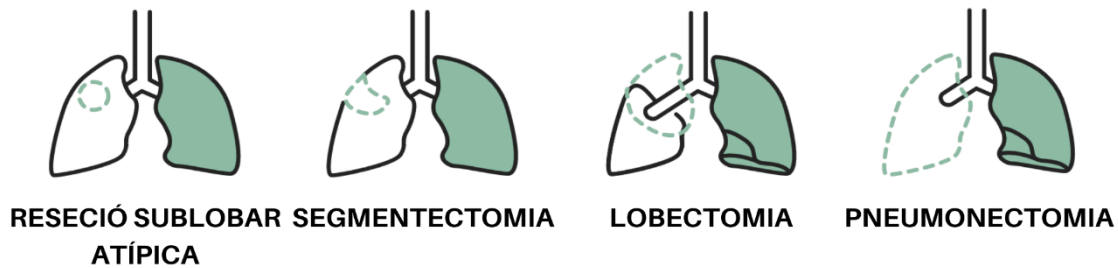


Figura 10: Possibilitats de tractament quirúrgic. Editat amb Canva a partir dels dibuixos. Font: <https://www.clinicbarcelona.org/ca/asistencia/malalties/cancer-de-pulmo/tractament#tractament-quirurgic> [Data de consulta:9/10/21]

## Quimioteràpia

La quimioteràpia és el tractament més aplicat en casos de càncer de pulmó, principalment perquè es pot utilitzar per tractar tots els estadis o com a complement d'altres tipus de teràpies. Es pot administrar per via intravenosa o per via oral. L'efecte que produeix la quimioteràpia inhibeix la divisió de les cèl·lules, tant les cancerígenes com les sanes. En afectar també les cèl·lules sanes, produeix efectes secundaris com ara la caiguda del cabell, úlceres a la boca, fatiga, vòmits i pèrdua de gana.

## Radioteràpia

La radioteràpia utilitza raigs X d'alta energia (fotons), raigs gamma o protons per destruir les cèl·lules tumorals. S'aplica només a la zona on hi ha el càncer, però també afecta el teixit sa que hi ha al seu voltant. Per aquesta raó no s'aplica quan el càncer ocupa una zona gran del pulmó. Es pot utilitzar com a tractament principal, abans o després d'una cirurgia o en combinació amb quimioteràpia.

## Immunoteràpia

La immunoteràpia que s'empra per combatre el càncer de pulmó és la que actua amb els inhibidors de punts de control i només es pot aplicar a càncers

de cèl·lula no petita. Generalment s'aplica després d'haver rebut tractament amb quimioteràpia, però també és pot rebre com a primera teràpia (Veure apartat 6).

### **Teràpies combinades**

En molts casos, el tractament escollit pels oncòlegs és una combinació de diferents tipus de teràpies per tal d'aconseguir l'erradicació completa del càncer. Es pot administrar radioteràpia o quimioteràpia abans o després de fer un tractament quirúrgic; administrar radioteràpia i quimioteràpia al mateix temps o de forma seqüencial o administrar quimioteràpia després del tractament amb radioteràpia.

### **Transplantament de cèl·lules mare**

El transplantament de cèl·lules mare serveix per suplir la manca de cèl·lules mare produïda pel càncer o els tractaments contra el càncer. Fer aquests transplantaments permet que es puguin administrar dosis més potents de quimioteràpia. També poden servir per reconstruir l'òrgan ocupat pel càncer, quan el tumor ja ha estat eliminat.

## 6. Immunoteràpia en càncer de pulmó

La immunoteràpia s'aplica només a càncers de pulmó de cèl·lula no petita, majoritàriament amb metàstasi a altres parts del cos.

Els medicaments immunoterapèutics que s'utilitzen per tractar el càncer de pulmó són el Nivolumab, el Pembrolizumab i l'Atezolizumab, que tenen el nom comercial de Opdivo, Keytruda i Tecentriq, respectivament. Tots tres medicaments estan formats per proteïnes i són inhibidors de punts de control (veure apartat 4.2). També poden ser utilitzats per tractar altres tipus de càncer.



Figura 11: Model 3D de Nivolumab, Pembrolizumab i Atezolizumab (en aquest ordre). Font: <https://www.rcsb.org/> [Data de consulta: 12/10/21]

### 6.1. Funcionament

Sigui quin sigui el medicament que s'utilitza, s'ha de fer una anàlisi de sang prèvia al tractament. En aquesta anàlisi es mesuraran la quantitat de limfòcits que té el pacient mitjançant una citometria de flux. Un cop es tinguin els resultats, si hi ha prou cèl·lules vives i amb prou activitat com per permetre que el medicament pugui actuar, es procedeix a administrar-lo. Si no s'arriba als mínims de cèl·lules i d'activitat cel·lular establerts no es pot procedir amb la immunoteràpia, perquè en no haver-hi prou cèl·lules en condicions no faria cap efecte.

Un cop injectats, aquests medicaments comencen a actuar, col·locant-se en el receptor PD-1 dels limfòcits T. D'aquesta manera, impedeixen que el receptor

PD-L1 de les cèl·lules cancerígenes estableixi connexió amb el limfòcit T i l'inhibeixi.

## 6.2. Mètode d'aplicació

La immunoteràpia s'aplica per via intravenosa, ja sigui amb una cànula (es col·loca al braç) o amb una via central (es col·loca al pit). L'administració de la primera dosi dura una hora, la resta de dosis s'administren en només mitja hora, amb una separació de dues, tres o quatre setmanes entre una i altra. En cap cas la immunoteràpia pot durar més de dos anys. Cal dir que, de tota manera, si la immunoteràpia no està funcionant també es deixa d'injectar i es continuen provant altres teràpies.

## 6.3. Efectes secundaris

Com ja he explicat en l'apartat 3.3, els efectes secundaris que produeixen els tractaments d'immunoteràpia són bastant lleus, similars als que pot produir una grip, i fàcils de tractar. Tot i així, hi ha casos en què sí que apareixen efectes secundaris més greus, que poden esdevenir perillosos si no es consulten amb el metge.

Els més comuns són la fatiga, la diarrea, la falta d'aire, la tos, el malestar general, la falta de gana, el dolor físic, les inflamacions de la pell i la febre. També apareixen, amb menys freqüència, símptomes com úlceres, vòmit, set, desmais, canvis en l'orina o zones engroguides.

### 6.4. Eficàcia

L'assaig clínic KEYNOTE-024, acabat l'any 2019, tenia com a finalitat comparar l'evolució de pacients amb càncer de pulmó de cèl·lula no petita tractats amb quimioteràpia i pacients tractats amb Pembrolizumab. En aquest estudi es va comptabilitzar la supervivència dels pacients i també l'aparició d'efectes secundaris durant el tractament.

Es va administrar Pembrolizumab a 154 pacients i quimioteràpia a 151. Tal com es veu en el gràfic, el percentatge de supervivència es va mantenir més alt durant tot l'estudi en el pacients que estaven rebent Pembrolizumab.

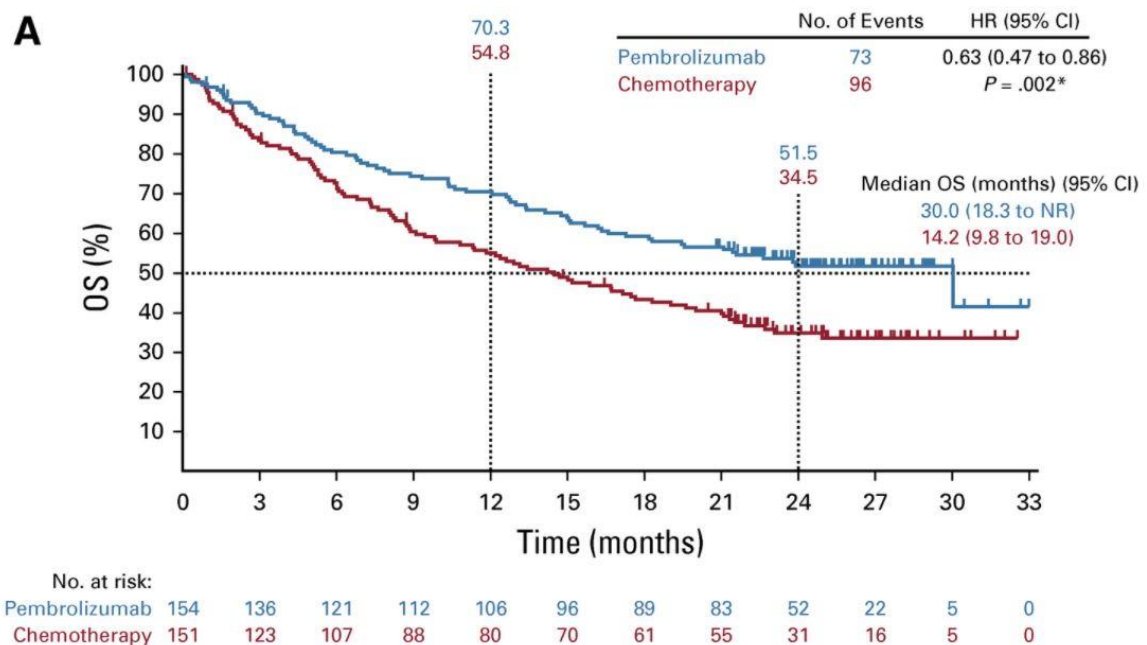


Figura 12: Gràfic comparatiu de la supervivència de pacients amb càncer de pulmó de cèl·lula no petita tractats amb immunoteràpia (Pembrolizumab) o quimioteràpia de l'estudi KEYNOTE-024. Font: <https://ascopubs.org/na101/home/literatum/publisher/asco/journals/content/jco/2019/jco.2019.37.issue-7/jco.18.00149/20190216/images/large/jco.18.00149f2.jpeg> [Data de consulta: 12/10/21]

Després de 25 mesos de tractament, havien mort 73 pacients tractats amb immunoteràpia i 96 pacients tractats amb quimioteràpia. Pel que fa als efectes secundaris, els pacients que van rebre immunoteràpia van tenir un 22,1% menys d'efectes secundaris que els pacients que van rebre quimioteràpia.

## 7. Pràctiques al laboratori

Com he explicat a la introducció, formo part del programa d'ajut als treballs de recerca Argó. Mitjançant aquest programa, la Universitat Autònoma de Barcelona posa en contacte experts en diferents àrees de coneixement amb alumnes que estan cursant el batxillerat per proporcionar-los temes i assessorament pel treball de recerca. Una de les característiques més importants d'aquest programa és que també et permet accedir a laboratoris de recerca.

En el meu cas, tenia com a assessora la doctora x, especialista en Immunologia, cap del servei d'immunologia de l'Hospital Germans Tries i Pujol de Badalona i directora del laboratori d'immunologia de l'Institut de Recerca Germans Tries i Pujol (IGTP).

Per realitzar les pràctiques vaig tenir accés al laboratori d'immunologia de l'Institut de Recerca Germans Tries i Pujol (IGTP), a Badalona. Aquest laboratori està dirigit per la doctora x, i vaig assistir a experiments dins del projecte de x, duts a terme per x. Aquest grup de recerca està desenvolupant una sèrie de marcadors que permetrien determinar amb antelació si un pacient amb càncer de pulmó respondrà al tractament d'immunoteràpia que ofereix l'hospital.

Els procediments formen part d'un dels projectes de recerca que estan duent a terme ara mateix i que encara no estan publicats, per la qual cosa no descriuré exactament ni els procediments duts a terme, ni les quantitats utilitzades, ni alguns dels reactius utilitzats.

L'objectiu de l'experiment és observar l'expressió d'un marcador concret al cap de 24, 72 i 96 hores d'incubació a partir de la seva aplicació en les cèl·lules. Aquest marcador indica si el pacient respon a la medicació proposada. A part, durant el procediment també es miren altres factors per valorar si el pacient es pot sotmetre a immunoteràpia, com per exemple el número d'anticossos vius que té i la proliferació de les cèl·lules.



Per a fer-ho, s'han de realitzar diversos procediments. Els principals són l'extracció de cèl·lules a partir d'una mostra de sang, el cultiu d'aquestes cèl·lules i el tint amb el marcador.

### 7.1. Extracció i cultiu de cèl·lules

Objectius:

- Determinar la quantitat de cèl·lules vives i viables que té l'individu
- Preparar les plaques de cultiu per l'experiment següent

Material	Tubs falcon de 15 ml, pipetus, pipeta de 1000 µl, pipeta de 200 µl, pipeta Pasteur, tubs de citometria, plaques de cultiu de 24 pous, gradeta per a tubs falcon, gradeta per a tubs de citometria, paper d'alumini, retolador marcador fi, pot amb lleixiu i aigua (per llençar les puntes)
Reactius	Mostra de sang, Ficoll-Paque, phosphate buffered saline (PBS), reactiu de viabilitat, Cytognos, marcador fotoreactiu, medis de cultiu
Màquines	Campana d'extracció, centrífuga, incubadora, Citòmetre de Flux FACSCanto II (BD Biosciences), vòrtex

Nota: Aquest procediment s'ha de fer dins de la campana d'extracció.

#### 1. Extracció de les cèl·lules a partir de la mostra de sang

El mètode utilitzat per extreure les cèl·lules és la tècnica ficol.

- a. En un tub falcon de 15 ml, s'afegeixen 7 ml de la mostra de sang i 7 ml de Ficoll-Paque amb l'ajuda del pipetus. Es passa per la centrífuga durant 5 min a 400 G (400 vegades la força de la gravetat) per separar els components.

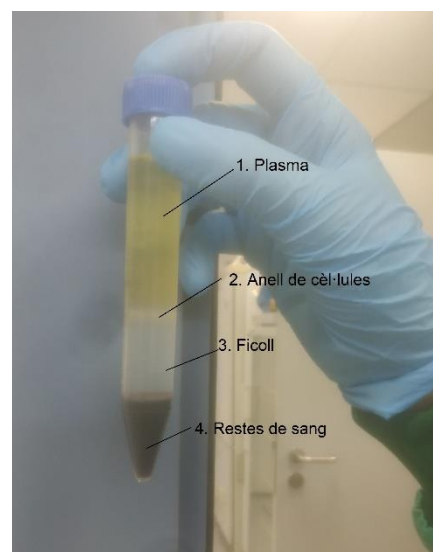


Figura 13: Mostra de sang post centrifuga amb els components marcats. Font: pròpia. Editada amb paint. [Fotografia feta el 12/07/2021, editada el 25/07/21]

- b. Amb la pipeta Pasteur, s'extreu l'anell de cèl·lules i es posen en un altre tub falcon de 15 ml. Se li fan diversos rentats (veure annex A).
- c. Es treu el sobrenedant amb una pipeta Pasteur. Es mesura el volum de cèl·lules que hi ha i s'afegeix volum fins arribar a 1 ml.

## 2. Recompte de cèl·lules amb una citometria de flux

- a. Es mou la mostra des del tub falcon a un tub de citometria amb la pipeta de 1000  $\mu$ l.
- b. S'afegeix el reactiu de viabilitat amb la pipeta de 200  $\mu$ l (a partir d'aquest punt, la mostra ha d'estar embolicada amb paper d'alumini per evitar el contacte amb la llum).
- c. S'incuba a la nevera durant 20 minuts.
- d. S'afegeix el Cytognos (reactiu que permet fer el recompte de les cèl·lules quan estan al citòmetre).
- e. Es fa un vòrtex a la mostra i es posa el tub al Citòmetre de Flux FACSCanto II (BD Biosciences).
- f. S'engega el programa i es fa el recompte. Resultats: 21 M de cèl·lules en 1 ml (1000  $\mu$ l).



Figura 14: Mostra al citòmetre durant el recompte. Font: pròpia [Fotografia feta el 12/07/2021]

## 3. Preparació de les tres plaques de cultiu

A partir d'aquí, la mostra se separa en dues: la primera (mostra A), de 8 M de cèl·lules, no durà fotoreactiu i servirà per determinar quina fosforescència tenen les cèl·lules per si mateixes; i la segona (mostra B), de 12 M de cèl·lules, que durà el marcador fotoreactiu. La mostra B s'ha de protegir de la llum a partir del moment en què se li afegeix el marcador.

- a. Es calcula quin volum de mostra es necessita per a cada tipus de cèl·lules.

$$8 M \text{ de cèl} \cdot \text{lules} \times \frac{1000 \mu\text{l de mostra}}{21 M \text{ de cèl} \cdot \text{lules}} = 381 \mu\text{l de mostra A}$$

$$12 M \text{ de cèl} \cdot \text{lules} \times \frac{1000 \mu\text{l de mostra}}{21 M \text{ de cèl} \cdot \text{lules}} = 571 \mu\text{l de mostra B}$$

- b. Se separen els dos volums en dos tubs falcon i se'ls fa un rentat.
- c. S'afegeixen 1'5 ml de marcador fotoreactiu a la mostra B i s'incuba a la incubadora durant 12 minuts. Quan s'obre la incubadora es tanca la porta per evitar corrents d'aire.
- d. Es fa un rentat a les dues mostres. S'extreu el sobrenedat i s'afegeix el volum necessari per a omplir les plaques.
- e. Es posa la mostra B en un tub de citometria i s'afegeix Cytognos.
- f. Se li fa un vòrtex i es passa pel citòmetre per assegurar-nos de tenir prou cèl·lules vives. Després es retorna a un tub falcon de 15 ml.

- g. Es retolen les tres plaques de cultiu. S'utilitzen dos pous per a cada mostra: el primer amb medi PHA i el segon, que fa de control negatiu, amb medi A.

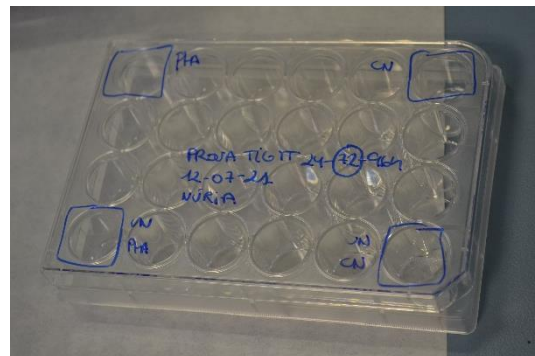


Figura 15: Placa de cultiu retolada. Font: pròpia. [Fotografia feta el 12/07/21]

- h. S'afegeix sèrum a les dues mostres per a evitar que les cèl·lules es morin durant la incubació. Es *pipeteja* per resuspendre les cèl·lules i que n'hi hagi la mateixa concentració a tota la mostra.
- i. S'afegeixen les mostres a la placa de cultiu. Tot seguit s'afegeix el medi i es tapa la placa amb paper d'alumini.
- j. Es repeteix el punt anterior per a les altres dues plaques.

#### 4. Incubació de les cèl·lules

Es tanca la porta i s'introdueixen les tres plaques de cultiu a la incubadora. Es treu el paper d'alumini que les tapa just abans d'introduir-les a la incubadora.

#### 5. Recollida del material i neteja de la campana

Es desa tot el material al seu lloc i es neteja la campana amb una solució de lleixiu al 3%. Després se sotmet a radiació ultraviolada durant 15 minuts.

### 7.2. Expressió del marcador a les 24/72/96 hores

Objectius:

- Determinar el creixement de les cèl·lules.
- Determinar l'expressió del marcador per saber si el subjecte és candidat a sotmetre's a una immunoteràpia o no.

Material	Tubs falcon de 15 ml, pipeta de 1000 µl, tubs de citometria, placa de cultiu de 24 pous, gradeta per a tubs falcon, gradeta per a tubs de citometria, paper d'alumini, retolador marcador fi, pot amb lleixiu i aigua
Reactius	Cèl·lules incubades durant 24/72/96 h, medi satin buffer (PBS + sèrum), medi Facsflow (PBS), reactiu de viabilitat, mix de marcadors, reactiu fixador
Màquines	Centrífuga, incubadora, vòrtex, citòmetre Aurora 5-laser (Cytex Biosciences)

#### 1. Extracció de la placa de 24/72/96 h de la incubadora

Es tanca la porta i s'extreu la placa que està retolada com la de 24/72/96 h de la incubadora. Es tapa immediatament amb paper d'alumini. S'han de mantenir tapades durant la resta del procediment.

#### 2. Resuspensió de les cèl·lules

- a. Amb una pipeta de 1000 µl, es va agafant i deixant anar el contingut del pou, passant per tots els costats i per la base.

- b. Es mouen les cèl·lules cap a un tub de citometria.
- c. S'afegeix medi satin buffer en els pous que contenen cèl·lules de la mostra A i medi Facsflow en els pous que contenen cèl·lules de la mostra B.
- d. Es repeteixen els punt a i b dos cops amb el medi, per agafar el màxim de cèl·lules possibles.
- e. S'afegeix el medi corresponent al tub de citometria fins arribar a un volum de 3 ml.
- f. Es repeteixen els passos d'a a e en els altres tres pous.
- g. Es centrifuguen les mostres 5 minuts a 400 G.



Figura 16: Pipeta treballant a la placa de 96 h per resuspendre les cèl·lules. Font: pròpia. [Fotografia feta el 16/07/21]

### 3. Incorporació del mix de viabilitat i volum

- a. S'afegeix el reactiu de viabilitat a les mostres que provenen de la mostra B (mostres B i B'). Es deixen reposar 15 min.
- b. Es fa un rentat a les mostres B i B'.
- c. Es *decanten* les mostres B i B'.
- d. S'afegeix el mix de marcadors que ajudarà a determinar la viabilitat de la immunoteràpia en l'individu a les mostres B i B' i es deixen reposar 20 min.
- e. Es decanten les mostres B i B'.
- f. S'afegeixen 3 ml de Facsflow a les mostres B i B'.



Figura 17: Pipeta agafant el reactiu de viabilitat. Font: pròpia. [Fotografia feta el 15/07/21]

#### 4. Rentats

- a. Es fa un rentat a totes les mostres.
- b. Es decanten les mostres.
- c. Es repeteixen els passos a i b.
- d. Es fixen les cèl·lules de les mostres amb el reactiu fixador. Es deixen reposar 10 min.
- e. Se'ls fa un altre rentat.
- f. S'afegeixen 600 µl de Facsflow.

#### 5. Citometria de flux

- a. Es fa un vòrtex a totes les mostres.
- b. Es passen les mostres pel citòmetre Aurora 5-laser (Cytex Biosciences).
- c. Es guarden els resultats de la citometria de flux.



Figura 18: Citòmetre Aurora 5-laser. Font pròpia. [Fotografia feta el 15/07/21]

#### 6. Recollida del material i neteja

Es desa el material al seu lloc i es neteja la zona de treball amb una solució de lleixiu al 3%.

### 7.3. Resultats

Malgrat que no puc mostrar els gràfics dels resultats obtinguts en aquestes pràctiques per motius de confidencialitat, considero oportú explicar què s'obté un cop acabats aquests procediments.

Quan el tècnic del citòmetre passa les mostres prèviament preparades pel citòmetre, el marcador de viabilitat s'exposa als seus làsers, que permeten mostrar l'activitat cel·lular. Mitjançant un programa automàtic, aquests nivells d'activitat es tradueixen en gràfics.

Els gràfics obtinguts en passar les mostres per la citometria de flux mostren l'espectre de cèl·lules de la mostra que estan vives i les que estan mortes, així com el seu nivell d'activitat. Al mateix temps, també fa un recompte del nombre de cèl·lules totals. Només en una passada pel citòmetre, s'obtenen les dades de totes les cèl·lules presents a la mostra.

Depenent dels marcadors que s'han incorporat a la mostra, també poden donar informació sobre les característiques de les cèl·lules, com ara la seva mida o la presència d'antígens o components que podrien indicar la presència d'un tumor a la superfície cel·lular.

L'obtenció d'aquests resultats també depèn de la capacitat del citòmetre utilitzat, perquè hi ha models que només estan capacitats per a fer recompte de cèl·lules i n'hi ha d'altres que poden proporcionar tota la informació complementària que s'indica al paràgraf anterior.

Si les cèl·lules del pacient candidat a rebre immunoteràpia arriben als mínims estipulats, ja es pot procedir al tractament.

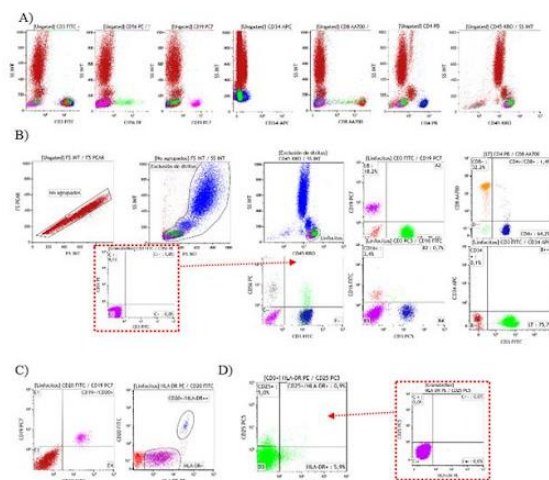


Figura 19: Exemple de panell de resultats d'una citometria de flux. Font: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892019000400008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892019000400008) [Data de consulta: 10/10/821]



## 8. Entrevista al Dr. James P. Allison

El Doctor James P. Allison (Texas, Estats Units, 1948), ha dedicat gran part de la seva vida a la recerca; concretament en el camp de la immunoteràpia. El descobriment del receptor CTLA-4 de les cèl·lules T va convertir-lo en guanyador del Premi Nobel de Medicina l'any 2018 juntament amb Tasuku Honjo. Aquest receptor es connecta amb una proteïna (B7) que impedeix que les cèl·lules T ataquin. Quan aquesta proteïna es bloqueja o no hi és, la resposta immunitària de les cèl·lules T s'activa.

Vaig establir un primer contacte amb el dr. Allison durant el mes de juny, i finalment el dia 30 de setembre de 2021 vaig tenir la oportunitat de fer-li algunes preguntes via e-mail.



Figura 20: Doctor James P. Allison. Font: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/allison/lecture/> [Data de consulta: 10/10/21]

*(Per l'entrevista original en anglès veure l'Annex B)*

### 1. Què o qui va fer que s'interessés en la immunologia?

Va ser durant el meu temps a la Universitat de Texas a Austin que vaig estudiar un grau en Immunologia impartit pel difunt professor Bill Mandy. El professor Mandy va explicar una lliçó sobre cèl·lules T i em vaig enganxar. Les cèl·lules T viatgen per tot el cos buscant cèl·lules que no haurien de ser allà, com ara cèl·lules infectades per virus o fins i tot cèl·lules tumorals; i les cèl·lules T erradiquen tot seguit aquestes cèl·lules anormals. No es sabia res sobre com les cèl·lules T reconeixien les cèl·lules estranyes, o què en regulava la seva proliferació i funció, o de fet pràcticament res. Estava fascinat i vaig decidir dedicar la meua carrera a resoldre els seus secrets.



**2. Quant de temps porta fent recerca en immunoteràpia?**

Des del 1974.

**3. De quin descobriment està més orgullós?**

Descobrir que el CTLA-4 és un fre de la resposta de les cèl·lules T i que bloquejar-lo pot augmentar la resposta antitumoral. Portar aquest descobriment del laboratori a la clínica i veure que salvava vides ha estat increïblement gratificant.

**4. Creu que la immunoteràpia podria esdevenir la cura principal contra el càncer en el futur?**

Definitivament podria ser part de la cura de la majoria de càncers. El projecte en què estic treballant actualment vol combinar immunoteràpia amb altres tractaments de càncer per eliminar els càncers aviat i de manera permanent. L'objectiu és que les combinacions es puguin utilitzar per a cada pacient i per a cada càncer.

**5. Quin consell donaria a algú que es vulgui dedicar a la recerca sobre immunoteràpia?**

Que treballi en una qüestió que realment l'interessi i que segueixi les dades (que va obtenint) on sigui que el condueixin.

## Conclusions

Aquest treball tenia tres objectius principals, que consistien en entendre el funcionament de la immunoteràpia, conèixer les causes i els tipus de càncer de pulmó i ser capaç d'explicar com s'aplica la immunoteràpia en el càncer de pulmó.

Per a respondre a la meva primera incògnita, ha estat clau entendre el procés immunitari i la distinció entre les diferents cèl·lules immunitàries. De fet, encara que les que estan directament implicades en la immunoteràpia són les cèl·lules T i les cèl·lules B, no podrien desenvolupar la seva funció sense totes les altres cèl·lules i molècules que treballen per protegir el nostre cos.

Com s'exposa a l'apartat 4, actualment hi ha cinc tipus d'immunoteràpia, amb diferents funcions i objectius. Segons la malaltia i el pacient que l'està patint, hi ha tipus d'immunoteràpia més adequats que d'altres, ja sigui perquè funcionen millor en aquesta malaltia o bé perquè les característiques del pacient s'adapten millor a un dels altres tipus.

Tot i no tenir un motiu concret que els faci aparèixer, els càncers de pulmó tenen tendència a aparèixer més en persones amb unes certes característiques. Aquestes característiques s'anomenen factors de risc. En el càncer de pulmó, el que més destaca és el fet de ser fumador, factor present en el 90% dels casos de càncer de pulmó diagnosticats. Els càncers de pulmó es diferencien pel tipus de cèl·lula on apareixen, i es divideixen en els de cèl·lula petita i els de cèl·lula no petita. Els tractaments més comuns són la quimioteràpia, la radioteràpia i les intervencions quirúrgiques.

La recerca bibliogràfica que he fet per als dos primers objectius s'ha anat unint fins a arribar a resoldre el tercer. La immunoteràpia més aplicada per tractar casos de càncer de pulmó combat els inhibidors de punt de control, que operen mitjançant els receptors PD-1, PD-L1 i CTLA-4. Un cop aquests receptors han estat bloquejats, les pròpies cèl·lules T del pacient són capaces de destruir les cèl·lules cancerígenes. Per això és tant important el recompte de cèl·lules vives que es fa mitjançant la citometria de flux, perquè si no queden prou cèl·lules T per molt que els receptors estiguin bloquejats no hi haurà res que pugui matar

les cèl·lules del tumor. D'altra banda, cal tenir en compte que només es poden tractar amb immunoteràpia els càncers de cèl·lula no petita.

Les condicions que ha de complir el pacient i com es decreten em va quedar molt clara un cop fetes les pràctiques, en les quals vaig poder observar de ben a prop el mètode de comptabilització de cèl·lules amb citometria de flux i tots els procediments que s'han de dur a terme abans de passar la mostra del pacient pel citòmetre.

El fet d'haver pogut accedir a un laboratori de recerca té les seves llums i les seves ombres; per una banda, ha estat una gran experiència que em servirà en un futur, però per altra banda no puc fer públics els resultats dels experiments realitzats a les pràctiques del laboratori perquè formen part d'una recerca en curs que encara no ha estat publicada, cosa que no m'ha permès acabar de lligar el treball com jo hagués volgut i em deixa amb un regust agredolç.

Tot i això, estic contenta dels resultats obtinguts en aquest treball i espero poder seguir com a investigadora biomèdica el meu camí de descobriment de la immunoteràpia.

## Llistat de referències

### Bibliografia

ANAYA, J.M.; SHOENFELD, Y.; ROJAS-VILLARRAGA, A. "Chapter 5: Introduction to T and B lymphocytes" dins CANO, L.; DAMARIS E. LOPERA, H. (autors principals). *Autoimmunity, from bench to bedside*. Bogota (Colombia): El Rosario University Press, 2013. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/>. Data de consulta: 25/06/21

BELSA HERNÁNDEZ, Magda; CANAL FIGUERAS, Serena; CORTÉS PÉREZ, Rosa; GIL FERNÁNDEZ, Lúdia; JOFRESA MARQUÈS, Sílvia. *Biologia. Batxillerat 2*. Barcelona: SANTILLANA Grup Promotor, 2016.

GINER, G. *Immunologia. Laboratori de Diagnòstic Clínic*. CFGS. Edicions de la Universitat de Barcelona, 2004. Disponible a: [https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=5SqM5ewF9BUC&oi=fnd&pg=PA5&dq=defenses+internes+sistema+immunitari&ots=1D32e3EDCN&sig=i43UR22LkmOsAATmjpAyX3wUHeE&redir\\_esc=y#v=onepage&q=defenses%20internes%20sistema%20immunitari&f=false](https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=5SqM5ewF9BUC&oi=fnd&pg=PA5&dq=defenses+internes+sistema+immunitari&ots=1D32e3EDCN&sig=i43UR22LkmOsAATmjpAyX3wUHeE&redir_esc=y#v=onepage&q=defenses%20internes%20sistema%20immunitari&f=false) > [Data de consulta: 7/04/21]

### Webgrafia

#### Articles científics

Reck, M. (2019, 1 març). *Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater*. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30620668/> > [Data de consulta: 13/10/21]

Waldmann, T. A. (2003, 1 març). *Immunotherapy: past, present and future*. Nature Medicine. <https://www.nature.com/articles/nm0303-269> > [Data de consulta: 31/01/2021]

## Documentals

Bill Haney. (2019). *Breakthrough*. [Documental; digital]. War We Can Win, LLC & Uncommon Productions (1h 31 min) Disponible a: <<https://www.ccma.cat/tv3/alacarta/sense-ficcio/jim-allison-lexit-de-la-ciencia/video/6092860/>> [Data de consulta: 7/04/21]

## Webs

¿Cómo funciona el sistema inmunitario? - Ecoceutics. <<https://www.ecoceutics.com/respuestas-de-salud/como-funciona-sistema-inmunitario/>> [Data de consulta: 21/02/21]

Bank, R. P. D. (s. f.). RCSB PDB - 5WT9: *Complex structure of PD-1 and nivolumab-Fab*. Rcsb.Org. < <https://www.rcsb.org/structure/5WT9>> [Data de consulta: 12/10/21]

Cancer Research UK. CAR T-cell therapy. <<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/immunotherapy/types/CAR-T-cell-therapy>> [Data de consulta: 9/10/21]

Diccionario de cáncer del NCI. Instituto Nacional del Cáncer. <<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/lisis>> [Data de consulta: 15/09/21]

Efectos secundarios de la inmunoterapia. (2020, 16 enero). Cancer.Net. <<https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/c%C3%B3mo-se-trata-el-c%C3%A1ncer/inmunoterapia/efectos-secundarios-de-la-inmunoterapia>> [Data de consulta: 8/10/21]

Fundació Josep Carreras. *Què son les cèl·lules sanguínies?* Fundació Josep Carreras contra la Leucèmia. < [https://www.fcarreras.org/ca/que-son-les-cel·lules-sanguinies\\_1592](https://www.fcarreras.org/ca/que-son-les-cel·lules-sanguinies_1592)> [Data de consulta: 8/04/21]

Generalitat de Catalunya. Càncer de pulmó. Canal Salut. <<https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer/tipus-de-cancer/cancer-de-pulmo/>> [Data de consulta: 24/08/2021]

Generalitat de Catalunya. El sistema limfàtic i l'LNH. Canal Salut. <<https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer/tipus-de-cancer/limfoma-no-hodgkin-lnh/el-sistema-limfatic-i-lnh/>> [Data de consulta: 3/10/21]

Hospital Clínic de Barcelona. Causes i factors de risc del Càncer de Pulmó. Clínic Barcelona. <<https://www.clinicbarcelona.org/ca/asistencia/malalties/cancer-de-pulmo/causes-i-factors-de-risc>> [Data de consulta: 7/09/21]

Hospital Germans Trias i Pujol < <http://www.germanstrias.org/technology-services/cytometry/ca-equipment/> > [Data de consulta: 10/07/21]

Immune system explained. Better Health Channel. <<https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/ConditionsAndTreatments/immune-system> > [Data de consulta: 18/03/21]

Infermera Virtual. (2015, 7 abril). La immunitat, Activitats de la vida diària. <[https://www.infermeravirtual.com/cat/activitats\\_de\\_la\\_vida\\_diaria/fitxa/la\\_immunitat/sang\\_i\\_sistema\\_immune#sis\\_immune\\_natural](https://www.infermeravirtual.com/cat/activitats_de_la_vida_diaria/fitxa/la_immunitat/sang_i_sistema_immune#sis_immune_natural) > [Data de consulta: 8/04/21]

Investigating the Side Effects of Cancer Immunotherapy. (2019, 10 mayo). National Cancer Institute. <<https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2019/cancer-immunotherapy-investigating-side-effects> > [Data de consulta: 10/10/21]

James P. Allison | Biography & Immune Checkpoint Therapy. Encyclopedia Britannica. < <https://www.britannica.com/biography/James-P-Allison> > [Data de consulta: 9/08/21]

Macmillan.org. Immunotherapy for lung cancer. Cancer information. <<https://www.macmillan.org.uk/cancer-information-and-support/treatments-and-drugs/immunotherapy-for-lung-cancer> > [Data de consulta: 12/10/21]

MD Anderson Cancer Center Madrid. *Inmunoterapia. Anderson Center.* <<https://mdanderson.es/el-cancer/tratamientos/inmunoterapia>> [Data de consulta: 8/10/21]

Metric Marketing. (2021, 14 juny). *Immune Tolerance: What is Immune Tolerance & Types of Immunological Tolerance.* Akadeum Life Sciences. <<https://www.akadeum.com/blog/what-is-immune-tolerance/>> [Data de consulta: 29/04/21]

Misistemainmune. *Componentes linfocitos T.* <<https://www.misistemainmune.es/inmunologia/componentes/los-linfocitos-t-mediadores-de-la-inmunidad-celular+11/10/21>> [Data de consulta: 11/10/21]

Newman, T. (2018, 11 gener). *How the immune system works.* Medical News Today. <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/320101#white-blood-cells> > [Data de consulta: 17/03/21]

NHS website. (2021, 19 agost). *Cancer Treatment.* Nhs.Uk. <<https://www.nhs.uk/conditions/lung-cancer/treatment/>> [Data de consulta: 12/10/21]

*Nivolumab.* CancerQuest. <<https://www.cancerquest.org/es/node/3173>> [Data de consulta: 12/10/21]

*Nobel Prizes 2018 winners.* NobelPrize.Org. <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/allison/lecture/>> [Data de consulta: 10/10/21]

Tontonoz, M. (2019, 14 agost). *Immunotherapy: Revolutionizing Cancer Treatment since 1891.* Memorial Sloan Kettering Cancer Center. <<https://www.mskcc.org/news/immunotherapy-revolutionizing-cancer-treatment-1891>> [Data de consulta: 11/10/21]

Top doctors esp. (2019, 16 desembre). *Aplicaciones de la Inmunoterapia.* Top Doctors Blog. <<https://www.topdoctors.es/blog/aplicaciones-de-la-inmunoterapia/>> [Data de consulta: 10/10/21]

## Annexos

### A. Procediment de rentats

Objectius:

- Netejar la mostra de sang.
- Obtenir les cèl·lules concentrades.

Material	Tubs falcon (la mida varia segons la mostra), pipeta de 1000 µl, pipeta de 200 µl, pipeta Pasteur
Reactius	phosphate buffered saline (PBS), mostra
Màquines	Centrífuga

1. S'afegeix la mostra al tub falcon amb la pipeta de 1000 µl.
2. Amb la pipeta de 1000 µl, s'afegeix PBS fins a omplir el tub.
3. Es centrifuga durant 5 minuts a 400 G.
4. Es comprova que hi ha el *pellet* a la base i es treu el sobrenedant amb la pipeta Pasteur fins arribar pràcticament al *pellet*. Es treu el sobrenedant restant amb la pipeta de 200 µl.
5. Repetir passos de l'1 al 4 fins a obtenir el resultat desitjat.



Figura 21: Mostra abans del rentat.  
Font: pròpia. [Feta el 12/07/21]



Figura 22: Mostra després de la centrifuga.  
Font: pròpia. [Feta el 12/07/21]

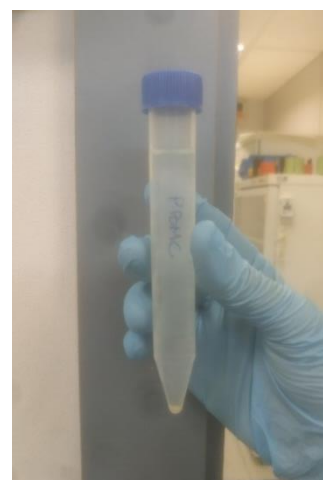


Figura 23: Mostra després de completar el rentat.  
Font: pròpia. [Feta el 12/07/21]



## B. Entrevista original al Dr. James P. Allison

### 1. **What or who got you interested in immunology?**

It was also during my time at UT Austin that I took an undergraduate course in immunology taught by the late Professor Bill Mandy. Professor Mandy gave one lecture on T cells, and I was hooked. T cells travel throughout the body seeking out cells that shouldn't be there, such as virus-infected cells or even tumor cells, and T cells then eradicate these aberrant cells. Nothing was known about how T cells recognized foreign cells, or what regulated their proliferation and function, or virtually anything else. I was fascinated, and decided to devote my career to solving their secrets.

### 2. **How long have you been doing research in immunotherapy?**

Since 1974.

### 3. **Which discovery are you most proud of?**

The finding that CTLA-4 is a brake on the T cell response and that blocking CTLA-4 can ramp up the anti-tumor response. Bringing that laboratory finding into the clinic and seeing it save lives has been incredibly gratifying.

### 4. **Do you think that immunotherapy could become the main cure against cancer in the future?**

It could definitely be part of the cure for most cancers. My current work seeks to combine immunotherapy with other cancer therapeutics to eliminate cancers early and permanently. The goal is that these combinations could be used for every patient and every cancer.

### 5. **Which advice would you give to someone who wants to focus on immunotherapy research?**

Work on a question that really interests you and follow your data wherever it leads.

## C. Glossari

Les entrades del glossari estan marcades en cursiva quan apareixen en el text.

- *Amígdales*: Conjunts de teixit limfoide situats a la faringe. La seva funció consisteix en produir anticossos.
- *Anestèsia general*: Mètode d'aplicació d'anestèsia. S'aplica a tot el cos i adorm el pacient. S'utilitza en intervencions complexes i de llarga durada.
- *Anestèsia local*: Mètode d'aplicació de l'anestèsia. S'aplica només a la zona afectada en què s'ha de fer la intervenció. S'utilitza per intervencions petites i sense gaire complexitat. El pacient està despert durant la seva aplicació.
- *Decantar*: Girar bruscament un tub per llençar el sobrenedant i conservar el pellet.
- *Descamació*: Procés de muda de la pell; que consisteix en el despreniment de les cèl·lules superficials de l'epidermis.
- *Dispnea*: Dificultat respiratòria que crea una sensació de malestar i de falta d'aire. Pot ser de diferents intensitats i es distingeix en quatre tipus depenent de la situació en la qual es dona (dispnea de l'esforç, de repòs, decúbit i paroxística).
- *Factors de risc*: Elements que fan augmentar les probabilitats d'una persona de desenvolupar càncer sense ser-ne la causa.
- *Fumador passiu*: Persona es troba envoltada de fumadors en un lloc tancat i per tant aspira involuntàriament el fum provinent de la combustió del tabac. La presència de tòxics a la seva sang pot arribar a igualar als d'un fumador.
- *Limfa*: Líquid pràcticament transparent que conté principalment limfòcits.
- *Lisi cel·lular*: Deteriorament d'una cèl·lula, causada per una lesió a la membrana exterior.
- *Lisozim*: Enzim amb propietats antibiòtiques que hidrolitza els polisacàrids complexos de la paret cel·lular bacteriana i en causa la lisi.
- *Malalties autoimmunitàries*: Patologies produïdes per un error en el sistema immunitari que desencadena una resposta immunitària que ataca elements propis de l'organisme.

- *Memòria immunològica*: Propietat del sistema immunitari que permet reconèixer un antigen amb el qual ja s'ha tingut contacte.
- *Pellet*: Cèl·lules aglomerades que queden al fons d'un recipient, separades del sobrenedant.
- *Pipetejar*: Succionar i deixar anar el contingut d'un recipient amb l'ajuda d'una pipeta.
- *Queratinització*: Procés de producció de queratina, cosa que endureix les cèl·lules.
- *Resposta cel·lular*: Activació de limfòcits T citotòxics i cèl·lules assassines naturals per destruir antígens.
- *Resposta humoral*: Producció d'anticossos als limfòcits B.
- *Resposta inflamatòria*: Procés que té lloc al teixit que envolta l'agent patògen i facilita la fagocitosi. Consisteix en la dilatació dels vasos sanguinis, així com l'augment de la seva permeabilitat i la formació d'histamines.
- *Seroteràpia*: Tractament d'una malaltia infecciosa mitjançant l'administració d'un sèrum amb anticossos específics d'aquesta malaltia, proporcionant immunitat passiva al pacient.
- *Sistema del complement*: Conjunt de proteïnes que forma part de la resposta immunitària inespecífica.
- *Streptococcus erysipelatis*: Bacteri causant de la malaltia erisipela.
- *Tim*: Òrgan limfoide situat darrere l'estèrnum. Hi té lloc la maduració dels limfòcits T.

## D. Recull de fotos pràctiques

Totes les fotografies mostrades a continuació van ser fetes el 15 i el 16 de juliol de 2021 al laboratori d'immunologia de l'Institut de Recerca Germans Trias i Pujol per mi mateixa. Es mostren en ordre cronològic.

**15/07/21**



Figura 24: Preparació de medis dins la campana d'extracció. Figura 25: Taula de treball amb el material preparat.



Figura 26: Tubs de citometria buits retolats.

Figura 27: Pipeteig d'un dels pous de la placa de cultiu.

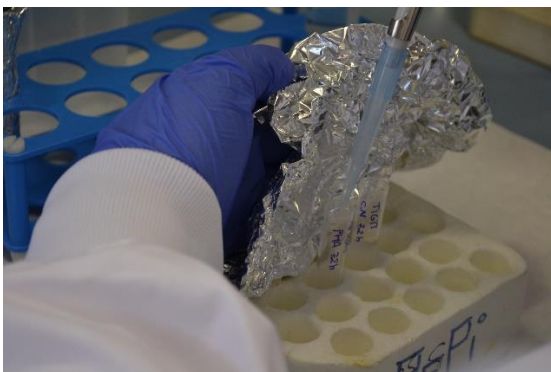


Figura 28: Incorporació del medi fotoreactiu a les mostres. Figura 29: Vòrtex a un dels tubs de citòmetre.



Figura 30: Panell de control centrífuga.



Figura 31: Decantació d'una mostra

16/07/21

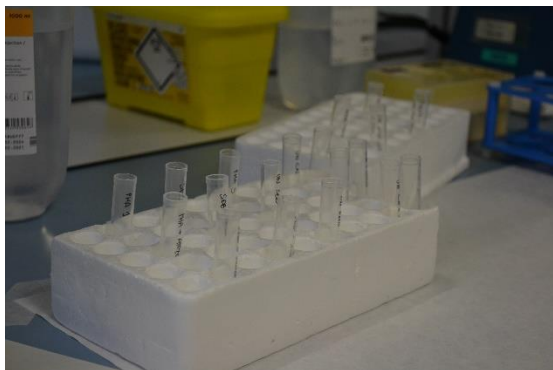


Figura 32: Tubs de citometria retolats.

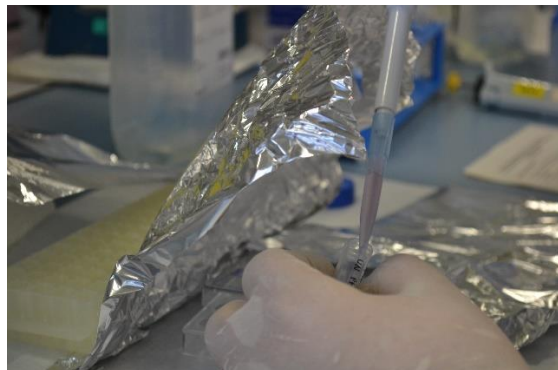


Figura 33: Incorporació del medi de cultiu.



Figura 34: Pipeta succionant les cèl·lules de la placa.

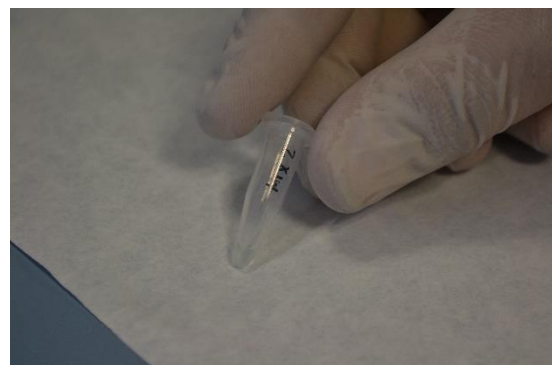


Figura 35: Mix de viabilitat.





Figura 36: Mostra preparada per anar a la centrifuga.



Figura 37: Preparació del medi de cultiu.

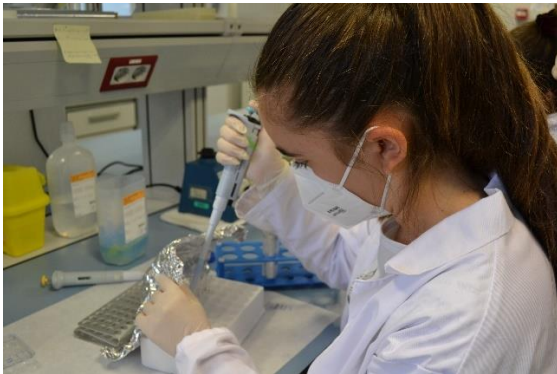


Figura 38: Incorporació del medi a la mostra.

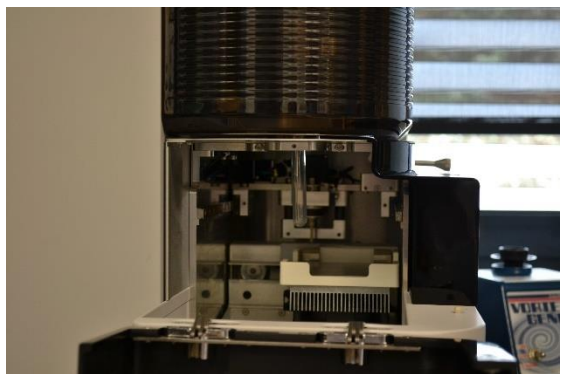


Figura 39: Mostra al citòmetre.