



# IMMUNOTERÀPIA CONTRA EL CÀNCER

Eficàcia d'un tractament amb pèptids contra el  
melanoma murí

COR D'AIGUA

DEPARTAMENT D'EXPERIMENTALS

Treball de Recerca de Batxillerat

CURS 2021-2022



## AGRAÏMENTS

Aquest treball de recerca no hauria estat possible si no fos per totes les ajudes que he rebut.

En primer lloc vull agrair a la meva tutora d'acompanyament de la UdL que em proporcionés l'oportunitat de formar part del Programa Itinera ja que arran d'aquest, vaig poder realitzar les pràctiques a les instal·lacions de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida) i de la Universitat de Lleida. Li agraeixo el seguiment que ha dut a terme durant el procés, el coneixement que m'ha proporcionat i les experiències viscudes dins de les instal·lacions, les quals han estat bàsiques per la realització d'aquest treball

Agraeixo també a l'IRB Lleida i a la UdL l'oportunitat d'haver pogut formar part del Programa Itinera. A través d'aquest programa he pogut experimentar, obtenir resultats i arribar a les conclusions finals del meu TDR. Així doncs també m'agradaria agrair a l'equip de l'IRB Lleida, especialment al cap de l'equip, l'acolliment que em van donar i totes les facilitats que em van donar durant la realització de les pràctiques.

D'altra banda vull fer un agraïment especial a la meva tutora de TDR, ja que l'ajuda i l'orientació que m'ha anat proveint durant tot aquest temps ha estat essencial.

Un agraïment final per a la família i els amics que m'han animat en aquest treball.

## **RESUM**

El punt de partida del treball és l'atractiu de trobar una cura definitiva per al càncer. S'ha plantejat utilitzar un tipus d'immunoteràpia com a tractament contra el càncer.

Després d'haver investigat sobre el melanoma murí (un tipus de càncer de pell de ratolí), s'ha estudiat en diversos experiments l'eficàcia d'unes vacunes terapèutiques fetes amb pèptids com a tractament d'immunoteràpia.

Les vacunes s'han administrat a diversos ratolins i s'ha observat la seva eficàcia comparant els seus resultats amb altres tractaments. Finalment, s'ha comprovat que els pèptids són capaços de matar les cèl·lules tumorals i d'estimular el sistema immunitari per eliminar les cèl·lules tumorals.

## **ABSTRACT**

The basis of the project is the attractiveness of finding a final cure for cancer. It has been considered to use a kind of immunotherapy as a treatment against cancer.

After having investigated mouse melanoma (a type of mouse skin cancer), it has been studied in several experiments the efficiency of some therapeutic vaccines made with peptides as an immunotherapy treatment.

The vaccines have been administered to various mice and it has been observed their efficiency comparing their results with other treatments. Finally, it has been verified that the peptides are capable of killing cancer cells and stimulating the immune system to eliminate cancer cells.

# ÍNDXS

## ÍNDEX DE CONTINGUT

<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>7</b>
<b>2. MARC TEÒRIC.....</b>	<b>9</b>
2.1. EL CÀNCER .....	10
2.2. DEFENSES DEL SISTEMA IMMUNITARI DAVANT DEL CÀNCER .....	11
2.3. MECANISMES D'ESCAPAMENT DE LES CÈL·LULES CANCEROSES .....	12
2.4. TRACTAMENTS CONTRA EL CÀNCER .....	14
2.5. IMMUNOTERÀPIA CONTRA EL CÀNCER.....	15
2.6. MELANOMA .....	16
2.7. LÍNIA DE MELANOMA B16-F10 EN LA SOCA DE RATOLÍ C57BL/6 .....	199
2.8. MEDIS DE CULTIU.....	20
2.9. CITOMETRIA DE FLUX.....	20
<b>3. PROBLEMES, HIPÒTESIS I OBJECTIUS.....</b>	<b>21</b>
<b>4. MARC PRÀCTIC .....</b>	<b>23</b>
4.1. MATERIALS.....	24
4.1.1. Estris de laboratori .....	24
4.1.2. Aparells .....	26
4.1.3. Medis de cultiu .....	27
4.1.4. Solucions .....	28
4.1.5. Reactius .....	28
4.1.6. Material viu.....	28
4.1.7. Tractaments administrats als ratolins.....	29
4.2. METODOLOGIA .....	30
4.2.1. Elaboració d'un cultiu de cèl·lules de melanoma cutani de ratolí B16-F10.....	32
4.2.2. Recompte de cèl·lules .....	33
4.2.3. Experiment <i>in vitro</i> amb el citòmetre.....	35
4.2.4. Preparació de les vacunes.....	38
4.2.5. Experiment <i>in vivo</i> amb ratolins .....	39
<b>5. RESULTATS I ANÀLISI DELS RESULTATS .....</b>	<b>42</b>
5.1. CULTIU DE CÈL·LULES DE MELANOMA DE RATOLÍ B16-F10 .....	42
5.2. RECOMPTE DE CÈL·LULES .....	42
5.3. EXPERIMENT <i>IN VITRO</i> AMB EL CITÒMETRE.....	43
5.4. EXPERIMENT <i>IN VIVO</i> AMB RATOLINS.....	47
<b>6. CONCLUSIONS .....</b>	<b>48</b>
<b>7. PROSPECTIVA .....</b>	<b>50</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>52</b>
<b>9. ANNEXOS .....</b>	<b>55</b>

ANEX I. COMPOSICIÓ MEDIS DE CULTIU.....	56
ANEX II. MIDES DELS TUMORS DELS RATOLINS AMB ELS DIFERENTS TRACTAMENTS .....	57

## ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Comparació d'un teixit epitelial de cèl·lules normals amb un teixit epitelial de cèl·lules canceroses. ....	10
Figura 2. Mecanisme d'actuació d'un limfòcit T citotòxic davant d'una cèl·lula cancerosa. ....	11
Figura 3. Mecanisme d'actuació d'un NK davant d'una cèl·lula cancerosa. ....	12
Figura 4. Mecanisme d'escapament d'una cèl·lula cancerosa per unió del receptor PD-1. ....	13
Figura 5. Extirpació. ....	14
Figura 6. Quimioteràpia. ....	14
Figura 7. Radioteràpia. ....	14
Figura 8. Progressió dels esdeveniments biològics del melanoma cutani. ....	17
Figura 9. Ratolí de soca C57BL/6. ....	19
Figura 10. Comparació de la confluència de cèl·lules en un medi de cultiu. ....	20
Figura 11. Estris de laboratori. ....	24
Figura 12. Càmera de Neubauer. ....	25
Figura 13. Roba d'estabulari. ....	25
Figura 14. Centrifugadora de tubs de microcentrifuga. ....	26
Figura 15. Congeladors. ....	26
Figura 16. Incubadora. ....	26
Figura 17. Bany tèrmic. ....	26
Figura 18. Microscopi. ....	26
Figura 19. Campana de cultius. ....	27
Figura 20. Neveres. ....	27
Figura 21. Citòmetre. ....	27
Figura 22. Esquema dels passos seguits a l'experiment in vitro. ....	30
Figura 23. Esquema dels passos seguits a l'experiment in vivo. ....	31
Figura 24. Esquema dels passos seguits a l'experiment amb els ratolins. ....	31
Figura 25. Incubadora on es col·locava el cultiu cel·lular preparat per a que proliferessin les cèl·lules tumorals. ....	32
Figura 26. Moment en que es va afegir MCC al flascó de cultiu. ....	33
Figura 27. Càmera de Neubauer. ....	33
Figura 28. Comptatge de cèl·lules. ....	34
Figura 29. Cèl·lules observades a través d'un microscopi, amb la càmera de Neubauer. ....	34
Figura 30. Pouets de 200 µl de cèl·lules i de pèptids, segons contingui els pèptids A i A.1 o els pèptids B i B.1. ....	35
Figura 31. Esquema de la distribució dels 18 pouets en funció de la condició i del temps d'incubació. ....	36
Figura 32. Citòmetre. ....	37
Figura 33. Esquema del procés dels tractaments. ....	40
Figura 34. Cèl·lules B16-F10 observades des del microscopi. ....	42
Figura 35. Interpretació dels gràfics del citòmetre. ....	44
Figura 36. Fotografies de les cèl·lules B16-F10 amb els diferents pèptids després de 24 hores d'incubació. ....	44



## ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Tractaments estàndards per a cada estadi de melanoma. ....	18
Taula 2. Components Mastermix. ....	37
Taula 3. Tipus de tractaments. ....	39
Taula 4. Composició RPMI de la casa Cultek. ....	56
Taula 5. Composició MCC. ....	56
Taula 6. Seguiment del creixement dels tumors. ....	58

## ÍNDIX DE GRÀFICS

Gràfic 1. Resultats sobre l'estat de les cèl·lules després de la incubació amb els pèptids. ....	43
Gràfic 2. Resultats sobre l'estat de les cèl·lules després d'1 hora d'incubació amb els pèptids. ....	45
Gràfic 3. Resultats sobre l'estat de les cèl·lules després de 24 hores d'incubació amb els pèptids. ....	46
Gràfic 4. Evolució de la mida del tumor en funció del temps i del tractament. ....	47

## ÍNDIX D'EQUACIONS

Equació 1. Equació per calcular aproximadament el número total de cèl·lules. ....	34
Equació 2. Equació per calcular l'àrea dels tumors. ....	39

# INTRODUCCIÓ

## 1. INTRODUCCIÓ

El càncer és una malaltia molt estudiada. Això és degut a que no hi ha una cura definitiva i és un problema que afecta arreu del món. Aquest treball de recerca consisteix en estudiar l'eficàcia d'un tipus d'immunoteràpia davant d'un tipus de càncer de pell. En el seu moment, vaig decidir escollir aquest tema ja que tinc interès en l'àmbit de la medicina i la investigació. A més a més, he tingut l'oportunitat de realitzar la part pràctica a l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida).

El treball està centrat en el melanoma de ratolí, un tipus de càncer de pell en ratolins. La investigació utilitza una immunoteràpia per fer front al melanoma. Aquesta immunoteràpia té com a base unes vacunes terapèutiques, les quals estan fetes de pèptids. Aquests pèptids s'anomenen B i B.1.

Els objectius principals d'aquest treball són dos. Primerament, es pretén estudiar la capacitat citotòxica dels pèptids B i B.1 en un cultiu cel·lular de cèl·lules de melanoma B16-F10. En segon lloc, es vol demostrar que la combinació dels pèptids B i B.1 és útil per a tractar la línia de melanoma murí (de ratolí) B16-F10 en la soca C57BL/6.

La part de recerca documental ha sigut contínua, ja que cada cop que es realitzava alguna part experimental era necessari tenir un coneixement bàsic per a poder entendre'l. A més el marc teòric conté informació de diversos llibres i webs.

La part pràctica s'ha realitzat a les instal·lacions de l'IRB Lleida. Les pràctiques s'han dut a terme amb l'acompanyament de la meva tutora de la UdL a través del programa Itinera. Les pràctiques es van realitzar durant el mes de juliol del 2021. En aquestes, es van dur a terme diversos experiments els quals consistien en treballar amb cultius cel·lulars de la línia de melanoma B16-F10, fer recomptes cel·lulars, treballar amb un citòmetre, preparar unes vacunes terapèutiques i administrar les vacunes terapèutiques a la soca de ratolí C57BL/6.

Després d'haver realitzat tots els estudis necessaris, s'observa que els pèptids B i B.1 tenen la capacitat de funcionar com un tractament d'immunoteràpia.

# MARC TEÒRIC

## 2. MARC TEÒRIC

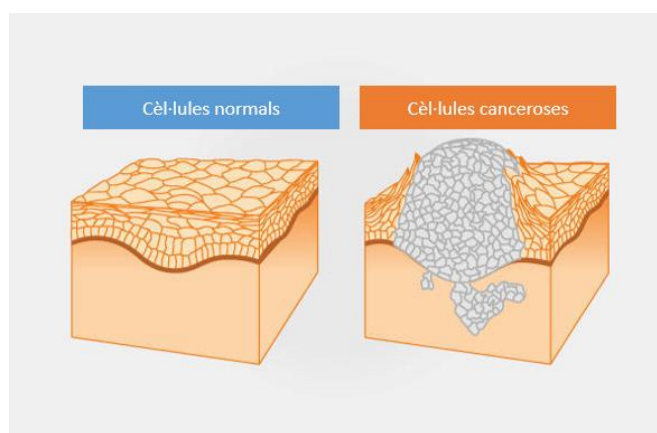
### 2.1. EL CÀNCER

El càncer és un problema de salut important arreu del món i, a més a més, una de les principals causes de mortalitat tant en nens com en adults.

El càncer es pot desenvolupar en qualsevol part del cos. Aquest s'origina quan les cèl·lules tumorals creixen descontroladament. Normalment cada cèl·lula del cos es comunica amb les cèl·lules veïnes per tal de multiplicar-se, aturar-se, actuar o morir, gràcies a la regulació de proteïnes codificades per ella mateixa. Així, de manera col·lectiva, les cèl·lules formen un teixit sa. No obstant, de vegades per diverses causes algunes cèl·lules ja no sintetitzen amb normalitat les proteïnes que codifiquen. Com a resultat, la cèl·lula no es pot comunicar correctament amb les cèl·lules veïnes. Si aquesta cèl·lula comença a multiplicar-se, provoca que en el teixit on creix es formi el que anomenem tumor (figura 1).

Aquestes cèl·lules transformades poden usar els fluids corporals que circulen, com ara la sang o la limfa, per migrar a altres parts del cos per multiplicar-s'hi i fer-hi nous tumors (procés anomenat metàstasi).

Això acaba provocant dificultats per a que el cos funcioni de manera correcta al lloc on s'ha generat el càncer. El càncer més comú en humans és el càncer de pulmó, seguit pel d'estómac, còlon, fetge i mama.



**Figura 1. Comparació d'un teixit epitelial de cèl·lules normals amb un teixit epitelial de cèl·lules canceroses.**

Font: Adaptada de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer>

No obstant, no totes les masses de cèl·lules tumorals són cancerígenes. Per tal de determinar si és càncer, s'ha d'extreure un fragment d'aquesta massa i analitzar-la, aleshores aquesta massa es denomina segons si és cancerígena o no de la següent forma:

- Les masses sense cèl·lules cancerígenes s'anomenen tumors benignes.
- Les masses amb cèl·lules cancerígenes s'anomenen tumors malignes.

Les cèl·lules cancerígenes es formen generalment després d'una sèrie de mutacions que els fan cada vegada més anormals. Aquestes mutacions són causades per agents cancerígens (substàncies que causen càncer) en el nostre entorn o bé són heretades.

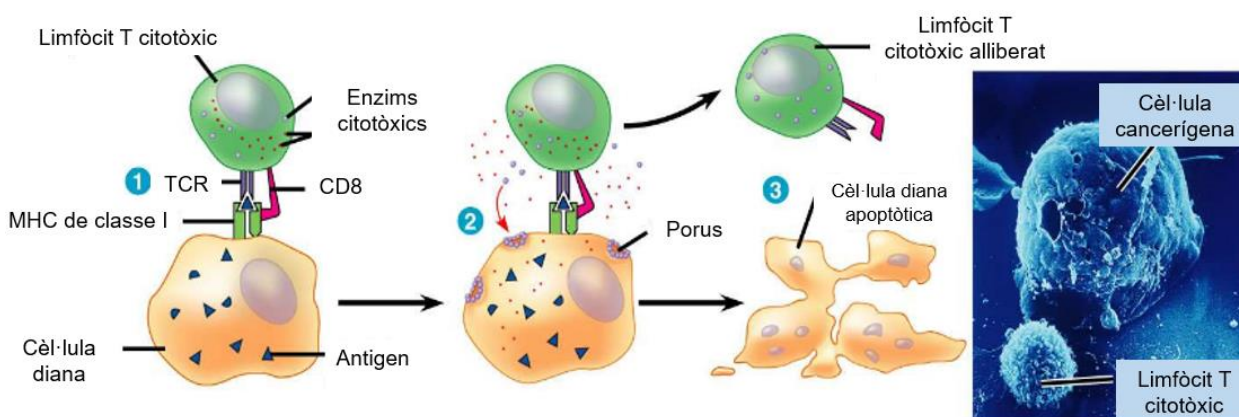
## 2.2. DEFENSES DEL SISTEMA IMMUNITARI DAVANT DEL CÀNCER

Les cèl·lules canceroses es comporten diferent i sovint produeixen proteïnes alterades no produïdes per cèl·lules sanes. Són aquestes proteïnes, anomenades antígens tumorals, sobre les quals actua el sistema immunitari. Tan aviat com són detectats, s'inicia una resposta immunitària contra aquests.

En primer lloc, s'activa la resposta innata, la qual és ràpida i genèrica. En aquesta fase, les cèl·lules fagocítiques o cèl·lules presentadores d'antígens (CPA) fagociten les cèl·lules tumorals per destruir-les. Algunes d'aquestes presenten els antígens tumorals a la superfície, permetent que els limfòcits T els puguin reconèixer.

Tan aviat com es presentin els antígens als limfòcits T es posa en funcionament la resposta adquirida, més eficaç i més específica. Per una banda, els limfòcits T col·laboradors ( $T_h$ ) secreten interleucines que activaran els limfòcits B i els limfòcits T citotòxics.

Els limfòcits T citotòxics ( $T_c$ ) destrueixen les cèl·lules canceroses mitjançant l'alliberament de citotoxines (com les perforines) que indueixen l'aparició de porus a la membrana de les cèl·lules tumorals i la seva mort per apoptosi. En canvi, Els limfòcits B es diferencien en cèl·lules plasmàtiques, de vida curta, que s'encarreguen de produir anticossos lliures específics i en cèl·lules de memòria, que sobreviuen gran part de la vida de l'individu.



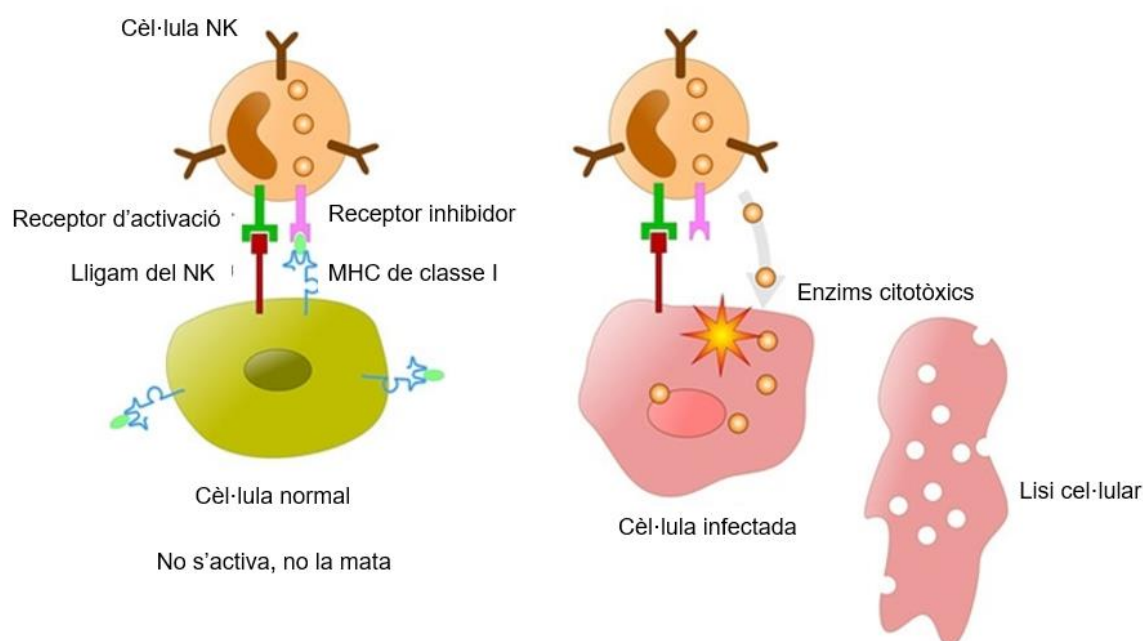
Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

**Figura 2. Mecanisme d'actuació d'un limfòcit T citotòxic davant d'una cèl·lula cancerosa.**

Font: Adaptada de <https://educaciodigital.cat/ioc-batx/moodle/>

Els anticossos són capaços de reconèixer els diferents antígens tumorals, la qual cosa permet que s'adhereixin a totes les cèl·lules tumorals que troben, permetent que altres cèl·lules les puguin trobar i eliminar amb més rapidesa.

A més a més, les cèl·lules NK (de l'anglès *natural killer*), aprofiten el fet que les cèl·lules tumorals produeixen proteïnes anormals i les utilitzen com a marcadors per a la destrucció d'aquestes cèl·lules tumorals.



**Figura 3. Mecanisme d'actuació d'un NK davant d'una cèl·lula cancerosa.**

Font: Adaptada de [https://www.news-medical.net/life-sciences/Missing-Self-Hypothesis-for-Natural-Killer-Cells-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Missing-Self-Hypothesis-for-Natural-Killer-Cells-(Spanish).aspx)

### 2.3. MECANISMES D'ESCAPAMENT DE LES CÈL·LULES CANCEROSSES

Les cèl·lules canceroses han desenvolupat diversos mecanismes per tal d'escapar a la resposta immunitària dels organismes.

#### **Absència d'antígens**

Les cèl·lules cancerígenes presenten la capacitat de modular la presència dels antígens davant la presència dels anticossos, amb la qual cosa no són reconegudes com a estranyes.

#### **MHC (Molècules d'histocompatibilitat)**

Les molècules MHC es troben a les cèl·lules de tots els vertebrats i serveixen per ajudar al sistema immunitari a diferenciar entre el propi i l'aliè. Les cèl·lules canceroses tenen molt baixa quantitat de molècules MHC a la membrana fet que fa que el limfòcits T citotòxics no les puguin reconèixer de forma adequada.

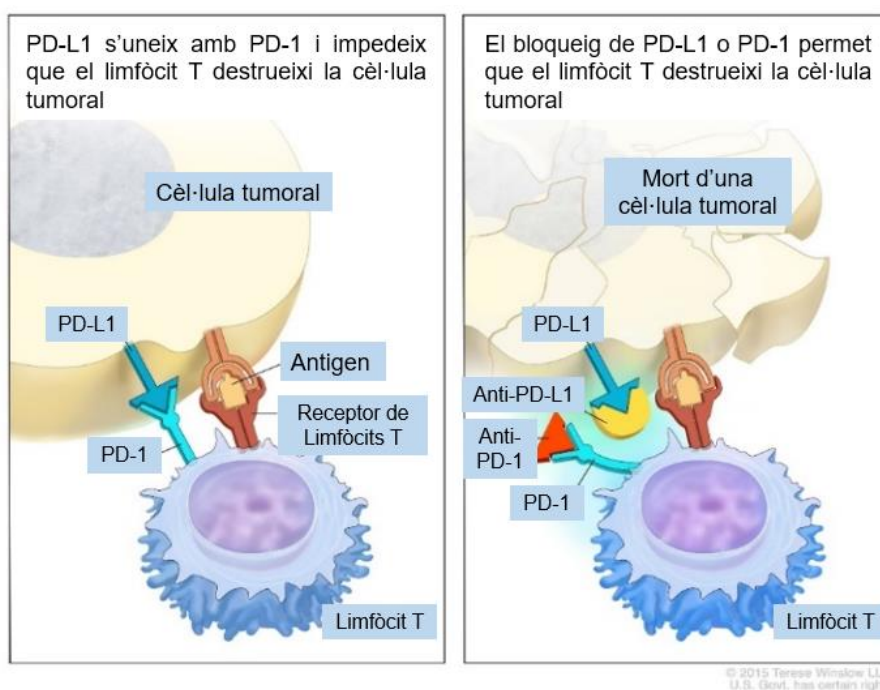
### Presència de molècules co-inhibidores com PD-L1

El receptor PD-1 i els seus lligams PD-L1/PD-L2, formen part de la família de proteïnes de control immunològic que permeten modular la resposta dels limfòcits T i evitar una inflamació autoimmunitària crònica.

Quan els limfòcits T reconeixen un antigen s'activen per eliminar-lo. En acabar d'actuar, existeix una senyal de parada que assegura que no es produeixi una sobreactuació dels limfòcits regulada per l'acció del PD-1, anomenat receptor de mort programada.

Els receptors d'inhibició com el PD-1 que es troben a la superfície de cèl·lules T són una forma d'activació dels limfòcits T. Després de la seva activació, aquests limfòcits augmenten l'expressió del receptor PD-1 que els permetrà rebre la senyal de desactivació, produïda per la unió d'aquest receptor al seu lligam PD-L1 o PD-L2 que normalment es troben a la superfície de cèl·lules dendrítiques o macròfags. Això provocarà la reducció de la producció de citocines i la supressió de la proliferació de les cèl·lules T.

Amb la finalitat de bloquejar el seu reconeixement, molts tumors han integrat aquest mecanisme. Usant l'expressió de les proteïnes PD-L1 i PD-L2 a la seva superfície aconseguen escapar del sistema immunitari i segueixen proliferant. Per tant representa un mecanisme de resistència immunològica adaptativa.



**Figura 4. Mecanisme d'escapament d'una cèl·lula cancerosa per unió del receptor PD-1.**

Font: Adaptada de

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/inhibidor-de-puntos-de-control-inmunitario>



El que pretén la immunoteràpia contra el càncer és superar la capacitat de les cèl·lules tumorals per resistir a la resposta immunològica, mitjançant l'estimulació del propi sistema immunològic. S'han desenvolupat anticossos monoclonals enfront el PD-1 i el PD-L1 (coneguts com inhibidors de punts de control immunològic) capaços de bloquejar la unió entre aquests i a més capaços d'estimular la resposta immune davant les cèl·lules tumorals.

## 2.4. TRACTAMENTS CONTRA EL CÀNCER

Gràcies a tots els avenços que hi ha hagut en aquest camp de recerca, avui en dia el càncer es pot combatre de varies maneres. Hi ha diferents tractaments, tots ells necessaris, ja que en ocasions s'ha d'utilitzar més d'un tipus de tractament en un pacient en funció del tipus i de l'etapa del càncer. Els tractaments convencionals del càncer són la cirurgia, la quimioteràpia i la radioteràpia.

### Cirurgia

La cirurgia proporciona la possibilitat d'extirpar el tumor sòlid, o bé, extirpar alguna part del cos que es vegi afectada pel càncer. Per exemple, patint un càncer de mama es pot extirpar un pit. En canvi quan parlem d'un càncer que afecta la sang, no es pot plantejar la possibilitat de cirurgia ja que no es forma cap tumor que pugui ser extret.



**Figura 5. Extirpació.**

Font: <https://www.contraelcancer.es/es>

### Quimioteràpia

La quimioteràpia són un conjunt de fàrmacs que s'utilitzen per combatre les cèl·lules cancerígenes o per frenar el seu creixement impedit que es segueixin reproduint. Aquests, es poden administrar o bé per via intravenosa (injecció en una vena) o bé mitjançant píndoles per via oral.



**Figura 6. Quimioteràpia.**

Font: <https://torax.org/>

### Radioteràpia

La radioteràpia s'utilitza per destruir o reduir el creixement de les cèl·lules cancerígenes mitjançant unes dosis altes de radiació. Es pot usar sola o juntament amb cirurgia o quimioteràpia.



**Figura 7. Radioteràpia.**

Font: <https://www.contraelcancer.es/es>

El principal problema d'aquests tractaments és que no només ataquen a les cèl·lules canceroses sinó que també afecten a les cèl·lules sanes amb un elevat índex de proliferació. És per això que, malgrat que aquestes teràpies han permès augmentar l'esperança de vida dels pacients amb càncer, cada vegada s'aposta més per teràpies que siguin més específiques, és a dir, que ataquin de manera específica a les cèl·lules canceroses del pacient sense danyar les seves cèl·lules sanes. És el cas, per exemple, de la teràpia dirigida així com de la immunoteràpia.

## 2.5. IMMUNOTERÀPIA CONTRA EL CÀNCER

La immunoteràpia és un tipus de tractament contra el càncer que estimula les defenses naturals del cos per tal de combatre el càncer amb més rigor i més eficàcia. Utilitza substàncies produïdes per l'organisme o fabricades en un laboratori per a millorar el funcionament del sistema immunològic del pacient i destruir les cèl·lules cancerígenes.

Hi ha diversos tipus d'immunoteràpia:

### **Inhibidors de punts de control immunitaris**

Retiren els frens del sistema immunològic, cosa que ajuda el sistema immunològic a identificar i a atacar les cèl·lules canceroses. És el cas del tractament d'anti-PD1, el qual permet bloquejar la unió entre el receptor PD-1 i els seus lligams PD-L1/PD-L2.

### **Teràpia de limfòcits T amb receptors quimèrics d'antígens (CAR-T)**

S'obtenen alguns limfòcits T del pacient i es modifiquen genèticament per la mescla amb un tipus de virus que fa que els limfòcits T expressin un receptor d'antígens quimèric (CAR) que reconeix els antígens de les cèl·lules tumorals. Aleshores els limfòcits CAR-T es retornen al pacient perquè puguin reconèixer el càncer gràcies al receptor CAR i puguin eliminar-lo.

### **Citocines proinflamatòries**

Utilitza citocines proinflamatòries per estimular les cèl·lules immunitàries a atacar el càncer.

### **Vacunes contra el càncer**

Són substàncies que s'injecten al cos per iniciar una resposta immunitària. Per un general, es pensa que s'administren vacunes a persones sanes per ajudar a prevenir infeccions; però el cert és que algunes vacunes poden ajudar a prevenir o a tractar el càncer.

### **Anticossos monoclonals**

Són proteïnes del sistema immune fabricades artificialment al laboratori. Poden ser dissenyades per atacar una part molt específica d'una cèl·lula cancerosa.

## **Virus oncològics**

S'usen virus que han estat modificats en un laboratori per infectar i eliminar unes determinades cèl·lules tumorals.

## 2.6. MELANOMA

El melanoma cutani és un tumor maligne que es genera als melanòcits de la pell. Els melanòcits són unes cèl·lules especialitzades que es troben en la membrana basal de l'epidermis i s'encarreguen de produir la melanina, un pigment que es troba a la pell, ulls i cabell, la qual té per funció bloquejar els rajos UV solars amb la fi d'evitar que danyin el DNA cel·lular. Una gran part de melanomes s'originen als melanòcits de la pell i per aquest motiu es coneixen com a melanomes cutanis. Existeixen, però, altres tipus de melanoma com el melanoma ocular o el melanoma de mucoses.

### **Incidència, epidemiologia i agents de risc**

La incidència i mortalitat del melanoma han anat creixent de forma successiva durant les últimes dècades. A Espanya, la incidència és de 9,7 malalts per cada 100.000 persones. D'acord amb la Societat Espanyola d'Oncologia, el melanoma il·lustra tan sols el 4% de tots els càncers de pell malignes. Tot i així, és el causant del 80% de morts per aquests tipus de càncer. A diferència d'altres tipus de càncers de pell, el melanoma és un tumor amb una clara tendència a produir metàstasis per via limfàtica o hemàtica, de vegades precoçment.

Per a pacients amb un melanoma localitzat, el pronòstic sol ser bo després d'una escissió quirúrgica del tumor. Lamentablement, davant les teràpies actuals el melanoma metastàtic és molt resistent. Després de la cirurgia, els pacients d'alt risc tenen taxes de recaiguda del 50-80%.

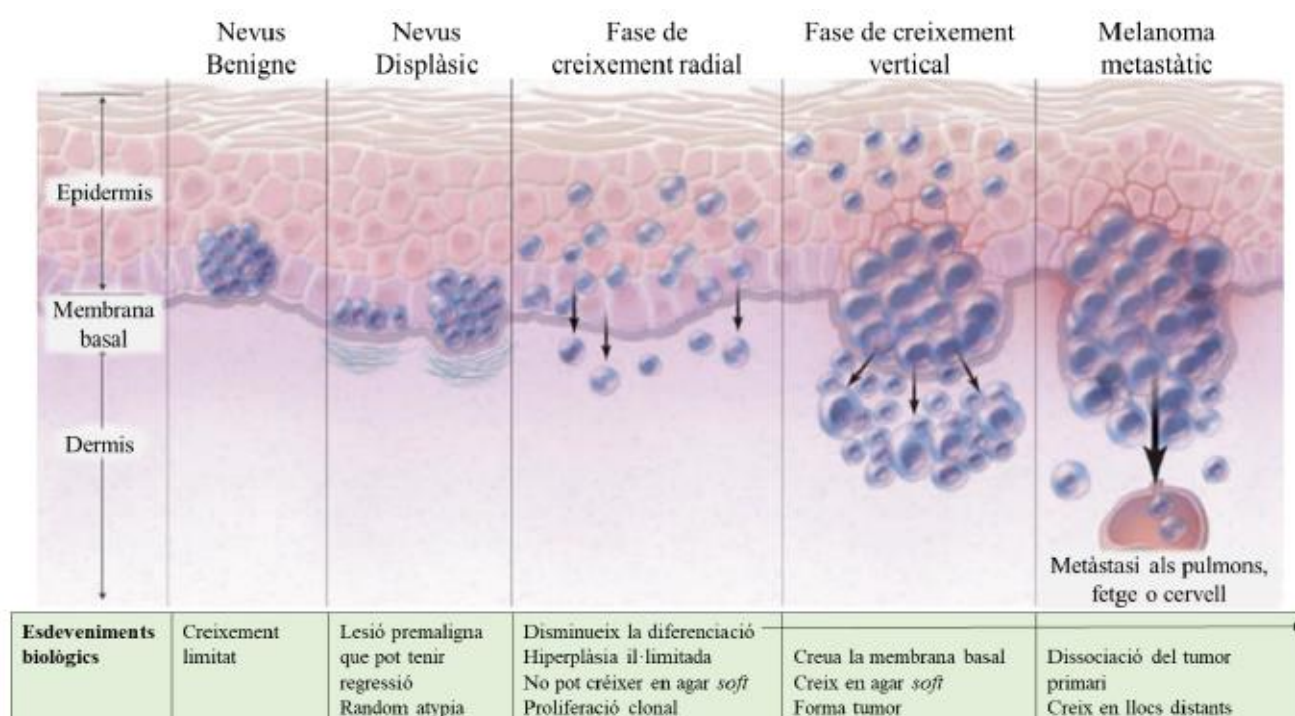
Els agents de risc del melanoma inclouen tant factors extrínsecs (factors ambientals o d'exposició) com factors intrínsecs (factors de genètica i de fenotip). Indicis epidemiològics suggereixen que l'exposició a radiacions UV així com la sensibilitat de l'individu a aquesta radiació són factors de risc del càncer de pell. A més a més, el sistema immunitari pot jugar un paper important en la seva patogènesi. De fet, els pacients immunodeprimits tenen un elevat risc de desenvolupar càncer de pell.

Es tracta, així doncs, d'un tipus de càncer que afecta eminentment a gent jove i de mitjana edat, que metastatitza amb facilitat i, a més a més, és altament resistent als tractaments anticancerosos convencionals.

### Progressió i pronòstic

Un cop generat el melanoma, abans d'arribar a fer metàstasi aquest passa per diferents etapes tal i com es mostra en la figura 8. La American Joint Cancer Comission utilitza un sistema de progressió del melanoma anomenat sistema TNM (de l'anglès, *Tumor-Node-Metastasis*). Es basa en la utilització de les següents dades clíniques i histològiques:

- T. Característiques del tumor: gruix, presència o no d'ulceració\*, nombre de mitosis per mm<sup>2</sup>.
- N. Presència de ganglis regionals limfàtics afectats.
- M. Presència o no de metàstasi a distància i nivells de LDH (lactat deshidrogenasa\*) en sèrum.



**Figura 8. Progressió dels esdeveniments biològics del melanoma cutani.**

Font: Estudis de la Resposta Immunitària en els contextos d'Autoimmunitat i Immunitat Tumoral: models de Diabetis Tipus 1 i Melanoma Cutani

\***Ulceració:** solució de continuïtat amb pèrdua de substància deguda a un procés necròtic, d'escassa o nul·la tendència a la cicatrització.

\***Lactat deshidrogenasa:** enzim que intervé en reaccions metabòliques que condueixen a l'obtenció d'energia.

Per tant, el melanoma es pot classificar en diversos estadis clínics en funció de la seva malignitat:

- Estadi 0. Melanoma *in situ*, sense metàstasis regionals ni distants.
- Estadi I. Els tumors poden ser de fins a 1 mm, amb o sense ulceració, o bé d'entre 1 i 2 mm sense ulcerar. Els pacients no presenten metàstasis regionals ni distants.
- Estadi II. Els tumors són melanomes ulcerats d'entre 1 i 2 mm; d'entre 2 i 4 mm, amb o sense ulceració; o bé, majors de 4 mm però sense ulcerar. Els pacients no presenten metàstasis regionals ni distants.
- Estadi III. Hi ha presència de metàstasis regionals però no distants. El tumor pot ser de qualsevol mida, amb o sense ulceració.
- Estadi IV. Es caracteritza per la presència de metàstasis distants, ja sigui en la pell, pulmons, sistema nerviós central, etc. Els tumors poden ser de qualsevol mida, amb o sense ulceració.

### **Tractament**

El tractament del melanoma cutani varia en funció de l'estadi en el que es troba el tumor, tal i com es mostra en la taula 1.

<b>Estadi segons el criteri TNM</b>	<b>Tractament estàndard</b>
Melanoma d'estadi 0	Resecció quirúrgica
Melanoma d'estadi I	Resecció quirúrgica, amb o sense tractament ganglionar
Melanoma d'estadi II	Resecció quirúrgica, amb o sense tractament ganglionar
Melanoma d'estadi III	Resecció quirúrgica, amb o sense tractament ganglionar
Melanoma d'estadi IV	Teràpia intralesional Immunoteràpia Inhibidors de transducció de senyal Quimioteràpia Teràpia local pal·liativa

**Taula 1. Tractaments estàndards per a cada estadi de melanoma.**

El mètode d'elecció principal per a tractar el melanoma localitzat segueix sent l'excisió quirúrgica. Quan aquest no s'ha disseminat més enllà del lloc on es va formar, els melanomes tenen un elevat percentatge de curació.

En els últims anys, després de l'extirpació completa del melanoma cutani s'està expandint l'ús d'adjuvants\* en pacients amb alt risc de reiteració. La finalitat d'aquest tractament és la d'evitar o retardar una reincidència.

---

\***Adjuvant:** Dit d'un medicament que augmenta o modifica l'acció d'un altre medicament.

Un cop el melanoma s'ha disseminat a llocs distants, la taxa de curació és ben baixa i el nombre d'opcions per al tractament incrementa. En els melanomes més avançats, per exemple, s'utilitza una combinació d'estratègies terapèutiques que inclouen l'ús de diversos tipus d'immunoteràpies. Es tracta d'una malaltia extremament resistent als tractaments anticancerosos convencionals, com la quimioteràpia o la radioteràpia.

El percentatge de malalts que desenvoluparan metàstasi depèn, en gran mesura, de l'espessor (gruix o profunditat) del tumor que, al seu temps, depèn del temps d'evolució de la lesió. És per això que una detecció primerenca i un tractament precoç són essencials, ja que en fases inicials s'assoleixen taxes de curació del 90%.

## 2.7. LÍNIA DE MELANOMA B16-F10 EN LA SOCA DE RATOLÍ C57BL/6

La major part de cèl·lules de melanoma expressen diversos MDAs (de l'anglès, *Melanocyte Differentiation Antigen*), la qual cosa les converteix en objectiu atractiu per a les vacunes contra aquest tipus de càncers. Els MDAs són proteïnes normals no mutades que s'expressen exclusivament en melanomes i melanòcits sans en diferents etapes de diferenciació. Des d'una visió immunològica, els MDAs són proteïnes pròpies, a les quals pot existir una tolerància central i/o perifèrica, que pot dificultar l'estímul de respostes immunitàries terapèutiques potents. No obstant, en una investigació es demostra que sembla que es podria induir un cert grau d'autoreactivitat que, fins i tot, podria afavorir a la supervivència perllongada dels pacients. Aquestes observacions van motivar a recercar, en models murins, l'efecte antitumoral de la inducció de respostes autoimmunitàries.

Existeixen diversos models de melanoma en soques de ratolí comuns, incloent BALB/c i C57BL/6. A nivell experimental, és comú l'ús de cèl·lules de melanoma B16, derivades d'un melanoma espontani en un ratolí C57BL/6. És un model de tumor ben establert i àmpliament usat, en el qual el tractament és complex. Algunes recerques, indiquen que en aquest model es pot induir una resposta immunitària contra els MDAs, resultant en la protecció i/o tractament del melanoma B16. Les cèl·lules B16-F10 s'usen per a estudis *in vivo* per estudiar el creixement local del tumor i el desenvolupament metastàtic espontani mitjançant la seva injecció intradèrmica. Aquesta línia cel·lular també s'utilitza per observar la producció de metàstasis artificials (principalment al pulmó) després de la seva injecció endovenosa.



**Figura 9. Ratolí de soca C57BL/6**

Font: <https://www.selectscience.net/products/c57bl+6-mouse/?prodID=85057>

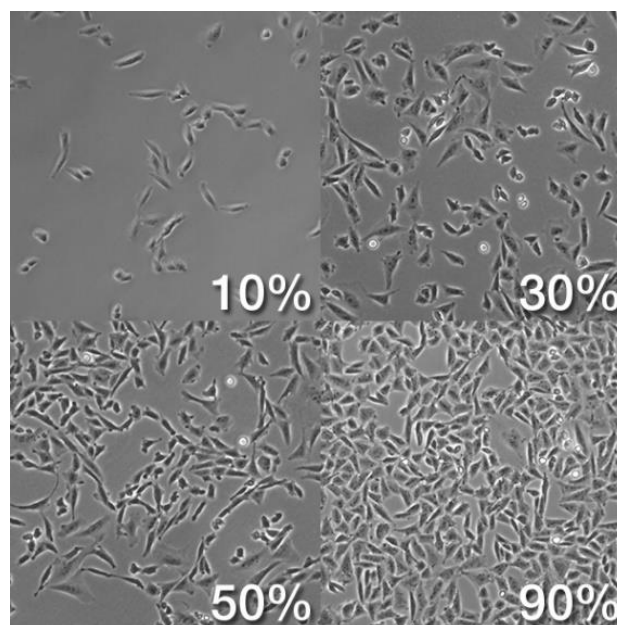


## 2.8. MEDIS DE CULTIU

Els medis de cultiu són substrats que s'empren per a fer créixer i multiplicar organismes vius, especialment cèl·lules.

Les tècniques de recerca de medis de cultiu es basen en la necessitat d'aconseguir la conservació i la reproducció d'un gran nombre de cèl·lules per tal de fer-ne un estudi. Hi ha un gran nombre de medis de cultiu i tots aquests es poden classificar segons la seva consistència, la seva utilització, la seva composició o el seu origen.

Les cèl·lules dels medis de cultiu, es reproduïxen i van confluint entre elles en major quantitat a mesura que passa el temps. No obstant, no hi ha un temps exacte per determinar quan s'aconsegueixen el major nombre de cèl·lules, sinó que es té en compte la seva confluència (figura 10).



**Figura 10. Comparació de la confluència de cèl·lules en un medi de cultiu.**

Font:

<https://biology.stackexchange.com/questions/29857/origin-of-term-confluency-in-cell-culture>

## 2.9. CITOMETRIA DE FLUX

La Citometria de Flux és una tècnica que permet analitzar les característiques físiques i químiques de partícules (generalment cèl·lules) suspeses en un fluid fent-les passar per davant d'un làser alineades d'una en una. Els components cel·lulars que han sigut marcats amb fluorocroms amb anterioritat són excitats pel làser, emetent així llum en diferents longituds d'ona. Aquests senyals es corresponen a diferents paràmetres cel·lulars que són arreplegades per diferents detectors. Aquests paràmetres són: grandària cel·lular, complexitat cel·lular i fluorescència.

La citometria de flux és doncs un sistema ràpid, utilitzat per analitzar milers de cèl·lules per minut, i els seus paràmetres.

### **Aplicacions**

La citometria de flux s'usa per:

- Assajos de viabilitat cel·lular
- Fenotipatge cel·lular
- Anàlisi de cicle cel·lular
- Apoptosi i necrosi
- Detecció de biomarcadors

# OBJECTIUS, PROBLEMES I HIPÒTESIS



### 3. OBJECTIUS, PROBLEMES I HIPÒTESIS

El melanoma en fase avançada és molt difícil de curar. Actualment s'estan fent diversos estudis per tal de trobar una solució eficient per aquest handicap. L'equip de científics de la Unitat d'Immunologia i Immunopatologia de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida), on s'han realitzat les pràctiques, han descobert que uns pèptids anomenats B i B.1 són capaços d'estimular el sistema immune i de matar cèl·lules tumorals i, per tant, són bons candidats per tractar melanoma avançat. Així doncs, els objectius, el problema i la hipòtesi de la meua recerca són els següents:

#### **Objectius**

1. Estudiar la capacitat citotòxica dels pèptids B i B.1 en un cultiu cel·lular de cèl·lules de melanoma B16-F10.
2. Demostrar que la combinació dels pèptids B i B.1 és útil per a tractar el melanoma murí (de ratolí) B16-F10.

#### **Problemes**

- Influeix l'administració de pèptids B i B.1 en un cultiu de cèl·lules de melanoma de ratolí B16-F10?
- Influeix un tractament amb la vacuna de pèptids B i B.1 en el desenvolupament de melanoma de ratolí?

#### **Hipòtesis**

- Potser els cultius cel·lulars als que se'ls afegixen els pèptids B i B.1 tenen un nombre de cèl·lules mortes major.
- Potser els ratolins als que se'ls administra la vacuna amb els pèptids B i B.1 tenen un desenvolupament del tumor més lent.

# MARC PRÀCTIC

## 4. MARC PRÀCTIC

### 4.1. MATERIALS

Tots els materials que es van usar per realitzar la part pràctica d'aquest treball són del laboratori de la Unitat d'Immunologia i Immunopatologia de la IRB Lleida i la Universitat de Lleida:

#### 4.1.1. Estris de laboratori

- Gradetes
- Tubs de microcentrífuga
- Pipetes automàtiques
- Puntes de pipetes automàtiques
- Controladors de pipetes
- Puntes de controlador de pipetes
- Tubs d'assaig
- Tubs de centrifuga
- Flascons de cultiu
- Plaques de pouets
- Criotubs
- Xeringues

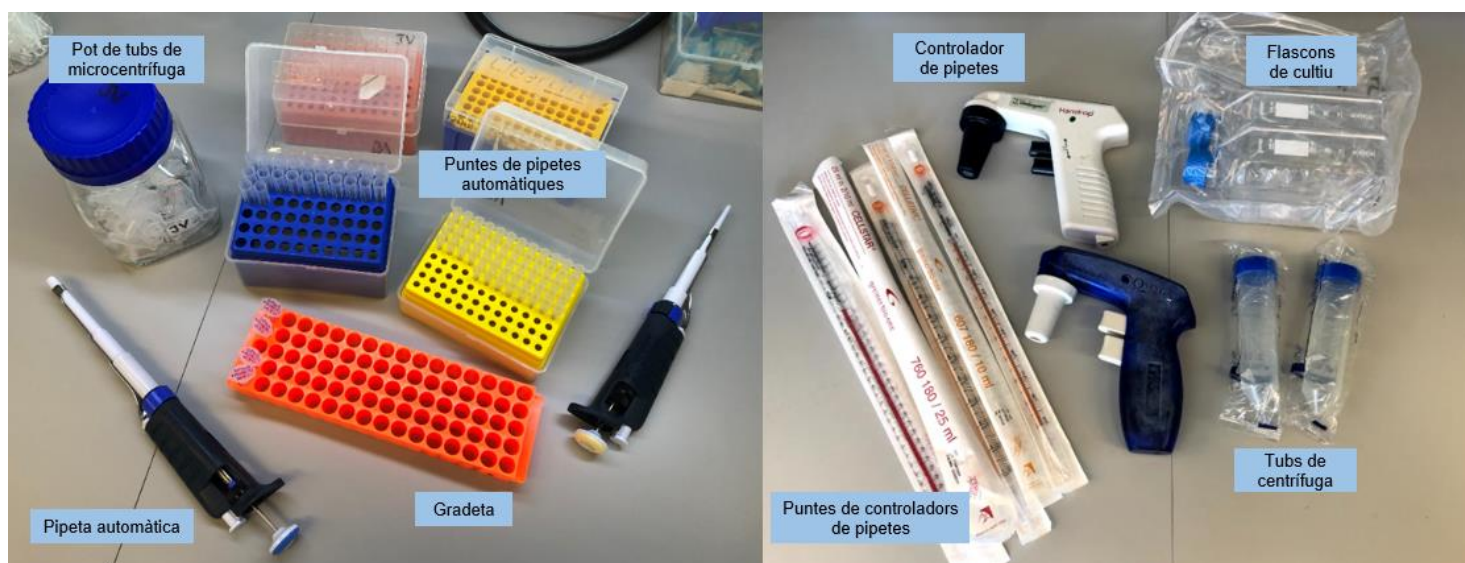


Figura 11. Estris de laboratori.

Font: Pròpia

- Càmera de Neubauer
- Cobreobjectes



**Figura 12. Càmera de Neubauer.**

Font: Pròpia

- Indumentària per entrar a l'estabulari: un mono estèril, peücs, guants, reixeta pel cabell i un burca de laboratori.



**Figura 13. Roba d'estabulari.**

Font: Pròpia

#### 4.1.2. Aparells

- Centrifugadora: màquina que posa en rotació una mostra per accelerar la sedimentació dels seus components segons la seva densitat.
  - Marca: *Thermofisher Scientific*
  - Model: *Heraeus Fresco 17*
  
- Congeladors (-80 °C): equip de refrigeració que inclou un compartiment aïllat tèrmicament y un sistema frigorífic.
  - Marca: *Panasonic*
  
- Incubadores: aparell destinat a mantenir les cèl·lules a una temperatura de calor constant favorable per el seu desenvolupament.
  - Marca: *Thermofisher*
  - Model: 4121
  
- Banys tèrmics: equip termostàtic que serveix per transferir calor indirectament.
  - Marca: *Lauda*
  - Model: *Alpha*
  
- Microscopis: aparell basat en unes lents òptiques que s'usa per observar objectes que no són visibles per l'ull humà.
  - Marca: *Olympus*
  - Model: *CKX41*



**Figura 14. Centrifugadora de tubs de microcentrífuga.**

Font: Pròpia



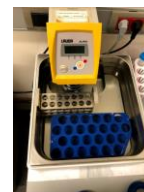
**Figura 15. Congeladors.**

Font: Pròpia



**Figura 16. Incubadora.**

Font: Pròpia



**Figura 17. Bany tèrmic.**

Font: Pròpia



**Figura 18. Microscopi.**

Font: Pròpia

- Campana de cultius: instrument que s'utilitza per tenir ambients lliures de contaminació, proporcionant un flux d'aire descontaminat.
  - Marca: *Telstar*
  - Model: *AV-100*



**Figura 19. Campana de cultius.**

Font: Pròpia

- Neveres i congeladors (-20 °C): aparells que permeten mantenir una temperatura de conservació interna definida per emmagatzemar i protegir correctament el seu contingut.
  - Marca: *Electrolux*



**Figura 20. Neveres.**

Font: Pròpia

- Citòmetre: aparell que permet detectar de manera simultània múltiples característiques físiques de cèl·lules.
  - Marca: BD (*Becton Dickinson*)
  - Model: *Facs Canto II*



**Figura 21. Citòmetre.**

Font: Pròpia

#### 4.1.3. Medis de cultiu

- RPMI (de l'anglès *Roswell Park Memorial Institute medium*)
  - Tipus: d'enriquiment.
  - Funció: proporcionar nutrients pel creixement del cultiu cel·lular.
  - Ús: general amb una gran varietat d'aplicacions per cèl·lules de mamífers.
- MCC o Medi de Cultiu Complet
  - Tipus: universal per a cultius cel·lulars.
  - Composició: RPMI complementat amb FBS, L-glutamina, Penicilina-Estreptavidina, Piruvat de Sodi i beta-mercaptoetanol.
  - Funció: proporcionar nutrients pel creixement del cultiu cel·lular. A més, conté FBS (*Fetal Bovine Serum*) substància que inactiva una proteïna que es diu Tripsina, encarregada de desenganxar les cèl·lules del flascó de cultiu.
  - Ús: general amb una gran varietat d'aplicacions per cèl·lules de mamífers.

#### 4.1.4. Solucions

- HBSS o solució salina balancejada de Hanks (de l'anglès *Hanks Balanced Salt Solution*)
  - Solució que proveeix un ambient que ajuda a les cèl·lules *in vitro* a mantenir la integritat estructural i fisiològica.
- PBS o solució salina fosfatada (de l'anglès *Phosphate-buffered saline*)
  - Solució salina equilibrada usada per diverses aplicacions de cultiu cel·lular, como ara el rentat de cèl·lules.
- ABB o tampó d'unió d'Annexina (de l'anglès *Annexin Binding Buffer*)
  - Producte que facilita la unió entre l'Annexina i el IP pel seu ús en assajos d'apoptosis.
- H<sub>2</sub>O destil·lada
- Desinfectant

#### 4.1.5. Reactius

- DMSO o dimetil sulfòxid (de l'anglès *Dimethyl sulfoxide*)
  - Dissolvent orgànic altament polar y miscible en aigua.
- Annexina
  - Proteïna que identifica la presència de cèl·lules apoptòtiques juntament amb el IP.
- IP o iodur de propidi
  - Colorant comunament utilitzat juntament amb l'Annexina per als assajos d'apoptosi.
- Tripsina-EDTA
  - Enzim peptidasa que trenca els enllaços de les proteïnes mitjançant la hidròlisi per formar pèptids o aminoàcids més petits.
- Blau de tripà (en anglès *Trypan Blue*)
  - Colorant que permet diferenciar cèl·lules vives de cèl·lules mortes.

#### 4.1.6. Material viu

- Línia cel·lular B16-F10
  - Origen biològic: Pell de ratolí de la soca C57BL/6 (*Mouse skin*)
  - Descripció: Melanoma de ratolí (*Mouse melanoma, producing melanina*)
  - Mode de creixement: Adherent
- Ratolins de soca C57BL/6 (*Mus musculus*)
  - Sistema immunitari competent (funcionament adequat).

#### 4.1.7. Tractaments administrats als ratolins

El tractament consisteix en administrar 4 pèptids d'una mida semblant, entre aproximadament 12 i 15 aminoàcids. Els pèptids que contenen el número 1 (A.1 i B.1) presenten una cua de 8 arginines al final de la seva composició que els diferencien de les seves respectives parelles.

- Pèptids control: A i A.1, ja que s'espera que sigui innocu per les cèl·lules
- Pèptids d'interès: B i B.1, ja que s'espera que tinguin efecte sobre les cèl·lules.

A més a més, alguns ratolins s'han tractat amb el anticòs monoclonal anti-PD1, la immunoteràpia estàndard per a pacients amb melanoma avançat. És un tractament que serveix per bloquejar un mecanisme que tenen les cèl·lules tumorals per desactivar la resposta immunològica.



## 4.2.METODOLOGIA

Aquesta part pràctica forma part d'una investigació de la Unitat d'Immunologia i Immunopatologia de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida) i la Universitat de Lleida. La seva recerca consisteix en l'estudi de l'efectivitat d'uns pèptids per fer front al melanoma murí, un tipus de càncer. Per motius de patents, en aquest treball de recerca no es citen els noms d'aquests pèptids i tampoc la seva seqüència exacta. Estudis realitzats anteriorment, suggereixen que el que aconseguen amb aquests pèptids és una resposta d'immunitat cel·lular contra aquest càncer.

El tipus d'immunoteràpia d'aquesta recerca és terapèutica. La immunoteràpia terapèutica pretén curar el ratolí un cop ja té el tumor.

La part pràctica del meu TDR va tenir lloc a les instal·lacions de la IRB Lleida. Durant aquesta pràctica vaig estar acompanyada per la meua tutora d'acompanyament de la Universitat de Lleida. Els experiments que formen part d'aquesta recerca es van realitzar durant el mes de Juliol del 2021.

L'activitat pràctica consistia en estudiar quines respostes obteníem per part de les cèl·lules del melanoma davant dels pèptids d'interès (B i B.1). Per a poder estudiar-ho en profunditat, es van realitzar 2 experiments principals.

El primer és un estudi *in vitro* que consistia en observar a través del citòmetre l'estat en què es trobaven les cèl·lules de melanoma després d'haver estat tractades amb els pèptids B i B.1. Es van comparar els resultats de cèl·lules de melanoma tractades amb pèptids i cèl·lules de melanoma no tractades.

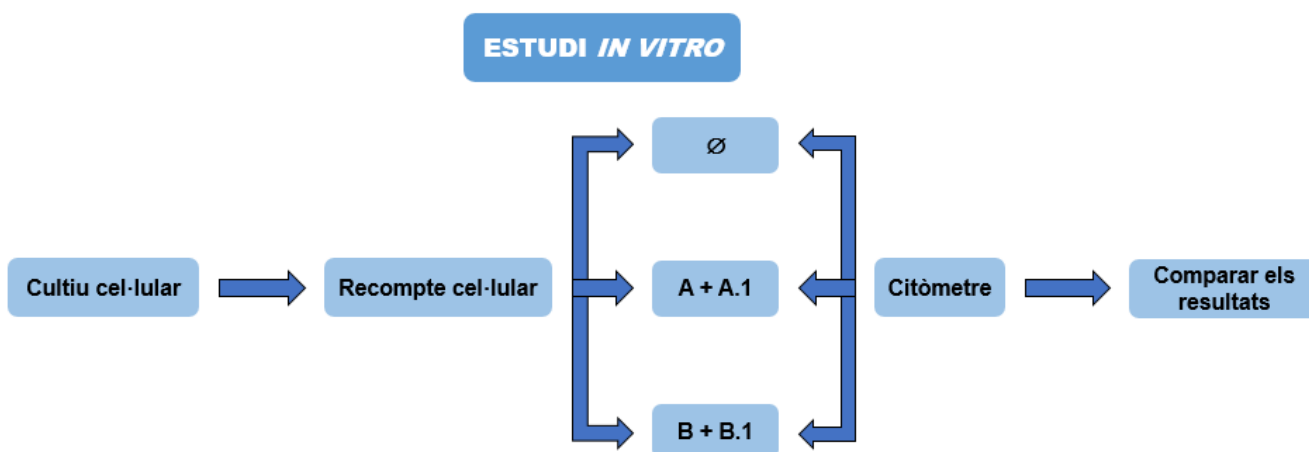
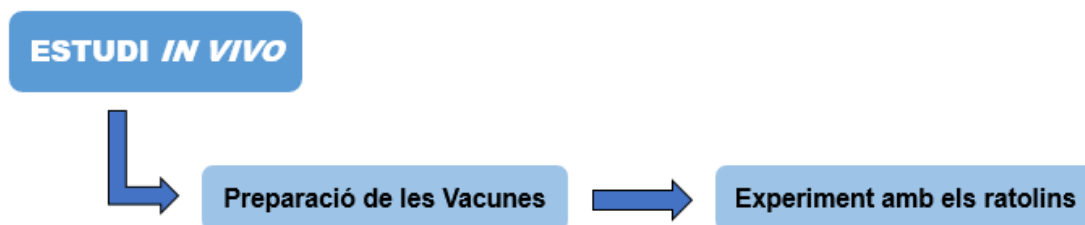


Figura 22. Esquema dels passos seguits a l'experiment in vitro.

Font: Pròpia

El segon estudi era *in vivo*. Els estudis *in vivo* són els que es fan amb animals d'experimentació. En aquest cas, es va treballar amb una soca de ratolí coneguda com C57BL/6.

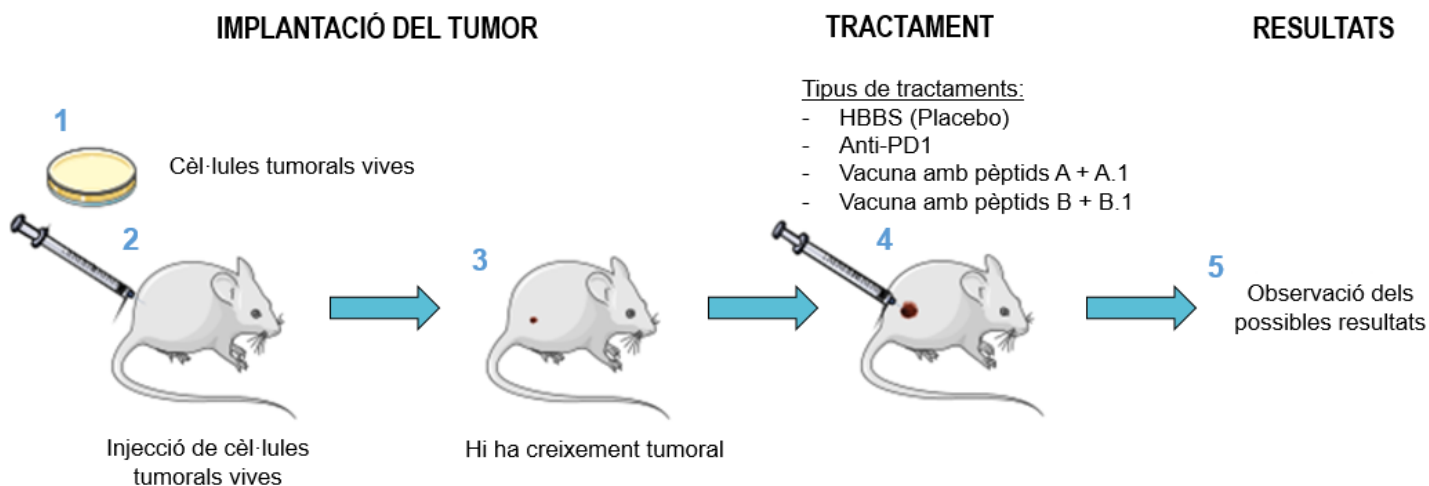
En primer lloc es van preparar les vacunes que s'havien d'administrar als ratolins. Se'n van preparar diverses depenen del tipus de tractament.



**Figura 23. Esquema dels passos seguits a l'experiment in vivo.**

Font: Pròpia

Tal i com es mostra en la figura 24 es va preparar la concentració de cèl·lules de melanoma cutani de ratolí B16-F10 (1) i se'ls va injectar als ratolins (2). Posteriorment se'ls va fer un seguiment de la mida del tumor (3) i quan aquest arribava a la mida desitjada, se'ls administrava diferents tractaments (4) per comparar l'efectivitat dels pèptids B i B.1. amb el tractament que s'està usant avui en dia – que és l'anti-PD1 – per tractar el melanoma (5).



**Figura 24. Esquema dels passos seguits a l'experiment amb els ratolins.**

Font: Pròpia

A continuació s'expliquen detalladament tots els diferents experiments que es van realitzar.

#### 4.2.1. Elaboració d'un cultiu de cèl·lules de melanoma cutani de ratolí B16-F10

Per fer el cultiu cel·lular es van seguir els següents passos:

- Es van agafar cèl·lules de melanoma cutani de ratolí que es mantenien en un tanc de nitrogen líquid dins d'un criotub.
- Ràpidament es va ficar aquest petit recipient en un bany tèrmic de 37 °C amb la finalitat de que es descongelessin les cèl·lules.
- Un cop només quedava una petita bola de gel es van ficar en un tub de centrifuga de 50 ml i s'hi va afegir 30 ml de RPMI. Afegir aquest medi impedeix que les cèl·lules es morin ja que el medi de congelació conté DMSO, que és tòxic per elles.
- Es va centrifugar el tub de centrifuga durant 5 minuts a 600 G i es va descartar el sobrenedant\*.
- En aquest punt, es va repetir exactament igual el procés d'afegir RPMI, centrifugar i extreure el sobrenedant.
- A continuació es van afegir 20 ml de MCC al tub de centrifuga i un cop ben resuspès\*\*, es va ficar en un flascó de cultiu de 75 mm<sup>2</sup>.
- Es van observar a través de microscopi les cèl·lules per comprovar que estaven en bon estat i no hi havia contaminacions.
- Finalment es va incubar a 37 °C amb un 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figura 25. Incubadora on es col·locava el cultiu cel·lular preparat per a que proliferessin les cèl·lules tumorals.**

Font: Pròpia

---

\***Sobrenedant:** resta de medi que no conté cèl·lules.

\*\***Resuspès:** participi del verb resuspendre; acció de mesclar bé les mostres fent així que les cèl·lules quedin repartides per tot el volum.

#### 4.2.2. Recompte de cèl·lules

Amb la finalitat de poder realitzar correctament els experiments s'havia de tenir en compte les concentracions de cèl·lules de totes les mostres. Tanmateix, per tenir coneixement de la quantitat de cèl·lules, era necessari fer un recompte d'aquestes.

En primer lloc es van retirar de la incubadora els flascons de cultiu que contenien les cèl·lules de melanoma cutani de ratolí B16-F10. Tot seguit, es van desenganxar del flascó de cultiu seguint el protocol que es detalla a continuació:

- Es va treure el sobrenedant. S'hi va afegir 20 ml RPMI per tal de fer un rentat. Quan es fa un rentat en flascons de cultiu és important moure una mica el recipient per assegurar-nos que el líquid ha estat en contacte amb totes les cèl·lules. Aquest procediment es va realitzar dues vegades per tal d'eliminar el FBS present en el MCC.
- Es va treure el sobrenedant i després s'hi van afegir 5 ml de tripsina; enzim que trenca els enllaços peptídics de les proteïnes mitjançant la hidròlisi, fet que possibilita que les cèl·lules es desenganxin del flascó de cultiu.
- Es va deixar 5 minuts a la incubadora ja que l'enzim és més actiu a 37 °C que a temperatura ambient. Passat aquest temps es va treure i s'hi van donar un seguit de cops contra la taula per contribuir a que les cèl·lules es desadherissin.
- Seguidament es van afegir 20 ml de MCC per tal de parar l'activitat enzimàtica de la tripsina.
- Es va resuspendre el volum del flascó de cultiu, es va agafar i es va ficar en un tub de centrífuga de 50 ml.



**Figura 26. Moment en que es va afegir MCC al flascó de cultiu.**

Font: Pròpia

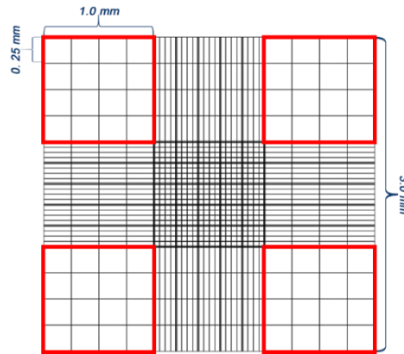
A continuació es va preparar una mostra formada per: 50 µl de cèl·lules, 130 µl de RPMI i 20 µl de trypan blue.

Amb la càmera de Neubauer es va fer el recompte de cèl·lules. En aquest dispositiu es va ficar a damunt un cobreobjectes el qual es va quedar adherit gràcies a unes gotes d'aigua i es va introduir la mostra.



**Figura 27. Càmera de Neubauer.**

Font: Pròpia



**Figura 28. Comptatge de cèl·lules.**

Es compten les cèl·lules que es troben en els quadrants marcats en vermell. Un cop es coneixen el número de cèl·lules que hi ha a cada quadrant es farà una mitjana.

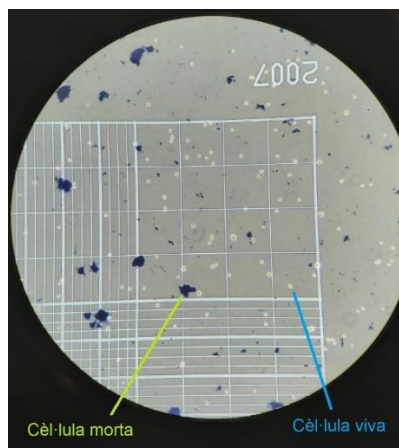
Font: Adaptada de <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>

A partir del número de cèl·lules que hi ha en els nostres quadrants (A,B,C,D), el número total de cèl·lules es calcula aplicant la següent fórmula:

$$N^{\circ} \text{ total de cèl} \cdot \text{lules} = \frac{A + B + C + D}{4} \cdot 4 \cdot 10.000 \cdot \text{Volum final}$$

**Equació 1. Equació per calcular aproximadament el número total de cèl·lules.**

- $\frac{A+B+C+D}{4}$  → Mitjana dels 4 quadrants del recompte cel·lular.
- 4 → Factor de dilució: 50 µl de cèl·lules en un volum de 200 µl => es dilueixen les cèl·lules 4 vegades.
- 10.000 → Factor de la cambra Neubauer: aquest factor és dependent de la cambra de Neubauer, sempre és el mateix.
- Volum final → volum total on es trobaven les cèl·lules resuspeses abans de fer el recompte cel·lular.



**Figura 29. Cèl·lules observades a través d'un microscopi, amb la càmera de Neubauer.**

Font: Pròpia

#### 4.2.3. Experiment *in vitro* amb el citòmetre

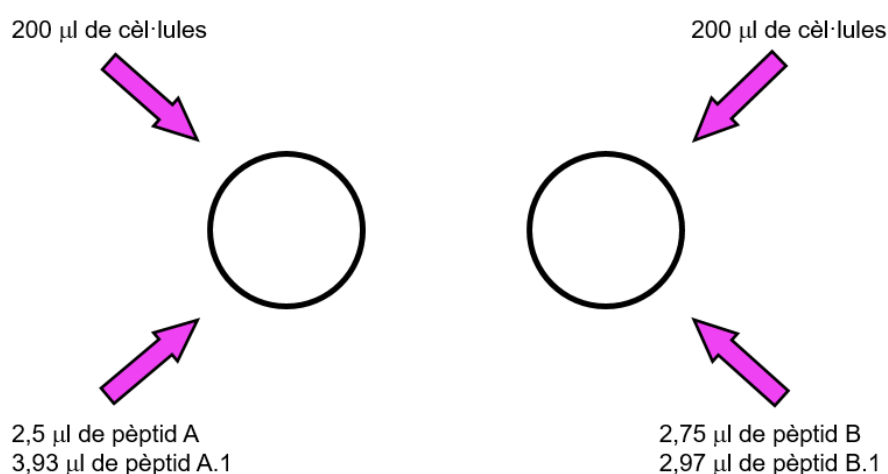
La finalitat d'aquest experiment era comprovar realment si els pèptids d'interès, B i B.1, eren capaços d'induir la mort de les cèl·lules de melanoma B16-F10.

Es van estudiar 3 condicions en cèl·lules de melanoma B16-F10: sense estímul (sense afegir cap pèptid), afegint els pèptids control A i A.1 i afegint els pèptids d'interès B i B.1.

A més es van fer 2 estudis, un després d'una hora d'incubació i un altre al cap de 24 hores d'incubació.

El procés de preparació de les mostres de cèl·lules de melanoma B16-F10 va ser el següent:

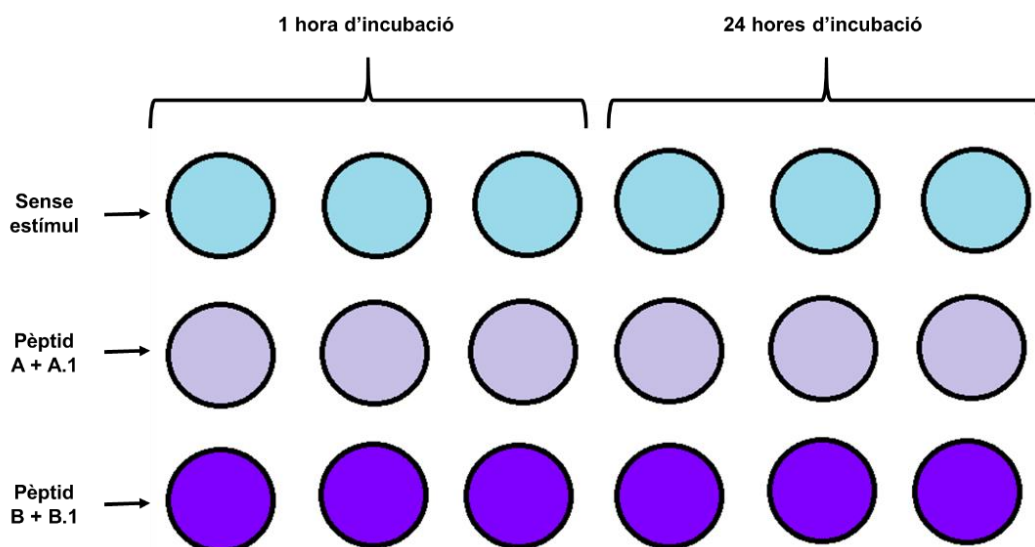
- 1) Preparar un cultiu de cèl·lules de melanoma B16-F10 amb la següent concentració: 1.500.000 cèl·lules/ml.
- 2) Posar en 18 pouets idèntics, a cadascun d'ells, 200  $\mu$ l del cultiu preparat anteriorment.
- 3) Afegir a 6 dels pouets 2,5  $\mu$ l del pèptid A juntament amb 3,93  $\mu$ l del pèptid A.1 per tal de tenir una concentració final de pèptid de 55  $\mu$ M.
- 4) Afegir a 6 dels pouets 2,75  $\mu$ l del pèptid B juntament amb 2,97  $\mu$ l del pèptid B.1 per tal de tenir una concentració final de pèptid de 55  $\mu$ M.
- 5) Als 6 pouets restants no s'afegeix cap pèptid (sense estímul).



**Figura 30. Pouets de 200  $\mu$ l de cèl·lules i de pèptids, segons contingui els pèptids A i A.1 o els pèptids B i B.1.**

Font: Pròpia

- 6) Els 6 pouets de cada grup es van deixar a la incubadora, la meitat (3 pouets) durant 1 hora i l'altra meitat (els altres 3 pouets) durant 24 hores tal i com es mostra en la figura 31.



**Figura 31. Esquema de la distribució dels 18 pouets en funció de la condició i del temps d'incubació.**

Font: Pròpia

A partir d'aquest punt, el procediment era el mateix per a totes les mostres. Cada mostra es va ficar en un tub de microcentrífuga i es va seguir un procés amb cada un d'aquests:

- Primer es va dur a terme un primer rentat amb 500  $\mu$ l de PBS 1x.
- Es va centrifugar durant 5 minuts a 300 G, i després, es va treure el sobrenedant.
- Amb 500  $\mu$ l de PBS 1x es va resuspendre el pellet\* fent així un segon rentat i es va tornar a centrifugar 5 minuts a 300 G.
- Mentre es feia la segona centrifugació, es va preparar la Mastermix\*\*, la composició de la qual es troba en la taula 2.

\***Pellet:** cèl·lules que queden acumulades en una zona del tub amb el qual es centrifuguen.

\*\***Mastermix:** mescla que permet observar els resultats a través del citòmetre tenyint les cèl·lules apoptòtiques.

Components Mastermix
49,5µl Annexin Biding Buffer 1X
0,25µl Annexin V-CF <sub>TM</sub> Blue
0,25µl Iodur de propidi (IP)

Quantitats que s'han d'afegir a cadascun dels tubs de microcentrífuga.

### Taula 2. Components Mastermix.

- Un cop preparada i la centrifugació acabada, es va treure el sobrenedant dels tubs de microcentrífuga i el pellet es va resuspendre amb 49 µl de Mastermix.
- Totes les mostres es va deixar durant 20 minuts en un nevera a 4 °C, tapades perquè no els toques la llum ja que alguns components de la Mastermix són sensibles a la llum i podria variar els resultats.

Un cop passat aquest temps, es van agafar les mostres i es van portar cap al citòmetre per ser estudiades. Com que els volums eren tan petits, es va afegir 50 µl de PBS 1x a cada tub de microcentrífuga.

Ja que el citòmetre està preparat per analitzar el contingut tan sols de tubs d'assaig, el volum dels tubs de microcentrífuga es va ficar en tubs d'assaig. Tot just es va ficar al citòmetre i aquest va començar a analitzar l'estat de les cèl·lules. Es van gravar i guardar tots els resultats de cada mostra.



**Figura 32. Citòmetre.**

Font: Pròpia



#### 4.2.4. Preparació de les vacunes

Per als experiments *in vivo* es van preparar unes vacunes compostes per les cèl·lules B16-F10 mortes i els diferents pèptids. Per a preparar aquestes vacunes es va seguir el següent procediment:

- Es van desenganxar les cèl·lules del flascó de cultius usant tripsina. Es va resuspendre el volum en MCC, es va ficar en un tub de centrífuga i es van contar les cèl·lules amb la càmera de Neubauer.
- Es va centrifugar durant 5 min a 600 G.
- Es va eliminar el sobrenedant i es va resuspendre en HBSS per tenir una concentració de 6.000.000 cèl·lules/ml HBSS en un volum final de 200  $\mu$ l. Per tant, hi havia un total de  $1,2 \cdot 10^6$  cèl·lules.
- Es van afegir les cèl·lules en pouets i s'hi van afegir els pèptids. Les quantitats estaven formades per 200  $\mu$ l de cèl·lules en HBSS i 2,5  $\mu$ l del pèptid A juntament amb 3,93  $\mu$ l del pèptid A.1 per tal de tenir una concentració final de pèptid de 55  $\mu$ M.
- Es va incubar a 37 °C durant 20 hores.
- Finalment, es van agafar totes les mostres i es van passar a un tub de microcentrífuga per tal de congelar-ho a -80 °C, com a mínim durant 24 hores amb la finalitat de provocar la mort de totes les cèl·lules i evitar així la formació d'un nou tumor en el ratolí.
- Per comprovar que totes les cèl·lules estaven mortes i que no es generaria tumor en lloc d'actuar com a vacuna, es van passar 20  $\mu$ l del volum pel citòmetre usant la tècnica de tinció d'Annexina i de IP.

Aquest procediment es va repetir canviant els pèptids. Enlloc d'afegir els citats anteriorment, s'hi van afegir 2,75  $\mu$ l del pèptid B amb 2,97  $\mu$ l de pèptid B.1 per tal de tenir una concentració final de pèptid de 55  $\mu$ M.

La resta de volum preparat, es va usar com a injecció per als ratolins, injectant 50  $\mu$ l de vacuna a cada ratolí.

#### 4.2.5. Experiment *in vivo* amb ratolins

Per tal d'estudiar quina efectivitat tenen els pèptids d'interès B i B.1, es van realitzar una sèrie de procediments durant 18 dies en 13 ratolins C57BL/6 amb tumors preestablerts (figura 32).

En primer lloc, es van injectar intradèrmicament el challenge; 50 µl de HBSS que contenia aproximadament 300.000 cèl·lules B16-F10 en els ratolins i es va fer un seguiment del tumors fins que aquests assolissin una mida d'entre 25 i 50 mm<sup>2</sup>. Un cop assolida aquesta mida, es començava el tractament.

D'una banda, s'administraven vacunes mitjançant injeccions intradèrmiques un cop per setmana. D'altra banda, s'administrava anti-PD1 dos cops per setmana intraperitonealment. Els ratolins es van tractar segons els grups descrits en la taula 3.

Tumor implantat	Tractament	Nº ratolins	Via d'administració	Nº d'injeccions per setmana
B16-F10	HBSS 1X (Placebo*)	2	Intradèrmica	1
B16-F10	Anti-PD1	3	Intraperitoneal	2
B16-F10	Vacuna amb A + A.1	4	Intradèrmica	1
B16-F10	Vacuna amb B + B.1	4	Intradèrmica	1

**Taula 3. Tipus de tractaments.**

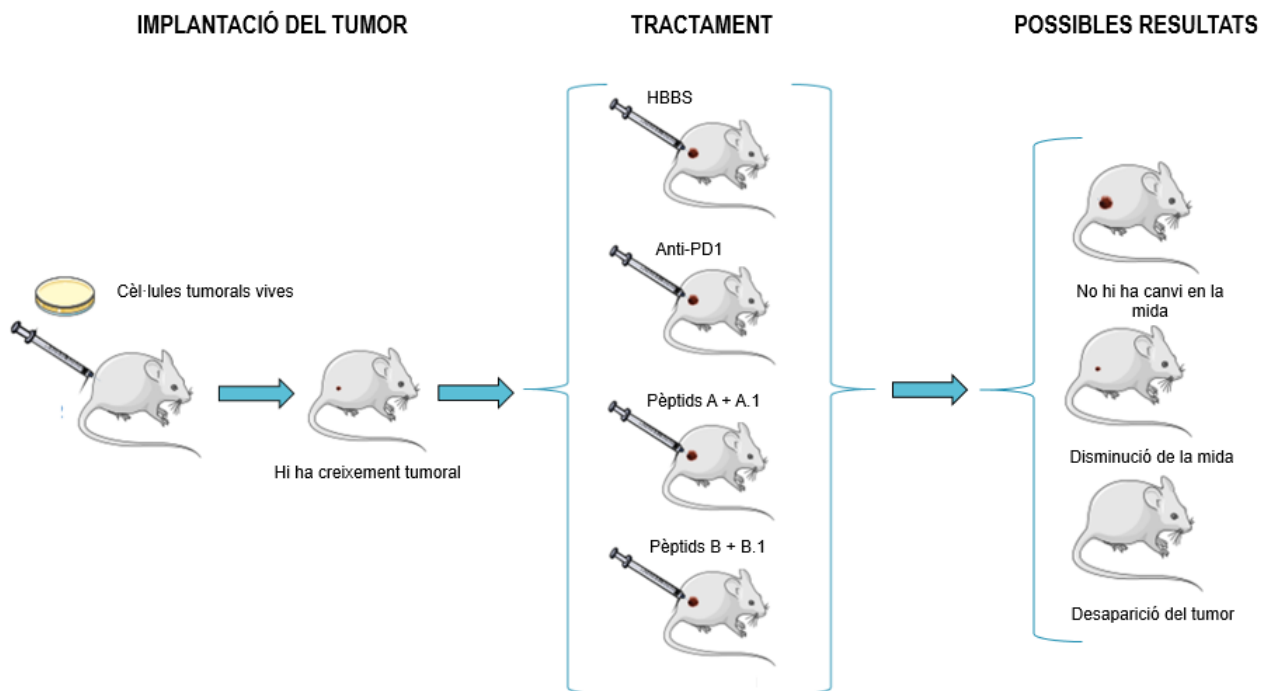
Es va fer un seguiment del creixement tumoral 3 cops per setmana així com del pes dels ratolins 1 cop per setmana.

Amb els tumors que van desenvolupar els ratolins C57BL/6 es van prendre 2 mesures, l'alçada (H) i llargada (L). A partir d'aquestes mesures es va calcular l'àrea del tumor assumint que tenien forma rodona amb la següent fórmula:

$$\text{Àrea} = \frac{\pi \cdot H \cdot L}{4}$$

**Equació 2. Equació per calcular l'àrea dels tumors.**

A partir dels resultats obtinguts, es van crear els gràfics per comparar els resultats amb una aplicació anomenada *Graphpad*.



**Figura 33. Esquema del procés dels tractaments.**

Font: Pròpia

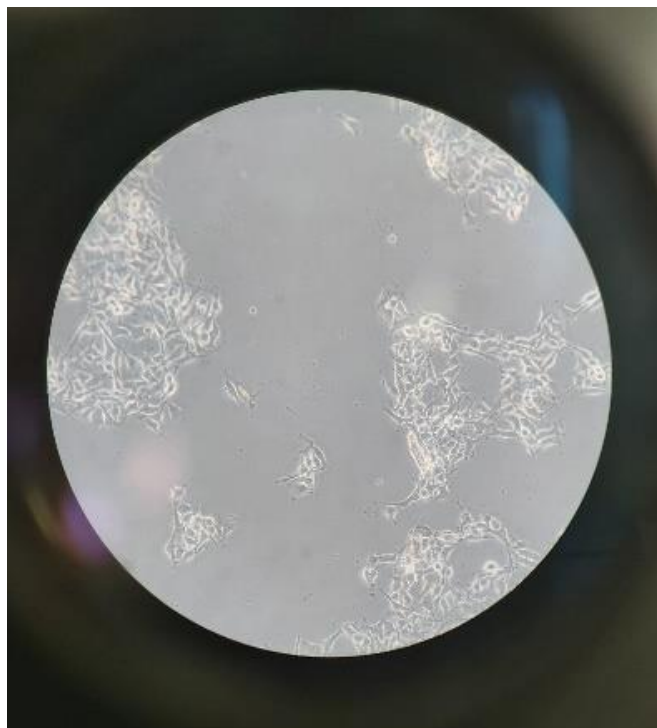
**\*Placebo:** fals medicament que tan sols conté productes inerts sense cap principi actiu.

# RESULTATS

## 5. RESULTATS I ANÀLISI DELS RESULTATS

### 5.1. CULTIU DE CÈL·LULES DE MELANOMA DE RATOLÍ B16-F10

En la figura 34 podem observar com es veien les cèl·lules B16-F10 de ratolí des d'un microscopi. Tal i com es mostra, l'únic que trobem en aquest cultiu cel·lular són cèl·lules, cosa que implica que el cultiu s'ha realitzat correctament. En altres casos s'hagués pogut trobar algun tipus d'organisme no desitjat com ara un bacteri. El fet que no contingui cap tipus de microorganisme es deu a les condicions estèrils on s'ha mantingut el flascó de cultiu i als components del MCC ja que inclou antibiòtics.



**Figura 34. Cèl·lules B16-F10 observades des del microscopi.**

Font: Pròpia

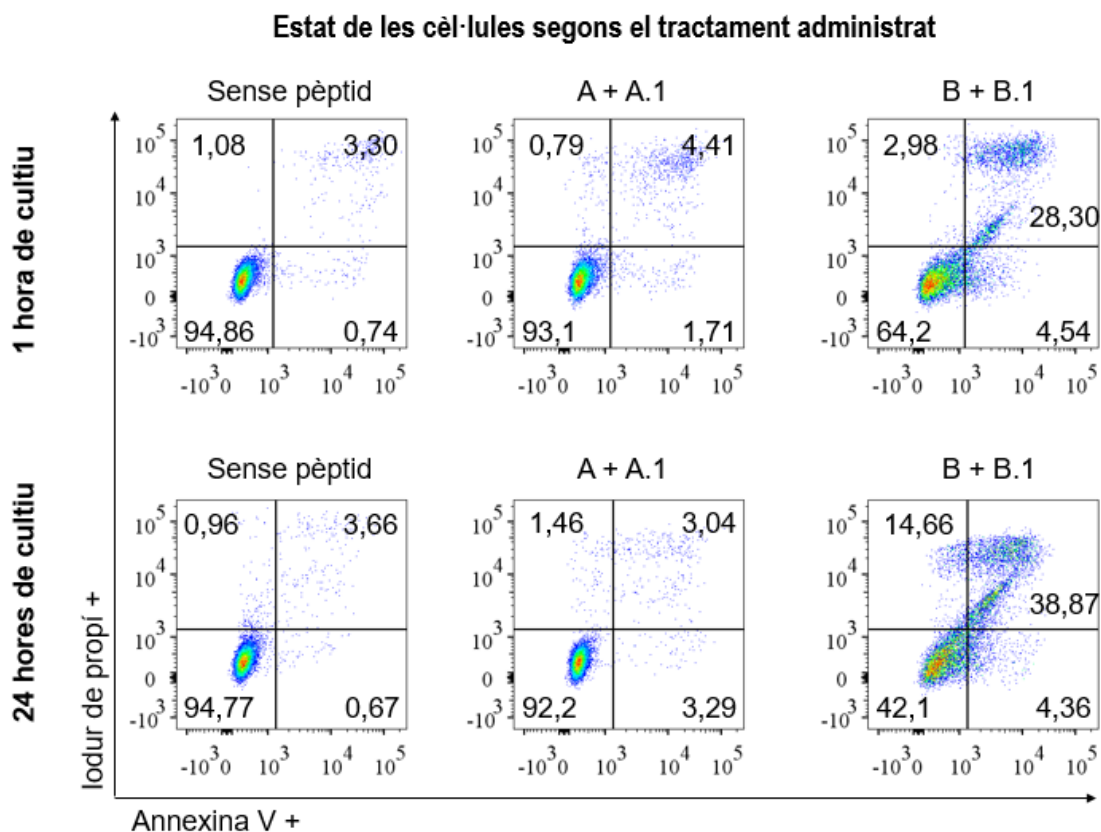
### 5.2. RECOMPTE DE CÈL·LULES

Un dels recomptes cel·lulars que es van fer és el següent:

$$\frac{13}{4} \cdot 4 \cdot 10.000 \cdot 25 = 3.250.000 \text{ cèl} \cdot \text{lules}$$

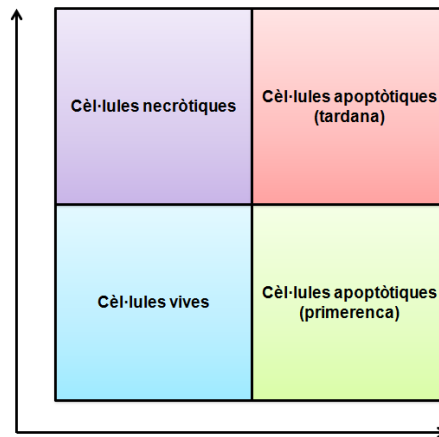
### 5.3. EXPERIMENT *IN VITRO* AMB EL CITÒMETRE

Un cop es van passar totes les mostres pel citòmetre, aquest va anar enregistrant tots els events\* dels quals es van realitzar unes gràfiques fent les mitjanes entre els valors de la mateixa condició i tenint en compte les hores de incubació de les cèl·lules B16-F10.



**Gràfic 1. Resultats sobre l'estat de les cèl·lules després de la incubació amb els pèptids.**

Aquests gràfics proporcionen informació de l'estat de les cèl·lules. Depenent del quadrant on es trobin es pot conèixer l'estat de les cèl·lules: necròtiques, apoptòtiques i vives.



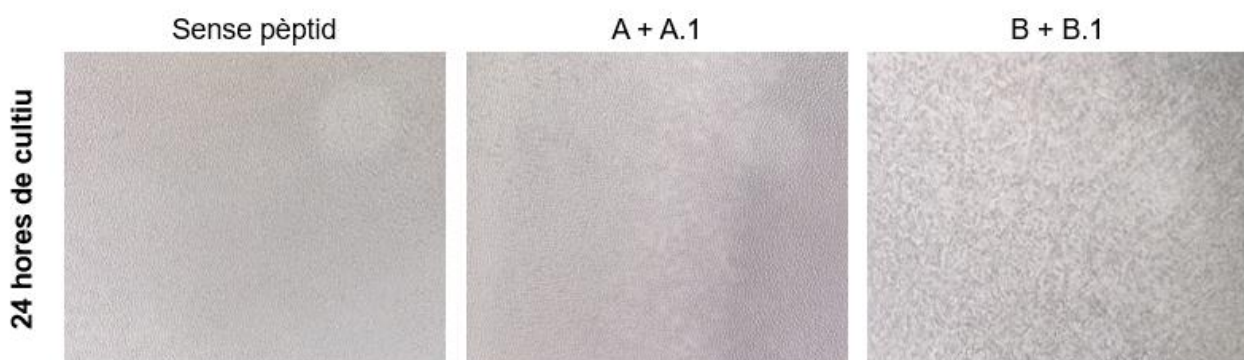
**Figura 35. Interpretació dels gràfics del citòmetre.**

Font: Pròpia

Per tant, tan sols estan vives les cèl·lules que es troben al tercer quadrant. En canvi en els altres quadrants les cèl·lules estan mortes, amb la diferència que les necròtiques es moren accidentalment en ser lesionades per una agressió tòxica o mecànica i les apoptòtiques són induïdes a suïcidar-se degut a un conjunt de canvis intracel·lulars.

Aleshores, tal i com s'observa en els gràfics de les cèl·lules no tractades, la gran majoria de cèl·lules estan vives, igual que en els gràfics de les cèl·lules tractades amb els pèptids A i A.1. En canvi, als gràfics de les cèl·lules tractades amb els pèptids B i B.1, hi ha moltes més cèl·lules que no estan vives. Entre els 2 gràfics podem veure una lleugera variació, comprovant així que si el pèptid està més estona en contacte amb les cèl·lules, aquestes es moren en major nombre.

A més a més, l'estat de les cèl·lules després de 24 hores de cultiu és molt diferent tal i com es pot observar en la figura 36.

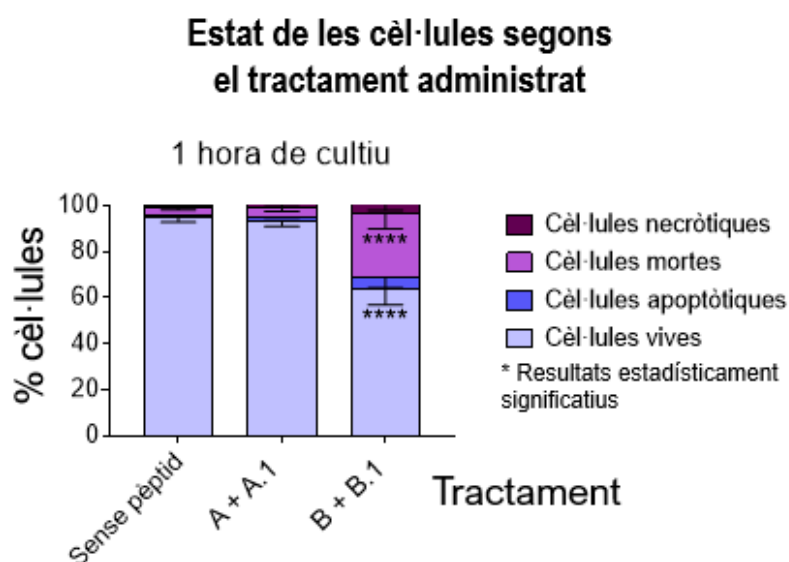


**Figura 36. Fotografies de les cèl·lules B16-F10 amb els diferents pèptids després de 24 hores d'incubació.**

Font: Pròpia

Una manera més fàcil de visualitzar aquests resultats és amb els gràfics de barres que es troben a continuació.

Tal i com es pot observar en el gràfic 2, les cèl·lules que no han estat en contacte amb cap tipus de pèptid i les cèl·lules amb els pèptids A i A.1, es troben majoritàriament vives, tan sols una petita quantitat es troben mortes i una quantitat gairebé insignificant es troben necròtiques o apoptòtiques. Tot i que el tant per cent de cèl·lules apoptòtiques és lleugerament més gran en les cèl·lules que contenen els pèptids control que en aquelles on no hi ha pèptid, la diferència no es estadísticament significativa. En canvi, en el cèl·lules on hi ha els pèptids d'interès hi ha un percentatge molt inferior de cèl·lules vives i un percentatge molt superior de cèl·lules mortes. Aquests 2 percentatges, 64,2% i 28,3% respectivament, són estadísticament significatius respecte als altres tal i com s'indica amb els coixinets. Això significa que els pèptids B i B.1 han obtingut un resultat ben diferent als altres 2.

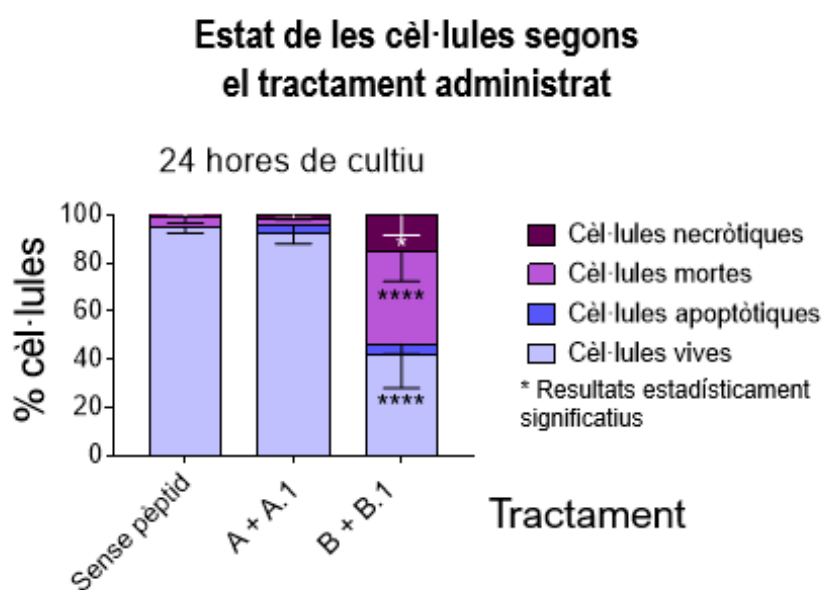


**Gràfic 2. Resultats sobre l'estat de les cèl·lules després d'1 hora d'incubació amb els pèptids.**

**Event\*:** equival a tot allò que detecta el citòmetre quan passa per davant del làser, de manera simplificada: event = cèl·lula.



Després de 24 hores d'incubació, els percentatges de les cèl·lules sense pèptid i de les cèl·lules amb els pèptids control no han variat molt respecte els resultats del gràfic 2. No obstant, en el cas de les cèl·lules amb els pèptids d'interès hi ha un percentatge més gran de cèl·lules necròtiques (14,66%), igual que de cèl·lules mortes (38,87%) i cèl·lules apoptòtiques (4,36%). Fet que dona lloc a que el percentatge de cèl·lules vives hagi disminuït dràsticament (42,1%). En aquest cas (gràfic 3), no tan sols els tants per cent de cèl·lules vives i mortes son estadísticament significatius, sinó que també el percentatge de cèl·lules necròtiques tot i que amb menys rellevància.



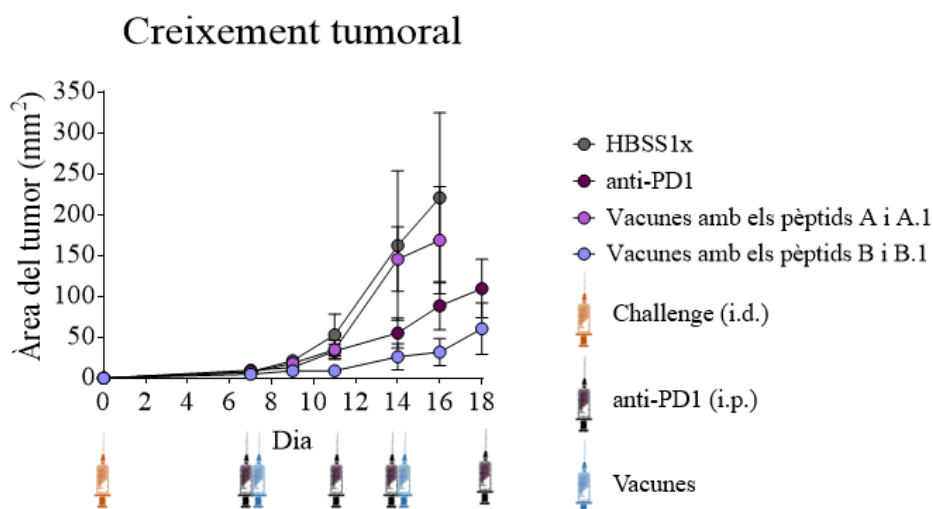
**Gràfic 3. Resultats sobre l'estat de les cèl·lules després de 24 hores d'incubació amb els pèptids.**

Per tant, el conjunt de resultats explicats fins al moment fan pensar que:

- **Cèl·lules sense pèptid:** es troben en bon estat i en gran quantitat.
- **Cèl·lules amb pèptid A i A.1:** es troben en bon estat i en gran quantitat.
- **Cèl·lules amb pèptid B i B.1:** es troben en mal estat, en fase apoptòtica.

## 5.4. EXPERIMENT *IN VIVO* AMB RATOLINS

Després de seguir un estudi durant 18 dies, es va realitzar un gràfic (gràfic 4), on es pot observar com el tumor ha evolucionat depenen de cada condició. Aquests resultats també es van obtenir fent la mitjana de tots els valors que pertanyen a la mateixa condició.



**Gràfic 4. Evolució de la mida del tumor en funció del temps i del tractament.**

En primer lloc, els ratolins tractats amb HBSS1x (placebo) i els tractats amb vacunes amb els pèptids A i A.1 tal i com s'observa al gràfic només tenen dades fins al 16è dia, ja que es van sacrificar perquè quan el tumor arriba una mida de 200 mm<sup>2</sup>, els animals s'han de sacrificar. Aquestes 2 condicions són per poder comparar com evolucionen els ratolins tractats amb els altres. En segon lloc, els ratolins tractats amb anti-PD1 (tractament actual per tractar el melanoma) tenen una important disminució del tamany del tumor respecte els tractament mencionats abans. El tamany de mitjana assoleix una àrea de 100 mm<sup>2</sup>. En últim lloc, els ratolins tractats amb els pèptids B i B.1 són els que han tingut un augment de tamany més petit, amb una mitjana de d'aproximadament 50 mm<sup>2</sup>.

# CONCLUSIONS

## 6. CONCLUSIONS

### **Experiment *in vitro***

La influència de l'administració de pèptids B + B.1 en un cultiu de cèl·lules de melanoma de ratolí B16-F10 és el problema investigat amb l'experiment *in vitro*. I la meua hipòtesi: potser els cultius cel·lulars als que se'ls afegeixen els pèptids B + B.1 tenen un nombre de cèl·lules mortes major.

Els resultats obtinguts demostren que efectivament els cultius cel·lulars que contenen els pèptids B + B.1 tenen un nombre de cèl·lules major. Tal i com s'ha observat en els resultats, els pèptids A + A.1 administrats conjuntament no tenen cap tipus d'efecte sobre les cèl·lules B16-F10, igual que passa als cultius on no hi ha cap pèptid. En canvi els pèptids B + B.1. administrats conjuntament han actuat en front de les cèl·lules B16-F10.

Per tant s'accepta la hipòtesi plantejada. Es pot concloure que els cultius de cèl·lules de melanoma de ratolí B16-F10 que se'ls afegeixen els pèptids B + B.1 tenen un nombre de cèl·lules mortes major

### **Experiment *in vivo***

La influència en el desenvolupament de melanoma de ratolí usant un tractament amb la vacuna de pèptids B i B.1 és el problema investigat amb l'experiment *in vivo*. I la meua hipòtesi: potser els ratolins als que se'ls administra la vacuna amb els pèptids B i B.1 tenen un desenvolupament del tumor més lent.

Els resultats obtinguts demostren que el desenvolupament de melanoma de ratolí s'ha vist influenciat pel tractament amb la vacuna de pèptids B i B.1. Els ratolins als que se'ls administra la vacuna amb els pèptids B i B.1 tenen un desenvolupament del tumor més lent que la resta de tractaments.

Per tant es vàlida la hipòtesi plantejada. Es pot concloure que els ratolins als que se'ls administra la vacuna amb els pèptids B i B.1 tenen un desenvolupament de tumor més lent.

# PROSPECTIVA

## 7. PROSPECTIVA

Després d'haver realitzat aquest treball, hi ha alguns aspectes que considero que hauria pogut tenir en compte.

Tot i haver realitzat les pràctiques de forma precisa, m'hagués agradat realitzar-ne més, ja que cada cop que es realitzava un experiment era difícil tenir en compte tots els detalls. M'hagués agradat conèixer millor el funcionament del tractament ja que sé com actua però no com ho fa exactament. A més m'agradaria veure si aquest tractament podria ser efectiu en humans.

Malgrat el meu TDR consistia en els experiments realitzats també vaig ajudar a realitzar-ne d'altres que es troben fora del meu marc teòric i pràctic. Això em va fer adonar que en un laboratori es realitzen molts estudis alhora. A banda de Citometria de Flux i cultivació de cèl·lules vaig veure com fer PCRs i com fer una extracció de proteïnes. M'hagués agradat estar més temps fent pràctiques per seguir veient què és fa en un laboratori.

# BIBLIOGRAFIA

## 8. BIBLIOGRAFIA

- *American Society of Clinical Oncology (ASCO)*. < <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/c%C3%B3mo-se-trata-el-c%C3%A1ncer/inmunoterapia/qu%C3%A9-es-la-inmunoterapia> >. [8/12/2021]
- *American Cancer Society*. < <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/what-is-immunotherapy.html> >. [15/11/2021]
- *Cancer Research Institute*. < <https://www.cancerresearch.org/en-us/immunotherapy/what-is-immunotherapy> > [15/11/2021]
- *Instituto Nacional del Cáncer*. < <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es> >[25/11/2021]
- Institut La Romànica, CFGS QUÍMICA AMBIENTAL C4 UD5. < [http://www.gdlaromanica.cat/campus/pluginfile.php/26478/mod\\_resource/content/1/UD5\\_NA1\\_3\\_Medis%20de%20cultiu.pdf](http://www.gdlaromanica.cat/campus/pluginfile.php/26478/mod_resource/content/1/UD5_NA1_3_Medis%20de%20cultiu.pdf) > [10/10/2021]
- Quimica.es. < <https://www.quimica.es/enciclopedia/Tripsina.html> > [11/10/2021]
- *Thermo Fisher Scientific*. < <https://www.thermofisher.com/es/es/home.html> > [11/10/2021]
- El blog de TERMCAT < <https://termcat.blog.gencat.cat/2015/06/04/quina-diferencia-hi-ha-entre-les-vacunes-terapeutiques-i-les-vacunes-profilactiques/> > [20/10/2021]
- *APPROBY*. < [https://docs.google.com/document/d/1\\_NFtOK4qE\\_OP0swEHjfstz\\_G6US8\\_CJl\\_FxZezph4ZDc/edit](https://docs.google.com/document/d/1_NFtOK4qE_OP0swEHjfstz_G6US8_CJl_FxZezph4ZDc/edit) > [18/12/2021]
- *MiSistemaInmune* < <https://www.misistemainmune.es/inmunologia/componentes/las-moleculas-mhc-el-pasaporte-de-la-inmunidad> > [3/1/2022]
- *ABYNTEK*. < <https://www.abyntek.com/anticuerpos-anti-pd-1-y-pd-l1-e-inmunoterapia/> > [20/10/2021]
- *Charles River*. < <https://www.criver.com/products-services/find-model/c57bl6-mouse?region=3611> > [12/11/2021]
- *SARTORIUS*. < <https://www.bioind.com/worldwide/support/media-formulations/media-formulation-rpmi/> > [12/11/2021]
- Universitat d'Alacant. < <https://ssti.ua.es/va/instrumentacio-cientifica/unitat-de-genomica-i-proteomica/citometria-de-flux.html> > [7/12/2021]
- Universitat de València. < <https://www.uv.es/uvweb/servei-central-suport-investigacio-experimental/ca/presentacio-1285868582552.html> > [7/12/2021]
- *COSMOLINUX*. < [http://cosmolinux.no-ip.org/recursos\\_aula/BIO1erBAT/Genetica\\_molecular/El\\_cancer\\_malaltia\\_genetica1.pdf](http://cosmolinux.no-ip.org/recursos_aula/BIO1erBAT/Genetica_molecular/El_cancer_malaltia_genetica1.pdf) > [18/12/2021]
- *CORRAL, Marta*. Estudios de la Respuesta Inmunitaria en los contextos d'Autoinmunidad i Inmunidad Tumoral: modelos de Diabetes Tipo 1 i Melanoma Cutani. Universitat de Lleida, 2021. [3/1/2022]



- *Japanese Society for Immunology. Your Amazing Immune System - How It Protects Your Body.* European Federation of Immunological Societies (EFIS), 2009. [18/12/2021]
- *INMUNOLOGÍA; Biología y patología del sistema inmune.* Madrid. Editorial Medica Panamericana, 2006.

# ANNEXOS

## 9. ANNEXOS

### ANEX I. COMPOSICIÓ MEDIS DE CULTIU

Reactiu	Concentració (mg/L)
Nitrat de Calci ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	100
Clorur de Potassi (KCl)	400
Sulfat de Magnesi ( $\text{MgSO}_4$ )	48,84
Clorur de sodi (NaCl)	6000
Bicarbonat de sodi ( $\text{NaHCO}_3$ )	2000
Hidrogenfosfat de sodi ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	800,85
Glucosa	2000
<i>Glutathione Reduced</i>	1
<i>Phenol red</i>	5

Taula 4. Composició RPMI de la casa Cultek

Reactiu	Referència, Casa Comercial	Volum (mL)
Medi RPMI-1640 sense L-glutamina	H3BE12-167F, Cultek	450
Sèrum Fetal Boví (FBS)	91S1860-500, Cultek	50
L-glutamina 200 mM	25-005-CI, Corning	5
Penicilina/Estreptomicina	H3DE17-602E, Cultek	5
MEM Sodium Pyruvate 100 mM	H3BE13-115E, Cultek	5
$\beta$ 2-mercaptoetanol 50 mM	M6250, Sigma Aldrich Chimie	0,5

Taula 5. Composició MCC.

## ANEX II. MIDES DELS TUMORS DELS RATOLINS AMB ELS DIFERENTS TRACTAMENTS

Nº del ratolí	Tractament		0 (Challenge)	7	9	11	14	16	18
3310-0	HBSS 1X	Data	09/08/2021	16/08/2021	17/08/2021	20/08/2021	23/08/2021	25/08/2021	27/08/2021
		H (mm)	0	4	7	10	17	18	23
		L (mm)	0	4	4	10	19	23	24
		Àrea (mm2)	<b>0,00</b>	<b>12,57</b>	<b>21,99</b>	<b>78,54</b>	<b>253,68</b>	<b>325,15</b>	<b>433,54</b>
1796-0	HBSS 1X	Data	19/07/2021	26/07/2021	28/07/2021	30/07/2021	02/08/2021	04/08/2021	06/08/2021
		H (mm)	0	2	4	5	10	13,5	15
		L (mm)	0	2	6,5	7	9	11	12,5
		Àrea (mm2)	<b>0,00</b>	<b>3,14</b>	<b>20,42</b>	<b>27,49</b>	<b>70,69</b>	<b>116,63</b>	<b>147,26</b>
1800-0	anti-PD1	Data	19/07/2021	26/07/2021	28/07/2021	30/07/2021	02/08/2021	04/08/2021	06/08/2021
		H (mm)	0	5	6	6,5	8	12	13
		L (mm)	0	3	4	6	11	13	15
		Àrea (mm2)	<b>0,00</b>	<b>11,78</b>	<b>18,85</b>	<b>30,63</b>	<b>69,12</b>	<b>122,52</b>	<b>153,15</b>
3310-1	anti-PD1	Data	09/08/2021	16/08/2021	17/08/2021	20/08/2021	23/08/2021	25/08/2021	27/08/2021
		H (mm)	0	4	4	9	9	12	14
		L (mm)	0	4	4	7	11	12	12,5
		Àrea (mm2)	<b>0,00</b>	<b>12,57</b>	<b>12,57</b>	<b>49,48</b>	<b>77,75</b>	<b>113,10</b>	<b>137,44</b>
1799-0	anti-PD1	Data	19/07/2021	26/07/2021	28/07/2021	30/07/2021	02/08/2021	04/08/2021	06/08/2021
		H (mm)	0	3	5	4	4	7	7,5
		L (mm)	0	2	2	6	6	5,5	6,5
		Àrea (mm2)	<b>0,00</b>	<b>4,71</b>	<b>7,85</b>	<b>18,85</b>	<b>18,85</b>	<b>30,24</b>	<b>38,29</b>
1800-3	Vacuna 72 + 72-8R	Data	19/07/2021	26/07/2021	28/07/2021	30/07/2021	02/08/2021	04/08/2021	
		H (mm)	0	3	7	6,5	9	10	
		L (mm)	0	3	6	4,5	9,5	17	
		Àrea (mm2)	<b>0,00</b>	<b>7,07</b>	<b>32,99</b>	<b>22,97</b>	<b>67,15</b>	<b>133,52</b>	
749-5	Vacuna 72 + 72-8R	Data	19/07/2021	26/07/2021	28/07/2021	30/07/2021	02/08/2021	04/08/2021	
		H (mm)	0	1,5	1,5	3		6	
		L (mm)	0	3	3	4		3	
		Àrea (mm2)	<b>0,00</b>	<b>3,53</b>	<b>3,53</b>	<b>9,42</b>		<b>14,14</b>	

3310-2	Vacuna 72 + 72-8R	Data	09/08/2021	16/08/2021	17/08/2021	20/08/2021	23/08/2021	25/08/2021	
		H (mm)	0	2	4	8	16	22	
		L (mm)	0	4	4	7	14	19	
		Àrea (mm <sup>2</sup> )	<b>0,00</b>	<b>6,28</b>	<b>12,57</b>	<b>43,98</b>	<b>175,93</b>	<b>328,30</b>	
3222-3	Vacuna 72 + 72-8R	Data	09/08/2021	16/08/2021	17/08/2021	20/08/2021	23/08/2021	25/08/2021	
		H (mm)	0	4	5	10	17	14,5	
		L (mm)	0	4	6	8	14,5	17,5	
		Àrea (mm <sup>2</sup> )	<b>0,00</b>	<b>12,57</b>	<b>23,56</b>	<b>62,83</b>	<b>193,60</b>	<b>199,29</b>	
1798-2	Vacuna DIF-P +DIF-P8R	Data	19/07/2021	26/07/2021	28/07/2021	30/07/2021	02/08/2021	04/08/2021	06/08/2021
		H (mm)	0	2	5	2			
		L (mm)	0	2	3	2			
		Àrea (mm <sup>2</sup> )	<b>0,00</b>	<b>3,14</b>	<b>11,78</b>	<b>3,14</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
749-2	Vacuna DIF-P +DIF-P8R	Data	19/07/2021	26/07/2021	28/07/2021	30/07/2021	02/08/2021	04/08/2021	06/08/2021
		H (mm)	0	2	3	3	4	5	6
		L (mm)	0	2	3	3	6	8	8
		Àrea (mm <sup>2</sup> )	<b>0,00</b>	<b>3,14</b>	<b>7,07</b>	<b>7,07</b>	<b>18,85</b>	<b>31,42</b>	<b>37,70</b>
3222-4	Vacuna DIF-P +DIF-P8R	Data	09/08/2021	16/08/2021	17/08/2021	20/08/2021	23/08/2021	25/08/2021	27/08/2021
		H (mm)	0	2	3	3,5	8,5	10	12
		L (mm)	0	5	6	8	11	10	13
		Àrea (mm <sup>2</sup> )	<b>0,00</b>	<b>7,85</b>	<b>14,14</b>	<b>21,99</b>	<b>73,43</b>	<b>78,54</b>	<b>122,52</b>
3310-3	Vacuna DIF-P +DIF-P8R	Data	09/08/2021	16/08/2021	17/08/2021	20/08/2021	23/08/2021	25/08/2021	27/08/2021
		H (mm)	0	2	2	3	4	4,5	4,5
		L (mm)	0	3	2	3	4	5	6
		Àrea (mm <sup>2</sup> )	<b>0,00</b>	<b>4,71</b>	<b>3,14</b>	<b>7,07</b>	<b>12,57</b>	<b>17,67</b>	<b>21,21</b>

Taula 6. Seguiment del creixement dels tumors.

