

CÀNCER

**ESTUDI DE LA INHIBICIÓ DELS
CDK1/2 COM A POSSIBLE
TRACTAMENT PEL CÀNCER.**



ABSTRACT

El cáncer se basa en la proliferación descontrolada de las células. Este trabajo pretende estudiar la inhibición de unas proteínas necesarias para la división celular, los CDK1 y CDK2, como posible tratamiento para combatir el cáncer. Se ha realizado un experimento *in vitro* con células tumorales, en el que se han tratado células cancerosas con inhibidores de estas proteínas, y además, también se han tratado células con cisplatino, un fármaco utilizado actualmente para combatir ciertos tipos de cáncer. De esta forma, se ha pretendido hacer una comparación entre la efectividad del cisplatino, y la efectividad de los inhibidores de CDK1 y CDK2. Se ha realizado una citometría de flujo con yoduro de propidio para analizar los diferentes cultivos celulares, con el objetivo de comprobar los mecanismos de acción de los diferentes fármacos. Se ha podido observar como la inhibición de CDK1 y CDK2 podría aturar el crecimiento de un tumor, aunque de manera menos agresiva que el cisplatino. Además, se ha observado que un tumor tratado con inhibidores de CDK1 y CDK2 tiene una gran capacidad de rebrote.

Cancer is based on the decontrolled proliferation of cells. This work intends to study inhibition of a type of necessary proteins for cell division, CDK1 and CDK2, as a possible treatment to fight cancer. An *in vitro* experiment has been conducted, in which cancer cells have been treated with CDK1 and CDK2 inhibitors. Furthermore, some cancer cells have been treated with cisplatin, a drug which is currently used to fight cancer. In this way, a comparison between the effectivity of the two drugs has been carried out. The mechanism of action of both drugs has been verified by making a flow cytometry with propidium iodide of the different samples. It has been checked, that inhibition of CDK1 and CDK2 could stop tumour growth, but in a less aggressive way than cisplatin. Moreover, it has been discovered that a tumour treated with CDK1 and CDK2 inhibition has quite a big capacity to flare-up.

Índex

Abstract	2
1. Introducció	4
2. El cicle cel·lular	6
2.1 Les fases de la interfase	6
2.2 La divisió cel·lular	7
1.2.1 La mitosi	8
2.2.2 La citocinesi	10
2.2.3 La fase G0	10
2.3 La regulació del cicle cel·lular	11
2.3.1 La regulació del cicle cel·lular per factors externs	12
2.3.2 La regulació interna del cicle cel·lular a través de checkpoints	12
2.3.3 Molècules reguladores del cicle cel·lular	15
3. El càncer	18
3.1 Les cèl·lules canceroses	20
4. Fàrmacs estudiats	24
4.1 El cisplatí	24
4.1.1 Mecanismes moleculars del cisplatí	24
4.2 Inhibidors de CDK	25
5. La citometria de flux	26
5.1 El citòmetre de flux	26
5.2 El iodur de propidi	27
6. Estudi dels inhibidors de CDK1/2	28
6.1 Plantejament de l'experiment	28
6.2 Procediment de l'experiment	30
6.3 Resultats	36
6.3.1 Observacions al microscopi	36
6.3.2 Resultats de la citometria de flux	38
6.3.3 Discussió dels resultats	46
7. Conclusions	50
Bibliografia	52

1. INTRODUCCIÓ

Sempre m'ha agradat la ciència, especialment la branca mèdica d'aquesta, així que tenia clar que el meu treball de recerca havia d'estar enfocat a algun tema científic. A més a més, el càncer ha estat recentment un tema de gran interès per part meua, fins al punt de voler-me dedicar a la medicina, i molt probablement a l'oncologia.

Així doncs, quan vaig haver d'escollir tema per aquest treball, vaig decidir fer un experiment que involucrés cèl·lules canceroses, i amb el qual hi pogués aprendre d'aquest camp que tant m'agrada. Finalment, amb l'ajuda dels meus tutors, vam decidir fer l'estudi dels inhibidors de CDKs com a tractament pel càncer.

L'objectiu d'aquest treball és comprovar que la inhibició de CDK1/2 podria ser eficaç per combatre el càncer, i veure i entendre com afecten a les cèl·lules tumorals, així observar quines conseqüències tenen en el cicle cel·lular. També es vol comparar l'acció dels inhibidors de CDK1/2, amb l'acció d'un fàrmac utilitzat per combatre el càncer, el cisplatí. D'aquesta manera es vol veure quin mecanisme d'acció té cada fàrmac, i com actuen per tal d'evitar la divisió cel·lular. A més a més aquest treball, també té per objectiu determinar, de manera qualitativa, com són d'agressius els inhibidors de CKD1/2 respecte al cisplatí, i també, quina és la capacitat de rebrot d'un tumor tractat amb inhibidors de CDK1/2.

La primera part d'aquest treball, descriu els aspectes necessaris per a entendre l'experiment fet al laboratori. En aquesta primera part, s'hi descriuen processos com el cicle cel·lular i el càncer, a més a més de descriure els fàrmacs utilitzats en aquest experiment, i les màquines utilitzades al laboratori. La segona part del treball descriu l'experiment realitzat al laboratori, pas a pas, així com els materials emprats, i els resultats d'aquest.

Per complir els objectius d'aquest treball, s'ha realitzat un experiment de laboratori amb cèl·lules *in vitro*. S'han fet 18 cultius cel·lulars, amb cèl·lules canceroses de càncer de mama de ratolí, que s'han separat en 6 grups diferents per tal de ser tractades amb cada un dels fàrmacs i condicions pertinents.

Després s'ha fet una citometria de flux amb tots els grups de mostres, en la que s'ha pogut decretar en quina fase del cicle cel·lular es trobaven les cèl·lules de cada grup. S'han satisfet els objectius d'aquest treball a partir dels resultats de la citometria de flux a més a més de les mostres vistes al microscopi.

Per fer aquest treball s'han utilitzat fonts molt diferents. S'ha fet servir informació pròpia extreta dels coneixements rebuts al llarg dels meus estudis, així com informació proveïda per les meves tutores i altres professors que m'han ajudat en aquest treball. Gran part de la informació d'aquest treball s'ha extret d'articles científics publicats per diversos autors, i de diferents pàgines web fiables en les quals hi havia informació rellevant. A més a més s'ha utilitzat un llibre per extreure'n informació en determinats punts del treball.

Al llarg d'aquest treball ens hem trobat amb diversos impediments, que n'han dificultat el correcte desenvolupament. A l'hora de fer l'experiment, que havia d'incloure un conjunt de mostres amb cèl·lules no canceroses, aquestes no es van descongelar correctament i no van poder ser utilitzades, motiu pel qual vam haver d'adaptar l'experiment als recursos que teníem. Una altra de les dificultats a l'hora de fer aquest experiment han estat els pocs coneixements per part meva, en relació amb la gran quantitat de conceptes complexos que hi apareixien, els quals he hagut d'aprendre i estudiar per tal de poder desenvolupar l'experiment correctament, a més a més de les limitacions de temps i recursos.

Per finalitzar aquesta introducció, m'agradaria agrair l'ajuda de diverses persones, sense les quals aquest treball no hagués estat possible. Primerament agrair a Fundació Catalunya La Pedrera, i especialment al programa de Bojos per la Ciència, així com a l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona per donar-me la gran oportunitat de fer el meu treball de recerca a les seves instal·lacions, i amb la seva ajuda. M'agradaria agrair també l'ajuda de la investigadora científica que m'ha guiat i ajudat al llarg del desenvolupament d'aquest treball. També voldria agrair la gran ajuda de la meva tutora, que m'ha guiat i m'ha ajudat sempre que ho he necessitat, i que ha estat una peça clau en el desenvolupament d'aquest treball.

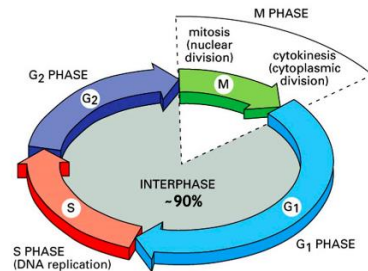
2. EL CICLE CEL·LULAR

El cicle cel·lular (figura 1) és el conjunt de processos reguladors que es donen des que una cèl·lula es divideix, fins que la cèl·lula filla es torna a dividir. El cicle cel·lular coordina, també, la replicació del genoma¹, i tots els processos que ajuden que el DNA replicat acabi esdevenint-se una nova cèl·lula (1).

Classifiquem l'estat d'una cèl·lula segons si en un moment donat s'està dividint o si no ho està fent. Si la cèl·lula en un moment donat no està en divisió cel·lular, diem que la cèl·lula està en interfase, però si pel contrari la cèl·lula està en divisió, direm que es troba en mitosi (en la majoria dels casos)² (2).

La interfase és, entre les dues, la que requereix més temps, i per tant, una cèl·lula es passa la majoria del temps en interfase.

Tant la interfase com la mitosi, es poden dividir en fases més curtes, que tota cèl·lula durà a terme (2).



y 1: Esquema del cicle cel·lular

Font: <https://quizlet.com/es/559902958/tema-19-cicle-celular-flash-cards/>

2.1 LES FASES DE LA INTERFASE

Al llarg de la interfase el DNA es manté en un estat de semi-condensació³ per tal de facilitar la seva replicació (3). La interfase es divideix en tres fases, la fase G1, la fase S i la fase G2.

G1: Aquesta és la primera fase en què una cèl·lula entra després de dividir-se. Durant la fase G1 ("first gap"), la cèl·lula creix i es prepara per duplicar el DNA, a més a més de sintetitzar blocs moleculars que seran necessaris en fases futures. També emmagatzema l'energia suficient per a replicar tots els cromosomes del nucli durant la fase S (4).

¹ Conjunt d'informació genètica d'una cèl·lula.

² Els organismes de divisió sexual tenen algunes cèl·lules que porten a terme un tipus de divisió cel·lular anomenada meïosi, que donarà a lloc a cèl·lules filles (gàmetes) amb la meitat de la informació genètica que la cèl·lula progenitora. Tot i així, en la resta de casos identifiquem una cèl·lula en divisió com a una cèl·lula en mitosi.

³ En un estat completament condensat, el DNA és pràcticament impossible de replicar, per això durant la interfase el DNA es troba en un estat menys condensat. Serà només quan la cèl·lula entri en divisió, que el DNA es condensarà fins al màxim nivell de compactació.

S: Al llarg de la fase S (“synthesis”), la cèl·lula replica tota la informació genètica continguda al nucli, és a dir, duplica tot el DNA (figura 2, dibuixos 1 i 2) (4). La cèl·lula també duplica el centrosoma, un orgànel que tindrà un paper molt important durant la mitosi⁴ (3).

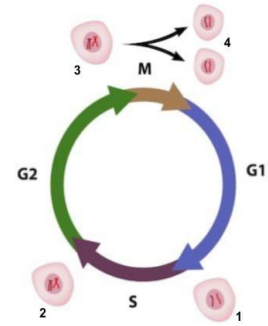


Figura 2: Esquema de les fases del cicle cel·lular amb representacions de la cèl·lula

Font: <https://concepto.de/ciclo-celular/>

G2: Durant la fase G2 (“second gap”), la cèl·lula pot patir un creixement addicional, però generalment es reomplen els emmagatzematges d’energia, i es sintetitzen les proteïnes necessàries per la manipulació dels cromosomes. També es dupliquen alguns orgànuls cel·lulars i es comença a desmuntar el citoesquelet⁵. Totes les preparacions necessàries per la mitosi han de ser portades a terme abans de que finalitzi la fase G2 (3).

2.2 LA DIVISIÓ CEL·LULAR

Durant la mitosi (també anomenada fase M) la cèl·lula reparteix el seu DNA ja duplicat i el seu citoplasma i orgànuls en dues cèl·lules filles (5). La fase M del cicle cel·lular implica dos processos, la mitosi en si, que és la divisió del material genètic (figura 3), i la citocinesi, la divisió del citoplasma (3).

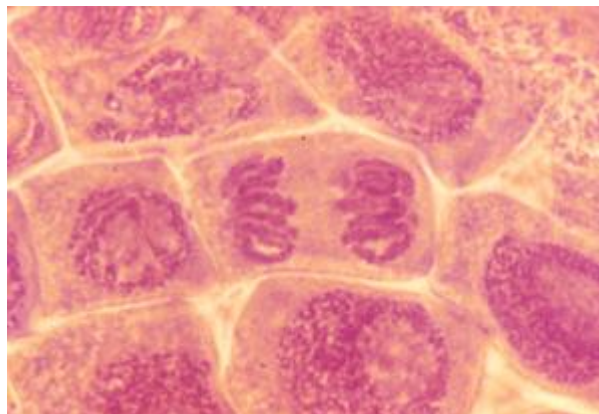


Figura 3: Imatge d'una cèl·lula vegetal en mitosi al microscopi òptic

Font: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/anatomia-y-anat-patologica/libro/divisiones.htm>

⁴ Els centrosomes organitzen els microtúbuls durant la mitosi per formar el fus mitòtic, i també els estiren per tal de separar les cromàtides dels cromosomes de la cèl·lula (23).

⁵ El citoesquelet és una estructura formada de proteïnes que dona forma a la cèl·lula, organitza els orgànuls i ajuda en algunes funcions essencials com la divisió cel·lular (24).

1.2.1 LA MITOSI

La mitosi és un procés complex que es divideix en diverses fases clarament diferenciades al microscopi (3).

Profase: És la primera fase de la mitosi, en la que el DNA es comença a condensar i es formen els cromosomes, que es fan visibles al microscopi (3). A més a més l'embolcall nuclear es comença a desintegrar, i la síntesi de proteïnes es fa més lenta (5). També es desintegra el citoesquelet i les proteïnes que el formaven es reorganitzen per formar el fus mitòtic⁶, mentre els dos centrosomes es separen a extrems oposats de la cèl·lula. La profase es dona per finalitzada quan l'embolcall nuclear està completament dispers i per tant, ja no es diferencia el nucli de la cèl·lula (5).

Prometafase: Durant la prometafase, molts dels processos començats durant la profase es segueixen desenvolupant. Els cromosomes es segueixen condensant i es van formant més microtúbuls⁷ que formen el fus mitòtic (3). Els cromosomes desenvolupen una estructura proteica a cada cromàtide⁸ anomenada cinetocor (figura 4), que servirà per enganxar els microtúbuls del fus mitòtic a les cromàtides del cromosoma (6). Durant la prometafase els microtúbuls es van enganxant als cinetocors⁹ i els cromosomes es van orientant de tal manera que cada cromàtide estigui en direcció a un pol diferent de la cèl·lula (3).

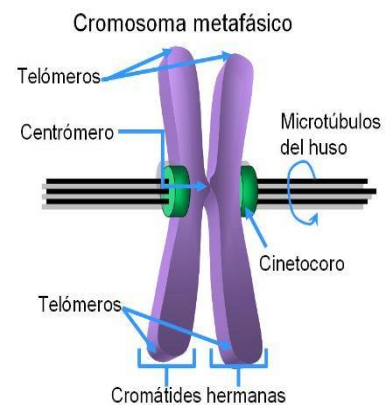


Figura 4: Il·lustració d'un cromosoma durant la metafase

Font: http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/ca/pitulo_03.htm

⁶ El fus mitòtic és una estructura macromolecular, feta de microtúbuls, responsable del correcte repartiment dels cromosomes entre les dues cèl·lules filles (25).

⁷ Formacions citoplasmàtiques de forma cilíndrica, no ramificada.

⁸ Els cromosomes (quan es condensen) tenen dues cromàtides idèntiques entre elles, cada cromàtide és una molècula de DNA condensat.

⁹ Estructura proteica situada al centromer dels cromosomes, en la qual s'hi enganxen els microtúbuls del fus mitòtic durant els processos de divisió cel·lular.

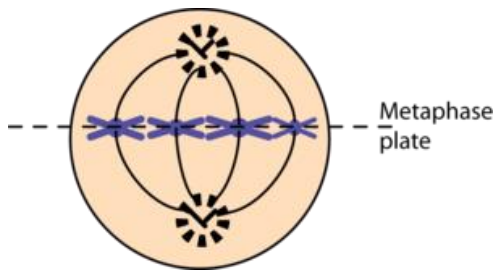


Figura 5: Representació de l'alineació dels cromosomes al pla equatorial

Font: https://en.wikibooks.org/wiki/Cell_Biology/Cell_division/Mitosis

Metafase: Durant la metafase els cromosomes, que es troben en el seu estat de màxima condensació, s'alineen al centre de la cèl·lula, just al mig dels dos . El pla on s'alineen els cromosomes es coneix com a pla equatorial o "metaphase plate" (figura 5). Les dues cromàtides dels cromosomes encara estan enganxades entre elles (3).

Anafase: L'anafase comença en el moment en que les cromàtides germanes¹⁰ es comencen a separar. Aquest és un moment transcendent en el cicle cel·lular ja que un cop iniciat no té retrocés (5). En l'anafase les dues cromàtides germanes es separen pel centròmer i cada cromàtide es converteix en un cromosoma. Aquests nous cromosomes, estirats pels microtúbuls es van acostant als centròmers (figura 6). A més a més durant l'anafase la cèl·lula adquireix una forma ovalada (3).

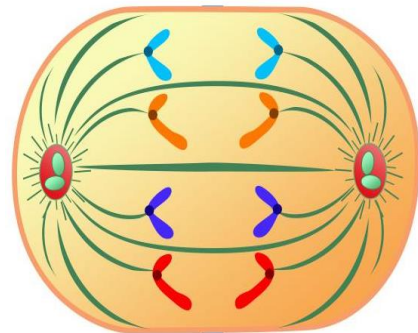


Figura 6: Representació dels cromosomes d'una cèl·lula en anafase

Font: <https://www.pinterest.es/pin/769341548818806179/>

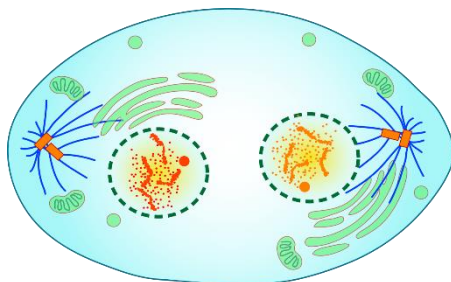


Figura 7: Representació d'una cèl·lula en telofase

Font: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitotic_Telophase.svg

Telofase: Al llarg de la telofase, la cèl·lula es prepara tornar les dues cèl·lules filles a la interfase. Durant la telofase es comença a formar un nou nucli al voltant de cada grup de cromosomes, que es comencen tornar menys condensats (figura 7) (5). A més a més el fus mitòtic es desfà en forma de tubulina¹¹ que s'utilitzarà per formar el citoesquelet de les cèl·lules filles (3).

¹⁰ Es coneixen com cromàtides germanes les cromàtides d'un mateix cromosoma, i que per tant, contenen exactament la mateixa informació genètica.

¹¹ La tubulina és una proteïna de la qual n'estan formats els microtúbuls, els components que formen el fus mitòtic.

2.2.2 LA CITOCINESI

La citocinesi consisteix en la separació completa del citoplasma de la cèl·lula, és a dir, la separació física de la cèl·lula en dues cèl·lules filles. La divisió cel·lular no es dona per acabada fins que els components de la cèl·lula estan completament separats en dues cèl·lules filles (3).

En cèl·lules humanes, igual que en les cèl·lules animals, la citocinesi comença juntament amb l'anafase. Un anell contràctil format per proteïnes es forma a la part interior de la membrana plasmàtica, just al lloc on anteriorment s'havia format el pla equatorial. Aquestes proteïnes estiren l'equador de la cèl·lula cap a dins formant una fissura, anomenada "solc de divisió". El solc de divisió va creixent a mida

que l'anell de proteïnes es va estrenyent, fins que finalment el solc de divisió es fa tant gran que separa completament la cèl·lula progenitora en dues cèl·lules filles (figura 8) (3).

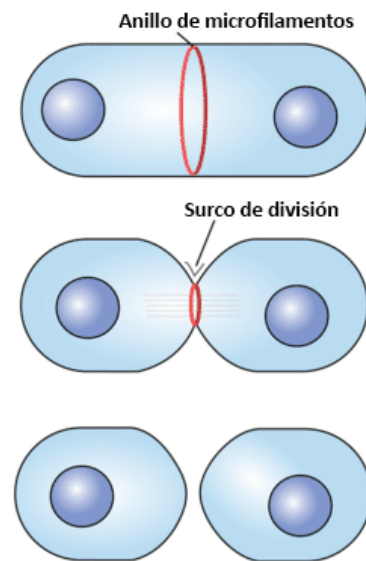


Figura 8: Representació d'una cèl·lula en citocinesi

Font: <https://flexbooks.ck12.org/cbook/ck-12-conceptos-biologia/section/2.35/primary/lesson/mitosis-y-citocinesis/>

2.2.3 LA FASE G0

Una vegada les cèl·lules filles acaben la citocinesi, poden agafar diferents camins segons el tipus cel·lular. Hi ha alguns tipus cel·lulars, com ara les cèl·lules de l'intestí, les cèl·lules d'embrions, o les cèl·lules tumorals que tenen un alt ritme de divisió i s'estan dividint quasi constantment. En canvi, altres tipus cel·lulars, com ara les neurones, són cèl·lules que es divideixen molt poc, o que fins i tot no arriben a dividir-se mai. Aquestes cèl·lules, surten de la fase G1 per entrar en un estat de repòs anomenat fase G0 (figura 9) (4).

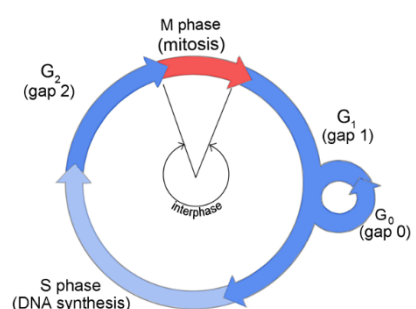


Figura 9: Representació del cicle cel·lular d'una cèl·lula que entra en G0

Font: http://cyberbridge.mcb.harvard.edu/mitosis_4.html

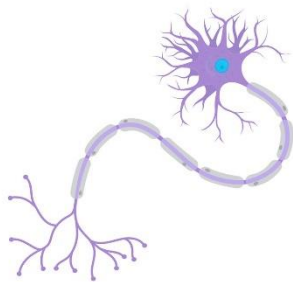


Figura 10: Representació d'una neurona

En la fase G0, la cèl·lula no s'està preparant per la divisió cel·lular, sinó que està realitzant les funcions concretes del tipus cel·lular. Per exemple, una neurona (figura 10) té la funció de conduir senyals, o una cèl·lula del teixit adipós té la funció de emmagatzemar recursos energètics en forma de lípids (4).

Font: <https://theconversation.com/nuestras-neuronas-sufren-atascos-que-pueden-danar-el-cerebro-138963>

La fase G0 es pot comportar com un estat permanent en que algunes cèl·lules no en surten, però també es pot comportar com un estat passatger, del qual algunes cèl·lules en surten i tornen entrar en G1 (4).

2.3 LA REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR

Les cèl·lules normals (aquelles cèl·lules que no han patit cap mutació greu que les hagi pogut condicionar com a cèl·lules tumorals o canceroses) passen pel cicle cel·lular de forma regulada. Les cèl·lules utilitzen informació sobre el seu estat intern i sobre l'estat del medi en que es troben per tal d'evitar la divisió en condicions desfavorables¹² (7).

De fet, les cèl·lules canceroses o tumorals, són cèl·lules que, independentment de la causa, no tenen una bona regulació del seu cicle cel·lular, i això les fa dividir a gran velocitat (figura 11) (8).

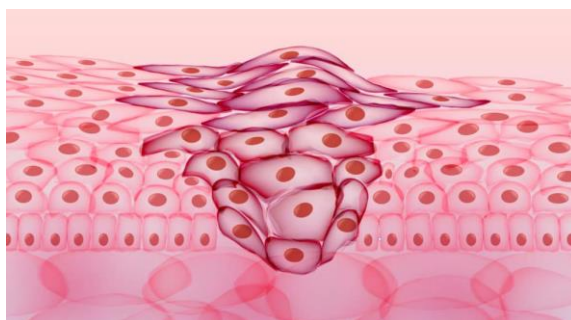


Figura 11: Representació d'un teixit amb una cèl·lula cancerosa que s'ha dividit exponencialment creant un tumor

Font: <https://researchoutreach.org/articles/inhibiting-cancer-stem-cell-survival/>

¹² Algunes condicions desfavorables podria ser, per exemple dividir-se si el DNA té desperfectes, o dividir-se quan no hi ha lloc per més cèl·lules en el teixit.

2.3.1 LA REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR PER FACTORS EXTERNS

Tant la iniciació com la inhibició de la divisió cel·lular poden ser provocades per factors externs a la cèl·lula. Aquests factors poden ser tant simples com la mort d'una cèl·lula propera, o tant complexos com l'alliberament d'hormones¹³ que promouen el creixement. L'aglomeració de cèl·lules també pot inhibir la divisió cel·lular, i altres factors com l'excés de mida de la cèl·lula també provoquen la divisió cel·lular (7).

2.3.2 LA REGULACIÓ INTERNA DEL CICLE CEL·LULAR A TRAVÉS DE CHECKPOINTS

Una cèl·lula es divideix en dues cèl·lules diferents, que a la vegada es divideixen en quatre cèl·lules diferents, que es divideixen en vuit cèl·lules diferents, i així progressivament. És per aquest motiu que un sol error en la replicació de la informació genètica d'una cèl·lula, pot resultar catastròfic per l'organisme, ja que aquesta cèl·lula que té l'error, es dividirà fent créixer

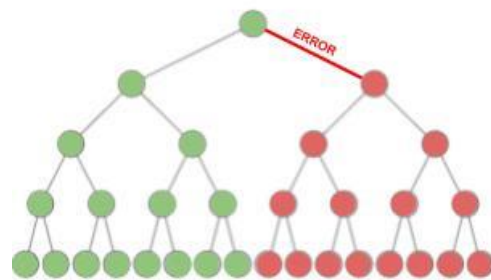


Figura 12: Il·lustració d'una seqüència de cèl·lules entre les quals hi ha hagut un error en la divisió d'una d'elles

Font pròpia

exponencialment el nombre de cèl·lules que tenen un error en la informació genètica (figura 12) (7).

Per evitar aquest fenomen, la cèl·lula està dotada de mecanismes de control interns que controlen que la cèl·lula hagi realitzat tots els processos amb normalitat, abans de passar a una altre fase del cicle cel·lular. Aquests controls interns són anomenats checkpoints (9).

¹³ Substàncies que ens els éssers vius pluricel·lulars regulen i coordinen l'activitat conjunta de les cèl·lules.

2.3.2.1 Els checkpoints

Un checkpoint és un estadi del cicle cel·lular de les cèl·lules eucariotes en el que la cèl·lula examina el seu estat i “decideix” si seguir endavant cap a la propera fase del cicle (9).

Tot i que al llarg del cicle cel·lular hi ha diferents checkpoints, tres d'ells ens són els principals i els més importants (figura 13) (7).

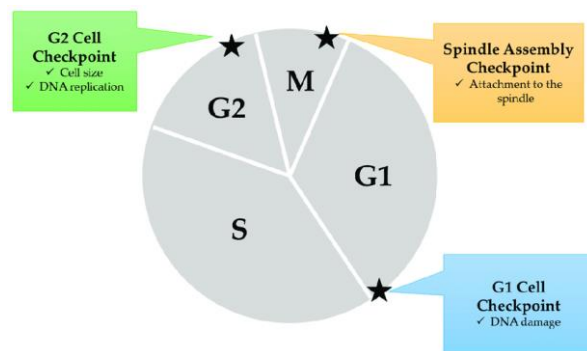


Figura 13: Esquema dels checkpoints principals del cicle cel·lular

Font: https://www.researchgate.net/figure/Cell-cycle-checkpoints-inducing-cell-cycle-arrest-Three-points-in-the-cell-cycle-are_fig1_332992903

2.3.2.2 El checkpoint G1

El checkpoint de la fase G1 es considera el més important i fins i tot, el checkpoint principal del cicle cel·lular. Això és degut a que passat aquest checkpoint, la cèl·lula es compromet irreversiblement al procés de divisió cel·lular (7). En aquest checkpoint es mira que la mida de la cèl·lula sigui suficientment gran com per donar lloc a dues cèl·lules filles diferents, es comprova que les reserves energètiques siguin suficients com per acabar sense problema el procés de divisió cel·lular, i es revisa el DNA de la cèl·lula per tal d'assegurar que no hi hagi danys (figura 14) (7).

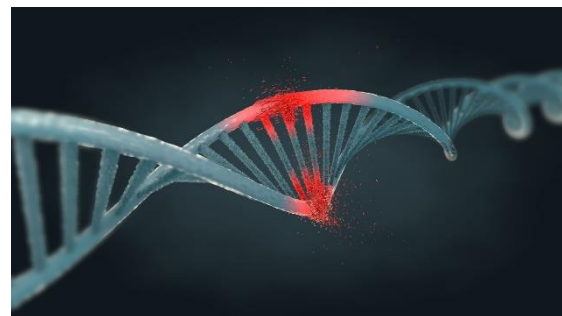


Figura 14: Representació d'una cadena de DNA danyada

Font: <https://blog.crownbio.com/dna-damage-response>

En cas de que una cèl·lula no compleixi tots els requisits, no podrà avançar a la següent fase del cicle. En aquest cas la cèl·lula pot intentar reparar les condicions problemàtiques o pot canviar a fase G0 indefinidament i esperar a futurs senyals per quan les condicions millorin (10).

2.3.2.3 El checkpoint G2

Aquest checkpoint regula l'entrada de la cèl·lula a la mitosi. Igual que en el checkpoint de la fase G1, aquest checkpoint revisa la mida de la cèl·lula i les reserves energètiques per assegurar que ambdues siguin suficients com per superar la divisió cel·lular amb èxit (7). Tanmateix, el paper més important d'aquest checkpoint és assegurar-se de que tot el DNA ha estat replicat correctament, i no hi ha danys (9).

Si es detecten problemes en el DNA, la cèl·lula atura el cicle i intenta completar la replicació del DNA (en cas de que l'error es degui a que la replicació no ha estat finalitzada) o reparar el DNA danyat (en cas de que l'error es degui a un error en la replicació de la informació genètica) (7).

En cas de que la cèl·lula sigui incapaç de reparar els danys en el DNA, la cèl·lula pot entrar en apoptosi¹⁴ (figura 14) (9).

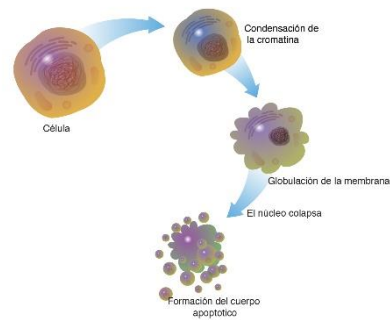


Figura 15: Esquema del procés d'apoptosi

Font: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Apoptosis>

2.3.2.4 El checkpoint M

Aquest checkpoint es situa al final de la metafase de la mitosi, i revisa que totes les cromàtides del cromosomes estiguin enganxades correctament als microtúbuls del fus mitòtic. L'anafase¹⁵ és un pas irreversible, i per això la cèl·lula

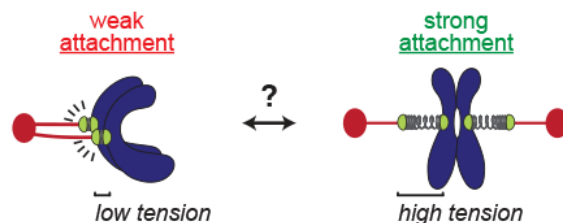


Figura 16: Representació d'un cromosoma ben enganxat a les fibres del fus mitòtic, i d'un que no ho està

Font: <https://www.miller.biochem.utah.edu/research>

n'ha d'assegurar el correcte desenvolupament. El checkpoint M només donarà pas a l'anafase si tots els cinetocors estan enganxats a un mínim de dues fibres del fus mitòtic de pols oposats de la cèl·lula (figura 16) (7).

¹⁴ Eliminació de cèl·lules velles o danyades per part del propi organisme, també es coneix com a mort cel·lular programada.

¹⁵ Fase de la mitosi en la que es separen les cromàtides germanes. (vegeu punt 1.2.1)

2.3.3 MOLÈCULES REGULADORES DEL CICLE CEL·LULAR

Hi ha dos grups de molècules intracel·lulars que regulen el cicle cel·lular. Aquestes molècules poden actuar fent avançar la cèl·lula cap a la següent fase (regulació positiva), o fent que la cèl·lula aturi el seu cicle cel·lular (regulació negativa) (7).

2.3.3.1 Regulació positiva del cicle cel·lular

Hi ha dos grups de proteïnes que són responsables de l'avanç del cicle cel·lular a través de diversos checkpoints, les ciclines i les CDKs (Cyclin-Dependent Kinases) (7).

Els CDK i les ciclines són tipus de proteïnes que s'activen quan s'uneixen, i activen altres proteïnes necessàries per fer progressar el cicle cel·lular. (vegeu punt 1.3.3.2)

Hi ha quatre tipus de ciclines que varien la seva concentració al llarg del cicle cel·lular de manera ordenada i predictable (figura 17) (7).

El pic de l'acumulació de ciclines (figura 17) mantenen una relació directa amb la localització dels checkpoints del cicle cel·lular (7).

L'augment de la concentració de ciclines és provocat tant per senyals interns com per senyals externs a la cèl·lula.

Una vegada la cèl·lula passa

de fase del cicle cel·lular, les ciclines activades en la fase anterior es desintegren, reduint dràsticament la seva concentració (7).

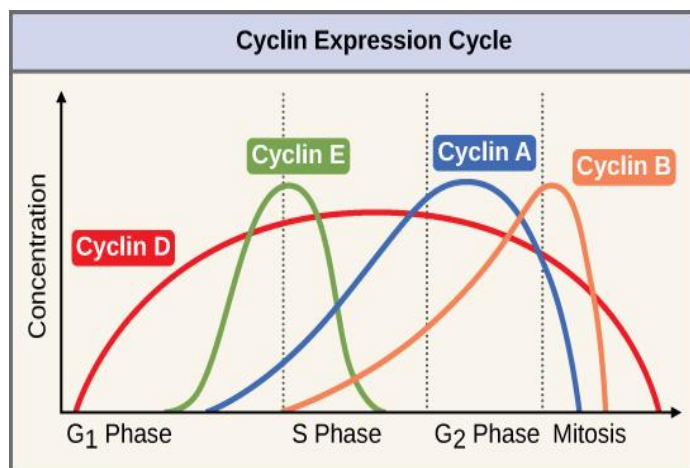


Figura 17: Esquema de la concentració de les diferents ciclines al llarg del cicle cel·lular

Font: <https://courses.lumenlearning.com/suny-biology1/chapter/control-of-the-cell-cycle/>

2.3.3.2 Funcionament del complex ciclina/CDK

Els CDKs (Cyclin-Dependent Kinases) són activats per les ciclins que tenen un paper important pel que fa al control del cicle cel·lular (11). En els organismes que tenen diferents tipus CDKs, cada un s'uneix a un tipus específic de ciclina, anomenem complex ciclina/CDK al conjunt resultant de la unió entre una ciclina i un CDK (figura 18). Com totes les cinases¹⁶, els CDK són proteïnes que tenen la funció de fosforitzar¹⁷ altres proteïnes activant-les o desactivant-les (7).

A diferència de les ciclins, els CDKs existeixen en quantitats similars al llarg del cicle cel·lular. Aleshores, quan en un punt determinat del cicle cel·lular, la concentració d'un tipus de ciclina augmenta, aquestes es van unint progressivament als CDKs corresponents al tipus de ciclina, fent que s'activin. Aleshores el complex ciclina/CDK és actiu, i fosforitza a diverses proteïnes que són necessàries per fer que la cèl·lula passi de fase del cicle cel·lular (figura 19). Un cop totes les proteïnes necessàries són activades i la cèl·lula ha passat de fase, les ciclins que havien augmentat la concentració es desintegren, desfent els complexos ciclina/CDK i inactivant els CDKs (figura 19) (7).



Figura 18: Representació d'una ciclina unida a un CDK

Font: https://moodle.asignaturas.usb.ve/pluginfile.php/62084/mod_resource/content/1/Unidad%20III.%20Ciclo%20celular%20v%20c%3%A1ncer%2028Parte%201%20v%202%29.pdf

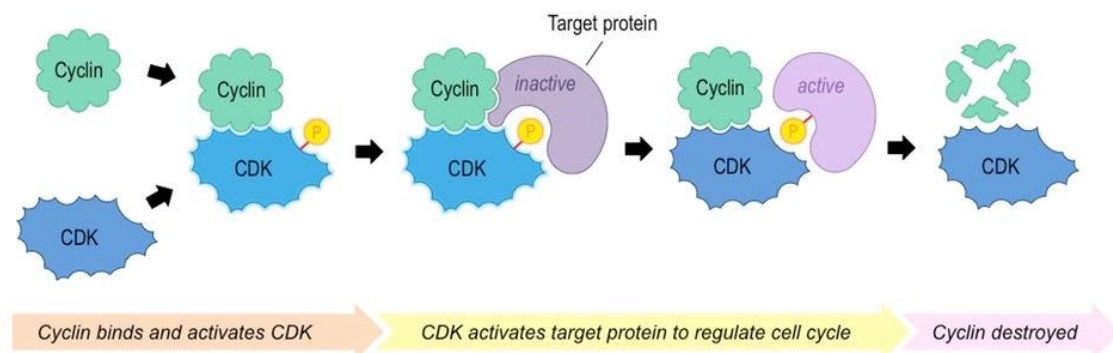


Figura 19: Esquema de la formació, funció i desintegració d'un complex ciclina/CDK.

Font: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cyclins.html>

¹⁶ Tipus de proteïna (un enzim) que afegeix grups fosfats a altres molècules, generalment proteïnes, canviant-ne així la seva forma, de manera que s'activen o es desactiven.

¹⁷ Afegir grups fosfats a altres molècules, canviant-ne així la seva forma, de manera que s'activen o es desactiven.

2.3.3.3 La CDK 1 i CDK 2 al llarg del cicle cel·lular

La CDK1 i la CDK2 tenen un paper fonamental en el cicle cel·lular, i a la vegada, van bastant lligades una amb l'altre. Ambdós tipus de CDK poden realitzar diferents funcions segons la ciclina a la que s'uneixen. Tant la CDK1 com la CDK2 es poden unir a les ciclins A, B, D, i E. Tot i així, la CDK1 mostra tendència a unir-se més sovint amb la ciclina B, i la CDK2 mostra més tendència a unir-se amb les ciclins A i E (figura 20) (11).

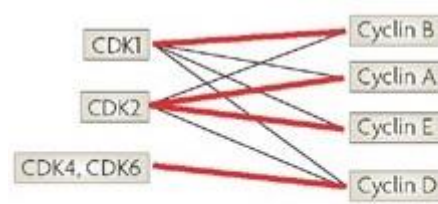


Figura 20: Esquema de la unió de cada CDK, amb les diferents ciclins, representant amb una línia vermella aquelles unions que són més freqüents.

Font: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cdk-14046166/>

Els complexos¹⁸ ciclinaA-CDK1 i ciclinaA-CDK2 regulen el desenvolupament de la fase S, i l'entrada a la fase G₂ (11), i el complex ciclinaB-CDK1 té un paper fonamental en l'entrada de la cèl·lula a la mitosi (12).

Així doncs, el complex ciclina-CDK més transcendents en cada fase del cicle cel·lular venen representats per el següent esquema (figura 21):

En l'esquema (figura 21) s'observa com, els CDK1 i CDK2, que són l'objecte d'estudi d'aquest treball, tenen gran importància en la progressió de les fases S, G₂, i M.

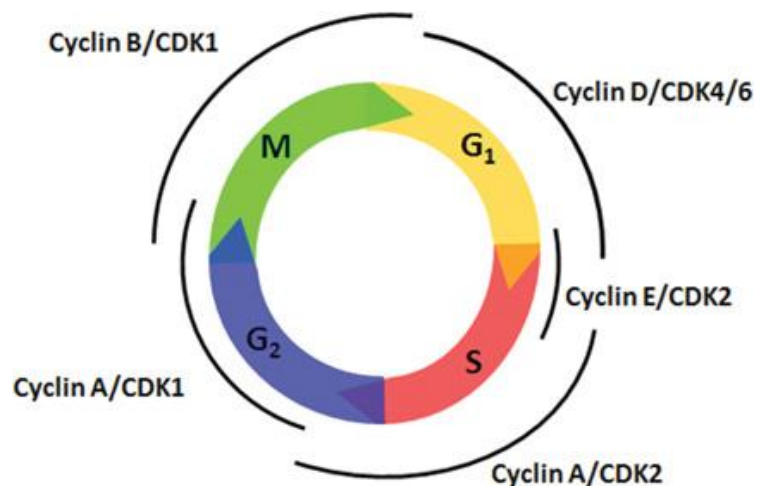


Figura 21: Representació dels principals complexos ciclina/CDK que actuen en cada fase del cicle cel·lular

Font: https://www.researchgate.net/figure/Cyclin-CDK-regulation-of-the-mammalian-cell-cycle-The-cell-cycle-consists-of-a-DNA_fig1_42587723

¹⁸ En aquest cas anomenem complex la unió de una ciclina amb un CDK. Els complexos específics s'anomenen amb el tipus de ciclina que el forma, seguit de un guionet i el tipus del CDK que el forma. (ex. ciclinaA-CDK2, aquest complex és la unió de la ciclina A, i de un CDK2)

3. EL CÀNCER

Com s'ha explicat en els apartats anteriors, la cèl·lula segueix un cicle ordenat i previsible a l'hora de dividir-se. Tot i així, en algunes cèl·lules s'altera algun element essencial per mantenir aquest ordre, i fan el cicle cel·lular sense control. Són precisament aquestes cèl·lules, les que acabaran formant un càncer (13).

Ens referim a càncer, al conjunt de malalties relacionades, en les que, algunes de les cèl·lules del cos humà, es comencen a dividir sense control, i es disseminen a teixits propers (14).

En qualsevol cèl·lula del nostre organisme es pot iniciar un procés cancerós, tot i que algunes cèl·lules són més propenses que d'altres a originar càncers. En un funcionament correcte del nostre cos, les cèl·lules es divideixen per reemplaçar aquelles cèl·lules més velles o danyades. Així es manté la quantitat de cèl·lules i de teixit que hi ha al cos d'una persona (excepte en fases de creixement), però els teixits es renoven contínuament (14).

En el càncer, però, aquest procés ordenat es descontrola completament, i aquelles cèl·lules més velles o danyades sobreviuen quan haurien de morir, i es divideixen sense pausa, encara que no sigui necessari. Això provoca una sobreacumulació de cèl·lules, que creen una massa anomenada tumor¹⁹ (figura 22). Tot i que la

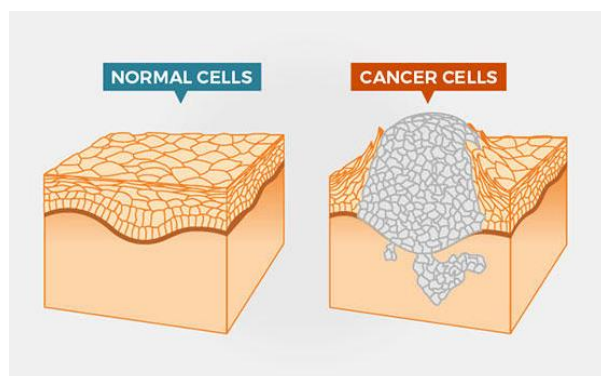


Figura 22: Representació d'un teixit normal i d'un teixit amb un tumor format per cèl·lules canceroses.

Font: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

majoria de càncers si que en formen, no tots els càncers formen tumors sòlids, com és el cas de la leucèmia (14).

¹⁹ Anomenem tumor a qualsevol alteració dels teixits que provoca un augment de volum. Contràriament al que gran part de la població creu, un tumor no necessàriament és càncer, ni ha d'estar format per cèl·lules.

No tots els tumors, però, són cancerosos. Els tumors cancerosos són els tumors malignes, que tenen la capacitat de disseminar-se a teixits propers i en els que algunes cèl·lules es poden despendre i viatjar a altres parts del cos formant un nou tumor (anomenat metàstasi) lluny del tumor original (figura 23).

Contraris als tumors malignes, hi ha els tumors benignes, que en general solen representar menys perill per al pacient (14).



Figura 23: Dibuix comparatiu d'un tumor benigne i un tumor maligne. Els tumors benignes són localitzats, no es disseminen i no afecten ni envaeixen els teixits propers. En canvi, les cèl·lules dels tumors malignes es caracteritzen per disseminar-se per diferents teixits i per la gran capacitat d'expansió.

Font: <https://curiosoando.com/que-es-un-tumor-benigno>

Un tumor s'inicia amb una sola cèl·lula alterada, que expressi un oncogen²⁰. Aquesta cèl·lula començarà una cadena de divisions que multiplicarà exponencialment el número de cèl·lules canceroses. Que a la vegada, degut a la gran capacitat de divisió i a la falta de control del cicle cel·lular, formaran noves mutacions (figura 24). Així cada vegada les cèl·lules canceroses es diferencien més a les cèl·lules normals (15).

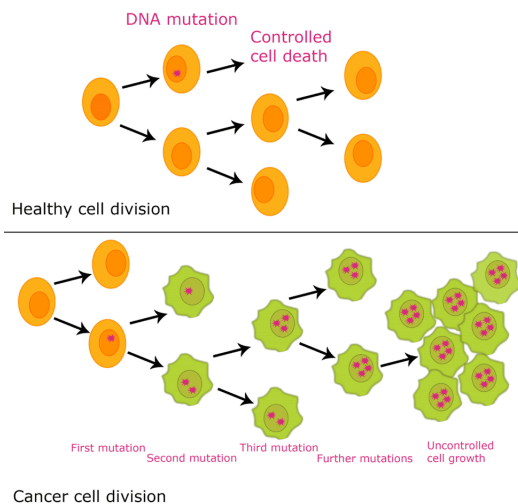


Figura 24: Representació de la cadena de divisions d'una cèl·lula cancerosa, i de l'acumulació de mutacions al llarg d'aquestes divisions.

Font: <https://stayrelevant.globant.com/en/cancer-management-through-genomics-study/>

²⁰ Gen que participa en el creixement i regulació del cicle de les cèl·lules normals, però la seva forma ha resultat alterada degut a una mutació. Els oncogens són, per tant, gens alterats que acaben en el desenvolupament d'un càncer.

3.1 LES CÈL·LULES CANCEROSSES

Les cèl·lules canceroses es diferencien en molts aspectes de les cèl·lules normals (figura 25). Aquestes diferències són les que les permeten els permeten dividir-se sense pausa, sense que els falti nutrients ni diversos recursos (14).

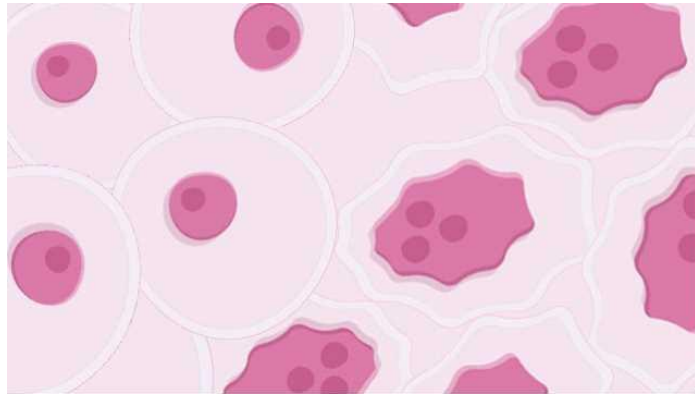


Figura 25: Representació de cèl·lules normals (a l'esquerra) en comparació a la representació de cèl·lules canceroses (a la dreta).

Font: <http://www.news-courier.com/cancer-research/articles/cancer-cells-vs-normal-cells-307366>

Algunes de les diferències de les cèl·lules canceroses respecte les cèl·lules normals són:

CREIXEMENT: Les cèl·lules normals es paren de dividir quan la seva funció ja ha estat completada, o quan no hi ha suficient espai al medi en el que s'han de dividir. Tot i així, les cèl·lules canceroses, degut a alteracions en els gens reguladors del creixement de la cèl·lula, no deixen de dividir-se, encara que no tinguin espai suficient. D'aquesta manera es sol formar un excés de cèl·lules que acabarà formant un tumor (16).

COMUNICACIÓ: Les cèl·lules canceroses no es comuniquen amb les cèl·lules normals que les envolten. Això fa que tinguin la capacitat d'ignorar els senyals externs que la resta de cèl·lules envien, que moltes vegades són avisos per aturar el creixement de la cèl·lula (16).

MORT CEL·LULAR: Quan les cèl·lules normals presenten danys en alguna part, aquests són reparats, o bé, la cèl·lula entra en procés d'apoptosi. Les cèl·lules canceroses, però, degut a les mutacions que presenten i a diversos factors, no reparen els danys que tenen ni tampoc entren en apoptosi (16), formant cèl·lules que, si no fos per factors externs, serien immortals.

ADHERÈNCIA I CAPACITAT METASTÀTICA: Les cèl·lules normals secreten una substància que les fa adherir entre elles, fent que s'enganxin i s'agrupin. Les cèl·lules canceroses no secreten aquesta substància, o ho fan amb menys intensitat, fent que les cèl·lules envaeixin els teixits propers (tret característic dels tumors malignes), i que fàcilment es desprenguin i circulin pel torrent sanguini per desplaçar-se a altres punts del cos (16), fent que es pugui formar un nou tumor, semblant al primer, en un punt llunyà d'aquest. Aquest nou tumor se l'anomena metastasi.

ASPECTE: Sota el microscopi, les cèl·lules canceroses presenten un aspecte diferent a les cèl·lules normals (figura 26). La forma de les cèl·lules normals sol ser regular, és a dir, en un teixit, totes solen presentar la mateixa forma. En canvi, les cèl·lules canceroses presenten formes i mides irregulars, tan de la cèl·lula, com del nucli cel·lular (16).

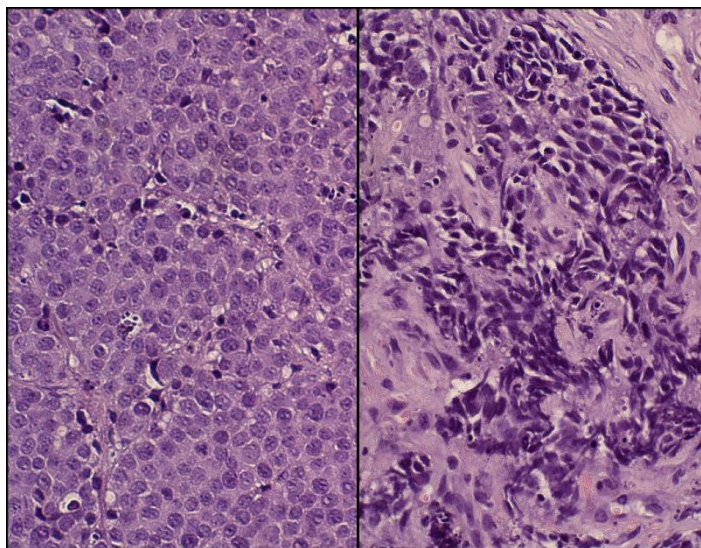


Figura 26: Imatge comparativa d'un cultiu cel·lular de cèl·lules de pròstata normals i un cultiu cel·lular de cèl·lules de pròstata canceroses vist a través d'un microscopi òptic.

Font: <https://blog.cirm.ca.gov/2016/04/04/new-developments-in-prostate-cancer-from-ucla/>

A més a més, les cèl·lules canceroses solen presentar un nucli molt més gran comparat al de els cèl·lules normals, i en la majoria de tincions²¹ apareix més fosc (16).

DIFERENCIACIÓ: Com que les cèl·lules canceroses es divideixen tan ràpid, ho fan fins i tot abans que la cèl·lula acabi de madurar i de diferenciar-se. Això fa que les cèl·lules canceroses siguin molt menys diferenciades (16).

²¹ Al microscopi òptic, les mostres es solen tenyir, amb diferents tints que acolorixen molècules específiques.

EVITACIÓ DEL SISTEMA IMMUNITARI: Les cèl·lules canceroses tenen la capacitat d'evitar les cèl·lules del sistema immunitari que reconeixen i destrueixen les cèl·lules danyades. A més a més, tenen la capacitat de secretar substàncies químiques que inhibeixen a les cèl·lules del sistema immunitari que s'apropen al tumor (16).

FUNCIÓ: Les cèl·lules normals tenen un seguit de funcions específiques en el teixit del que en formen part. Les cèl·lules canceroses, en canvi, tenen grans mancances a l'hora de fer aquesta funció. D'aquesta manera, el pacient, tot i presentar un excés en un teixit concret (l'afectat per càncer), té un dèficit en la funció que fan les cèl·lules d'aquest teixit (16).

Ex. Per exemple, els leucòcits de la sang, ens ajuden a protegir-nos contra infeccions. Els pacients de leucèmia (tipus de càncer que afecta als glòbuls blancs), presenten una alta concentració de leucòcits en sang, però tot i així són més sensibles a les infeccions. Això és perquè els leucòcits cancerosos no exerceixen la seva funció de leucòcit.

SUBMINISTRAMENT SANGUINI: Les cèl·lules canceroses tenen la capacitat de induir l'angiogènesi²² (figura 27), per tal d'assegurar el subministrament dels nutrients i elements necessaris per al seu ràpid metabolisme (16).

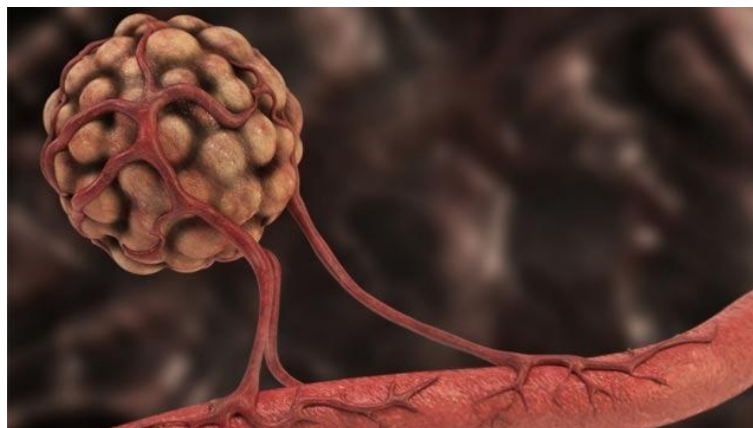


Figura 27: Tumor maligne envoltat de vasos sanguinis induïts per les pròpies cèl·lules tumorals

²² Procés de generació de nous vasos sanguinis.

ALTRES DIFERÈNCIES:

- Moltes de les cèl·lules canceroses presenten mutacions en els gens que codifiquen per supressors tumorals²³ (16).
- Les cèl·lules canceroses produeixen gran part de la seva energia per glicòlisi²⁴, a diferència de les cèl·lules normals, les quals treuen la major part de l'energia a través del cicle de Krebs²⁵ (16).
- Les cèl·lules canceroses tenen un enzim anomenat telomerasa, que allarga els telòmers²⁶ dels cromosomes (figura 28), fent que aquestes cèl·lules esdevinguin cèl·lules immortals (16).

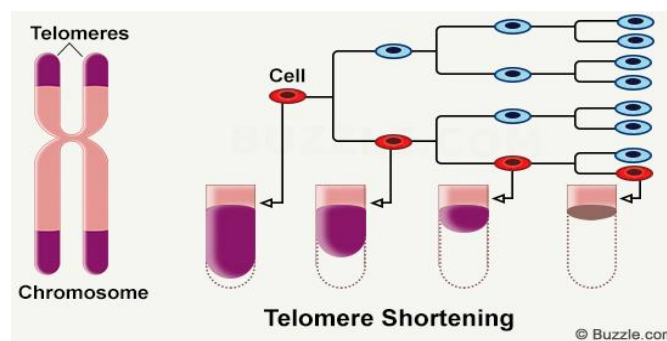


Figura 28: Representació d'un cromosoma amb els telòmers pintats de color més fosc, i representació de l'escurçament que pateixen els telòmers en cada divisió de la cèl·lula

Font: <https://parentsquidecordblood.org/es/node/17877>

- Algunes cèl·lules tumorals resisteixen al tractament, i es reactiven al cap d'uns anys, formant un nou tumor (16).
- Les cèl·lules tumorals presenten una gran inestabilitat genòmica, és a dir, solen tenir un número irregular de cromosomes i presenten una gran quantitat de mutacions, degut a la manca de regulació que tenen durant la divisió (16).

²³ Proteïnes que controlen el creixement i la divisió cel·lular.

²⁴ Via metabòlica per la qual una molècula de glucosa és oxidada fins a dues molècules de piruvat. En aquest procés s'alliberen 2 molècules d'ATP (que són la font d'energia universal de la cèl·lula). Malgrat ser menys eficient en la producció d'ATP, la glicòlisi és més ràpida que la producció de molècules d'ATP a través del cicle de Krebs.

²⁵ Via metabòlica que forma part de la respiració cel·lular en totes les cèl·lules aeròbiques. És un conjunt de reaccions que alliberen 36 molècules d'ATP.

²⁶ Els telòmers són una part del cromosoma que s'escurça cada vegada que la cèl·lula es divideix (figura 28). Quan els telòmers són massa curts, la cèl·lula no pot dividir-se més, i acaba morint. L'allargament dels telòmers, és, doncs, una manera de fer que la cèl·lula es pugui continuar dividint per sempre.

4. FÀRMACS ESTUDIATS

4.1 EL CISPLATÍ

El cisplatí, o cis-diaminodicloroplatí(II), és compost de coordinació metàl·lic²⁷, amb una geometria quadrada plana²⁸ (figura 29) (17).

La molècula va ser sintetitzada per primera vegada l'any 1844, i la seva estructura química va ser descrita l'any 1893. Tot i així, el compost no va guanyar interès científic fins la dècada del 1960 quan les observacions, fetes per Rosenberg a la Universitat de Michigan State, mostraven que aquesta molècula era capaç d'inhibir la divisió cel·lular en algunes cèl·lules (17).

Això va crear un gran interès en la possible utilització d'un tractament pel càncer basat en aquesta molècula (17).

El cisplatí ha resultat extremadament interessant ja que ha mostrat activitat anticancerosa en una gran varietat de tipologia de càncers. Això va fer que el cisplatí es convertís en una de les quimioteràpies més utilitzades per combatre el càncer (17).

Tot i així s'ha vist que el cisplatí provoca resistències al fàrmac, i causa molts efectes secundaris a més a més de causar toxicitat renal (17).

4.1.1 MECANISMES MOLECULARS DEL CISPLATÍ

El cisplatí entra a la cèl·lula a través de proteïnes transportadores de membrana²⁹ (CTR1), de tal manera que l'absorció de cisplatí a la cèl·lula ve determinada per aquestes proteïnes de membrana. S'ha vist que el cisplatí desencadena la ràpida degradació de les proteïnes de membrana que l'absorbeixen (CTR1), de tal manera que al llarg del temps, el propi fàrmac fa que les cèl·lules l'absorbeixin amb menys abundància, creant resistències (17).

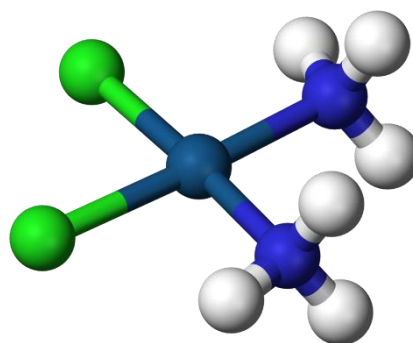


Figura 29: Representació de la molècula de cisplatí, amb els àtoms dels diferents elements pintats de diferents colors.

Font: <https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Cisplatin-3D-balls.png>

²⁷ Estructura composta per un àtom central unit a una sèrie de molècules o anions.

²⁸ Tipus de disposició espacial dels àtoms d'una molècula, en el que els àtoms estan col·locats a les cantonades d'un quadrat que està al mateix pla que l'àtom central.

²⁹ Proteïnes que faciliten l'entrada d'alguna substància externa a dins la cèl·lula.

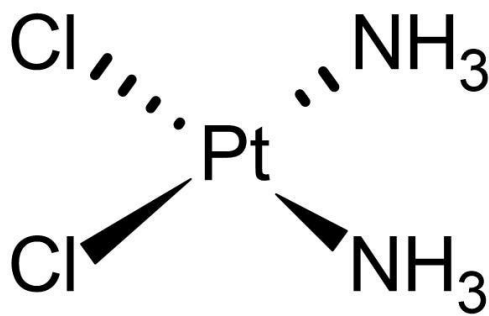


Figura 30: Estructura química de la molècula de cisplatí.

Font: <https://www.abcam.com/cisplatin-antineoplastic-agent-ab141398.html>

El cisplatí és activat quan entra a la cèl·lula. Una vegada al citoplasma, els àtoms de clor de la molècula (figura 30) són substituïts per molècules d'aigua, formant un electròfil³⁰ potent que pot reaccionar amb qualsevol nucleòfil³¹, incloent alguns grups químics de les proteïnes i dels àcids nucleics³². Aleshores, el cisplatí s'uneix a les purines³³ del DNA de les cèl·lules canceroses,

provocant danys en aquest. D'aquesta manera es bloqueja la replicació del DNA i la divisió de la cèl·lula, resultant en l'entrada de la cèl·lula en apoptosi (17).

A més a més, el cisplatí indueix estrès oxidatiu³⁴ a la cèl·lula, (l'exposició a l'estrès oxidatiu pot alterar els processos biològics), i indueix espècies reactives de l'oxigen que provoquen danys en el DNA i la mort cel·lular (17).

4.2 INHIBIDORS DE CDK

La proliferació excessiva de les cèl·lules és una de les causes de càncer, motiu pel qual, la inhibició de la divisió cel·lular és una diana efectiva pel tractament del càncer. Com ja s'ha esmentat en aquest treball (punt 1.3.3), el complex ciclina/CDK té un paper imprescindible en la divisió cel·lular. És per això que s'estan realitzant diversos estudis que involucren la inhibició de CDKs com a tractament del càncer. Actualment ja s'han aprovat els inhibidors de CDK4 i CDK6 com a tractament d'alguns tipus concrets de càncer, però aquest camp segueix essent un camp de recerca obert (18).

Els inhibidors són proteïnes o molècules que s'ajunten amb la proteïna que inhibeixen per tal de fer que aquesta perdi la funció que té a la cèl·lula. D'aquesta manera, al inhibir els CDKs, aquests perden la seva funció i la cèl·lula no supera els checkpoints, fent que entri en apoptosi (18).

³⁰ Reactant químic que no contribueix amb electrons a la formació d'un enllaç covalent amb un altre reactant.

³¹ Reactant químic que contribueix amb electrons a la formació d'un enllaç covalent amb un altre reactant.

³² Biomolècules orgàniques encarregades d'emmagatzemar la informació genètica. N'hi ha de dos tipus fonamentals, el DNA i l'RNA.

³³ Compostos orgànics bicíclics (per dos anells units entre si. Dues de les bases nitrogenades dels àcids nucleics són purines: l'adenina i la guanina.

³⁴ Fenomen causat per un desequilibri entre la producció d'oxigen reactiu i la capacitat d'un sistema biològic de desintoxicar ràpidament els reactius intermedis.

5. LA CITOMETRIA DE FLUX

La citometria de flux és una tecnologia que permet analitzar i quantificar diverses característiques de les cèl·lules (19). Aquesta prova mesura, i detecta característiques físiques i químiques d'un conjunt de cèl·lules o de partícules suspeses en un fluid, fent-les passar per un feix de llum (20).

5.1 EL CITÒMETRE DE FLUX

El citòmetre de flux es aparell format per tres sistemes diferents, un sistema de fluids, un sistema òptic, i un sistema electrònic (19).

El sistema de fluids alinea i transporta les cèl·lules cap al feix de llum, és per això que és necessari que la mostra estigui suspesa en un fluid. Per tal d'alinear les cèl·lules i aconseguir que passin per feix de llum d'una en una, s'aplica una propietat hidrodinàmica, que consisteix en la injecció de la mostra en el centre d'una corrent de líquid que flueix ràpidament (figura 31) (19). El flux està dispostat de tal manera que hi hagi una gran separació entre les cèl·lules, i un mecanisme de vibració obliga el flux de cèl·lules a trencar-se en gotes individuals, de tal manera que hi ha una probabilitat molt baixa de que hi hagi més d'una cèl·lula en cada una de les gotes (figura 31) (20).

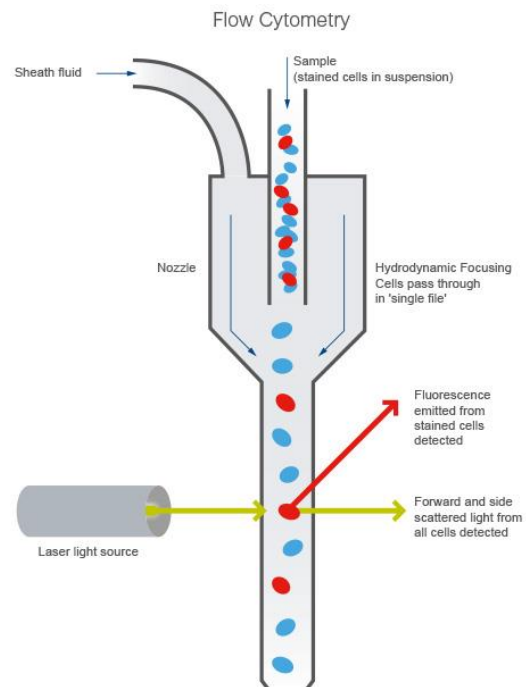


Figura 31: Esquema del funcionament del sistema de fluids d'una citometria de flux.

Font: <https://www.mybiosource.com/learn/testing-procedures/flow-cytometry/>

El sistema òptic està compost per làsers i filtres que s'encarreguen d'il·luminar les cèl·lules i dirigir els senyals resultants cap als detectors pertinents. Un cop la llum incideix sobre les cèl·lules, aquesta es dispersa segons la seva mida i la

seva rugositat. A més a més, es poden utilitzar marcadors fluorescents³⁵ que quan són excitats per la llum emeten llum amb una certa longitud d'ona. Això permet detectar estructures específiques de les cèl·lules com per exemple si tenen determinades proteïnes o quina quantitat d'una certa proteïna tenen (19).

Una vegada la cèl·lula ha passat pel feix de llum i s'ha generat un senyal lluminós, aquest ha de ser traduït a senyals elèctrics, per tal de poder analitzar els resultats. Per fer-ho, hi ha uns sensors lluminosos que converteixen els fotons en electrons i aquests en senyals elèctrics. Finalment els senyals elèctrics seran transportats a un ordinador que els traduirà en gràfics i histogrames (19).

A més a més, després d'haver passat pel feix de llum, els marcadors fluorescents (que indiquen la presència de determinades molècules o estructures) són excitats, de tal manera que alliberen llum amb una longitud d'ona determinada. Un detector recull aquesta informació, de tal manera que es pot detectar clarament quines cèl·lules tenen aquestes molècules, i amb quina quantitat (20).

5.2 EL IODUR DE PROPIDI

El iodur de propidi (figura 32) és una tinció popular de color vermell fluorescent que teneix els àcids nucleics de la cèl·lula. El iodur de propidi s'uneix al DNA intercalant-se entre les bases nitrogenades de les dobles cadenes d'aquest. Quan aquesta substància és excitada, emet llum amb una longitud d'ona determinada (21). El iodur de propidi, però, no penetra en les cèl·lules amb una membrana cel·lular intacta, de manera que no més penetra en les cèl·lules mortes, la membrana de les quals falla, i permet l'entrada del iodur de propidi (22).

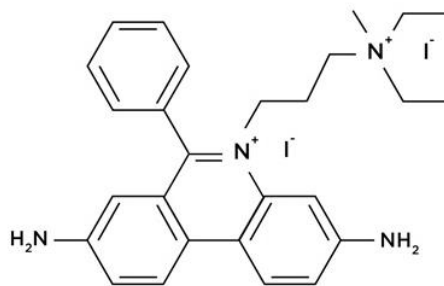


Figura 32: Estructura química del iodur de propidi

Font:
<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.beckman.es%2Freactants%2Fcounters-flow-cytometry%2Fcell-health-research-assays%2Fpropidium-iodide-spectrum&psig=AOvVaw0wmCdyN0WRX0Bvd7QldXm5&ust=1635675174610000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQIRxqFwoTCNj2htP48fMCFQAAAAAdAAAAABAJ>

³⁵ Els marcadors fluorescents són excitats amb una longitud d'ona determinada i específica de cada marcador. D'aquesta manera, es pot estudiar un marcador concret, exposant la mostra a la longitud d'ona la qual s'excita el marcador estudiat.

6. ESTUDI DELS INHIBIDORS DE CDK1/2

6.1 PLANTEJAMENT DE L'EXPERIMENT

Per respondre als objectius d'aquest treball, s'ha realitzat un experiment, en el qual s'han fet 18 cultius cel·lulars *in vitro* de cèl·lules de càncer de mama de ratolí, que s'han separat en 6 grups diferents, amb diferents variables per tal de tenir uns resultats més concrets.

GRUP 1 (grup control 24h):

Aquest grup consta de 4 mostres de cèl·lules canceroses, que hem deixat créixer durant 24 hores a 37°C de temperatura, sense ser tractades amb cap fàrmac. L'objectiu de fer un grup control és poder comprovar l'efectivitat del fàrmac, comparant com d'afectades queden les cèl·lules després de ser tractades, amb el seu creixement normal.

GRUP 2 (grup inhibidors de CDK1/2 24h)

Aquest grup està format per 4 mostres de cèl·lules canceroses, les quals se'ls ha afegit inhibidors de CDK 1 i inhibidors de CDK 2, i se'ls ha deixat actuar durant un temps de 24 hores a 37°C de temperatura. Amb aquest grup es vol estudiar l'efecte dels inhibidors de CDK a les cèl·lules, quan ja fa un cert temps que estan actuant.

GRUP 3 (grup cisplatí 24h):

Aquest grup està format per 4 mostres de cèl·lules canceroses, les quals, se'ls ha afegit cisplatí i s'ha deixat actuar durant 24 hores a 37°C. Amb aquest grup es vol tenir un grup amb un fàrmac ja utilitzat per combatre el càncer, per tal de poder comparar l'efecte dels inhibidors de CDK1/2 amb un altre fàrmac.

GRUP 4 (grup control 14h)

Aquest grup consta de 2 mostres de cèl·lules canceroses, les quals hem deixat créixer durant 14 hores a 37°C de temperatura sense ser tractades. Aquest grup permet comparar l'estat normal de les cèl·lules, amb l'estat en que es troben havent estat tractades amb els diferents fàrmacs.

GRUP 5 (grup mostres tractades 14h)

Aquest grup consta de dues mostres, una d'elles tractada amb cisplatí, i l'altra tractada amb inhibidors de CDK1/2. Aquestes dues mostres es diferencien de les mostres dels grups 2 i 3 en el temps que s'ha deixat actuar el fàrmac. En les cèl·lules d'aquest grup, el fàrmac s'ha deixat actuar durant 14 hores a 37°C de temperatura, amb el que es pretén veure quins són els efectes inicials del fàrmac en les cèl·lules.

GRUP 6 (grup inhibidors de CDK1/2 *release*)

Aquest grup consta de dues mostres, les quals van ser tractades amb inhibidors de CDK 1/2, de la mateixa manera que les mostres del grups 3 i 5. En aquest cas, però, s'ha deixat actuar el fàrmac durant 12 hores a 37°C, i després, s'ha eliminat el fàrmac de la mostra, i s'ha deixat durant 2 hores més sense la presència del fàrmac, a 37°C de temperatura. D'aquesta manera, es pretén estudiar la capacitat de reactivació de les cèl·lules tumorals, i per tant, la capacitat de rebrot del tumor, un cop han estat tractades amb els inhibidors de CDK1/2.

Per veure l'estat de les cèl·lules de les diferents mostres, s'han observat al microscopi. D'aquesta manera es vol deduir, de forma qualitativa, com d'agressius són els inhibidors de CDK1/2 respecte el cisplatí, i també, quantes de les cèl·lules han entrat en mitosi un altre vegada, després de ser tractades.

Després, s'ha fet una citometria de flux amb iodur de propidi³⁶ dels grups de mostres. Segons la quantitat de DNA que contenen les cèl·lules, s'ha pogut decretar en quina fase del cicle cel·lular es troben³⁷, i per tant, es pot saber a quina fase del cicle s'estanquen les cèl·lules abans d'entrar en apoptosi.

A partir dels resultats de les proves anteriors, s'ha volgut analitzar el mecanisme d'acció i l'efectivitat del cisplatí.

³⁶ Amb el iodur de propidi, que tenyeix el DNA, s'ha pogut veure la quantitat de material genètic que tenen les cèl·lules.

³⁷ Si les cèl·lules contenen la quantitat de DNA que pertany a l'espècie de la qual en formen part (en aquest cas el ratolí), podem determinar que la cèl·lula es troba en les fases G0 o G1. Si en canvi, les cèl·lules contenen dues vegades aquesta quantitat, sabem que la cèl·lula ja ha replicat el DNA i està apunt de dividir-se, per tant, podem determinar que la cèl·lula es troba en fase G2 o en fase M. Finalment, si la cèl·lula es troba entre les dues quantitats esmentades anteriorment, sabem que la cèl·lula es troba en procés de replicació del DNA, i per tant, que es troba en fase S.

6.2 PROCEDIMENT DE L'EXPERIMENT

DIA 1

S'ha descongelat una línia cel·lular de cèl·lules de càncer de mama de ratolí en una placa de petri³⁸. I s'ha absorbit el medi de cultiu³⁹ de les cèl·lules (figura 33), per tal de deixar la placa de petri amb les cèl·lules soles.



Figura 33: Procés d'absorció del medi de cultiu d'una placa de petri.

Font: <https://www.freejpg.com.ar/istocksim/506830774?s=1>

Després, s'hi ha afegit 10ml de PBS⁴⁰, s'ha barrejat lleugerament la placa i s'ha tornat a absorbir per fer un rentat a les cèl·lules, i assegurar que no hi quedi medi.

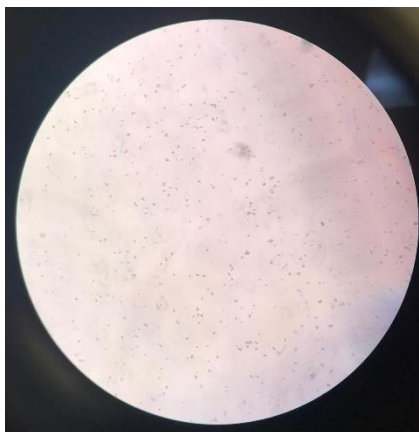


Figura 34: Imatge de cèl·lules al microscopi havent estat tractades amb tripsina.

Font pròpia

Posteriorment, s'ha afegit 1ml de tripsina⁴¹ a la placa de petri, i s'ha deixat actuar durant dos minuts a l'incubador, a 37°C. Al finalitzar els dos minuts, s'ha comprovat al microscopi que les cèl·lules estiguin desenganxades de la placa de petri (figura 34). Aquest procés es fa posant la placa sota el microscopi, i movent-la lleugerament a banda i banda, per observar com les cèl·lules flueixen amb el líquid, i no es queden enganxades a la placa de petri.

Tot seguit, s'ha afegit 9ml de medi de cultiu a la placa de medi, i s'ha barrejat movent-la delicadament. Per tal d'acabar de separar les cèl·lules, amb una pipeta, es pot absorbir i deixar anar la mostra varies vegades sobre la mateixa placa de petri.

³⁸ Recipient rodó, de vidre o poliestirè, i amb tapa del mateix material, que s'utilitza per fer-hi cultius cel·lulars.

³⁹ El medi de cultiu és un líquid que conté tots els nutrients necessaris per la cèl·lula, i ajuden al creixement i manteniment de les cèl·lules. Sol ser d'un color vermellós.

⁴⁰ És una solució aquosa salina que conté alguns compostos i ions, les concentracions de les quals corresponen a les del fluid extracel·lular del cos humà. No és tòxic per la majoria de cèl·lules, i això el fa molt útil.

⁴¹ Enzim que trenca les cadenes peptídiques d'alguns aminoàcids. A més a més té la capacitat de trencar els enllaços entre proteïnes, i per això s'utilitza per evitar unions entre cèl·lules, i per evitar que les cèl·lules s'enganxin a algunes superfícies.

Seguidament, amb l'ajuda d'una pipeta, s'ha absorbit tota la mostra i s'ha posat en un tub d'assaig⁴² amb tapa de 15ml. Després s'ha barrejat una última vegada el contingut del tub, i s'han absorbit 10µl de la mostra, que s'han abocat a una placa del comptador de cèl·lules automatitzat⁴³ (figura 35).



Figura 35: Placa específica del comptador de cèl·lules automatitzat essent inserida a la màquina

Font: http://biorad-ads.com/green/system-tour/TC20/2_1-test-drive.html

Per tal de fer aquesta experiment, s'ha decretat, basant-se en experiències anteriors, que seria adient fer les mostres d'unes 50.000 cèl·lules aproximadament. Així doncs, s'ha fet la següent operació per tal de determinar quants mil·lilitres de mostra inicial cal posar en cada una de les mostres finals, essent λ el nombre de cèl·lules/ml que el comptador de cèl·lules automatitzat ha donat com a resultat.

$$50.000cel. \times \frac{1ml}{\lambda cel.}$$

En aquest cas, la mostra ha resultat ser de $2,01 \times 10^5$ cèl·lules/ml. Per tant, adaptant la fórmula a la mostra, el resultat seria el següent:

$$50.000cel. \times \frac{1ml}{2,01 \times 10^5 cel.} = 0,248ml \approx 0,25ml$$

Per tal de garantir el correcte creixement de les cèl·lules, s'ha volgut posar una quantitat de 2ml a cada una de les mostres, per les quals s'ha realitzat la resta següent: $2ml - 0,25ml = 1,75ml$

En tres plaques de sis cavitats⁴⁴ (figura 36), s'ha afegit 1,75ml de medi de cultiu a cada una de les cavitats, i després s'hi ha afegit 0,25ml de la mostra inicial de cèl·lules canceroses. Finalment s'ha deixat incubar les mostres a 37° durant 48 hores.



Figura 36: Imatge d'una de les plaques de sis cavitats a punt de posar a l'incubador

Font pròpia

⁴² Instrument de laboratori que consisteix en un tub llarg i estret de vidre o plàstic, i que acaba amb una forma arrodonida o cònica.

⁴³ Aquestes plaques són específiques per ser utilitzades al comptador de cèl·lules automatitzat, que al analitzar la mostra, indica la quantitat de cèl·lules/ml.

⁴⁴ Instrument de laboratori que consisteix en una placa de plàstic, amb sis cavitats diferents, el qual s'utilitza per fer cultius cel·lulars diferents, que formen part d'un mateix experiment.

DIA 2

Quaranta-vuit hores després de preparar els cultius cel·lulars, s'han observat les mostres al microscopi per confirmar que les cèl·lules s'han dividit, i per comprovar que es trobin en bon estat.

Posteriorment, les cèl·lules han estat tractades amb els diferents fàrmacs:

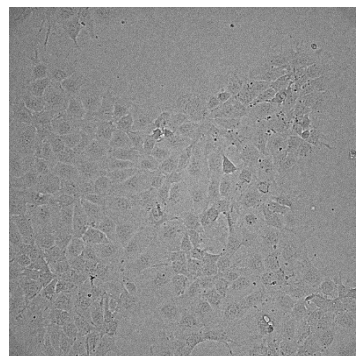


Figura 37: Imatge de les cèl·lules canceroses sota el microscopi.

La solució stock⁴⁵ dels inhibidors de CDK1/2 té una concentració de 9mM⁴⁶. Basat en experiències anteriors, es vol sotmetre les mostres a una concentració de 9-10µM dels diferents fàrmacs, per tal d'observar quin efecte tenen a les cèl·lules. En aquest cas concret, per facilitat de càlcul, s'ha escollit sotmetre les cèl·lules a una concentració de inhibidors de CDK1/2 de 9µM. Així doncs, s'ha fet el següent càlcul per tal de descobrir quin volum de solució stock s'ha de posar a les mostres per obtenir la concentració desitjada:

$$2ml \times \frac{9\mu\text{mols}}{1000ml} \times \frac{1\text{mmols}}{1000\mu\text{mols}} \times \frac{1000ml}{9\text{mmols}} = 0,002ml = 2\mu l$$

La solució stock del cisplatí té una concentració de 1mg/ml i se sap que la massa molar del cisplatí és de 301,1g/mol. En aquest cas, per facilitat de càlcul, s'ha escollit sotmetre les cèl·lules a una concentració de cisplatí de 10µM. Així doncs, s'ha fet un càlcul similar a l'anterior per tal de determinar quin volum de solució stock de cisplatí s'ha d'afegir a les mostres per obtenir la concentració desitjada:

$$\frac{1\text{mg}}{1\text{ml}} \times \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} \times \frac{1\text{mol}}{301,1\text{g}} = 0,00000332\text{mols/ml} = 3,32\text{mmols/l}$$

$$2ml \times \frac{10\mu\text{mols}}{1000ml} \times \frac{1\text{mmols}}{1000\mu\text{mols}} \times \frac{1000ml}{3,32\text{mmols}} = 0,006ml = 6\mu l$$

En conseqüència als resultats obtinguts en les operacions anteriors s'ha afegit les quantitats adients a les diferents mostres.

⁴⁵ Solució estàndard que conté una concentració coneguda d'algun element determinat.

⁴⁶ La molaritat és una unitat de concentració. Així doncs, una mil·lèsima part d'un molar (M) és un milimolar (mM), i una mil·lèsima part d'aquest és un micromolar (µM)

24 hores abans de la preparació per la citometria de flux, s'ha afegit 2µl de solució stock d'inhibidors de CDK1/2 a les mostres del grup 2 (figura 38), i 6µl de solució stock de cisplatí a les mostres del grup 3. Finalment s'han deixat les mostres a l'incubador, a 37°C.

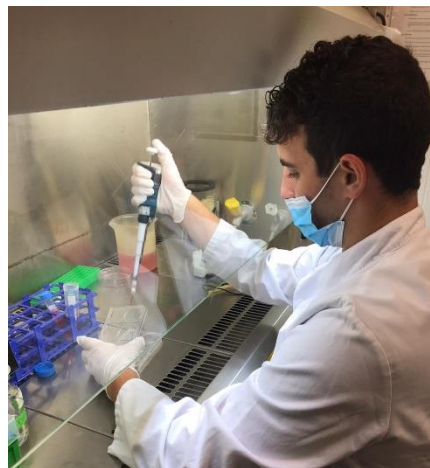


Figura 38: S'està afegint els inhibidors de CDK1/2 a les diferents mostres del grup 2.

14 hores abans de la preparació per la citometria de flux, s'ha afegit 2µl de solució stock d'inhibidors de CDK1/2 a les mostres del grup 6, i a la mostra del grup 5 tractada amb aquest

Font pròpia

fàrmac. També s'ha afegit 6µl de solució stock de cisplatí a la mostra del grup 5 tractada amb cisplatí. Finalment s'han deixat les mostres a l'incubador, a 37°C.

DIA 3

Primerament, 2 hores abans de la preparació per la citometria de flux i per tant 12 hores després d'haver-les tractat, s'ha absorbit el medi de les mostres del grup 6 (que havien estat tractades amb inhibidors de CKD1/2), se'ls ha afegit medi de cultiu nou, sense cap tractament, i se les ha posat a l'incubador, a 37°C durant 2 hores.

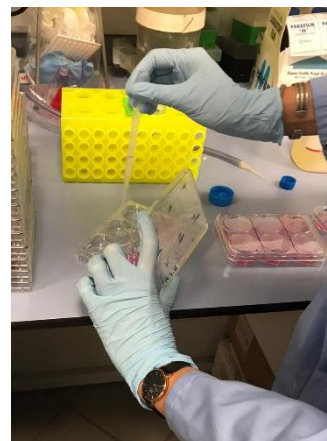


Figura 39: S'està aspirant el medi de les diferents cavitats, per fer el rentat amb PBS

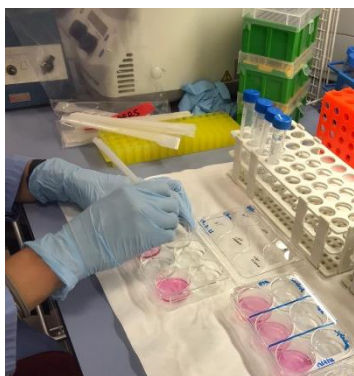


Figura 40: S'està utilitzant un scraper per desenganxar les cèl·lules

Font pròpia

Posteriorment s'han observat els diferents cultius al microscopi, per detectar, qualitativament, com han afectat els diferents fàrmacs a les cèl·lules.

Font pròpia

Després, s'ha aspirat el medi de cultiu de les diferents cavitats de les plaques (figura 39), i s'han fet dos rentats⁴⁷ amb PBS. Havent fet els rentats amb PBS, s'ha afegit una mica de PBS a la mostra i, utilitzant un *scraper*⁴⁸ s'han desenganxat les cèl·lules de les cavitats (figura 40).

⁴⁷ Els rentats amb PBS consisteixen en afegir-hi PBS, barrejar la mostra, i absorbir-lo de nou.

⁴⁸ Instrument de laboratori que és cilíndric però s'aplana a la punta, fent forma d'escarpa.

Seguidament s'ha transferit, mitjançant una pipeta, tot el contingut de les diferents cavitats en tubs d'assaig amb tapa de 15ml, i s'ha centrifugat a 1200rpm durant 5 minuts.

Una vegada centrifugats, s'han pogut distingir les cèl·lules al fons dels tubs d'assaig en forma de pols densa i blanquinosa, i s'ha absorbit tot el PBS tenint cura de no absorbir les cèl·lules del final dels tubs.



Figura 41: S'està absorbint el PBS del tub d'assaig un cop centrifugat

Font pròpia

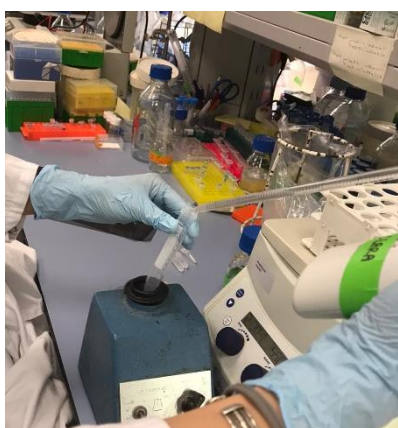


Figura 42: S'està abocant l'etanol fred a les cèl·lules, procurant que no les toqui directament, i mentre es barreja amb el vòrtex

Font pròpia

Posteriorment s'han afegit 4ml d'etanol 70% fred (tret del congelador). L'etanol s'ha afegit gota a gota i procurant que llisqués per les parets dels tubs, en comptes de tirar-lo directament a les cèl·lules, mentre es barrejava amb una màquina sacsejadora (vòrtex). Finalment s'han barrejat una mica més i s'han deixat reposar durant 30 minuts a -20°C de temperatura. El tractament amb etanol fred, pretén fixar les cèl·lules a la fase del cycle cel·lular que es troben, i pretén danyar la membrana cel·lular de tal manera que el iodur de propidi pugui entrar correctament a la cèl·lula⁴⁹.

Després dels 30 minuts a -20°C, s'han tornat a centrifugar els tubs a 1200rpm durant 5 minuts, i s'ha repetit l'acció anterior d'absorbir el contingut dels tubs sense absorbir les cèl·lules, però en aquest cas s'ha absorbit l'etanol en comptes de PBS.

Per garantir que no hi queda restes d'etanol a les diferents mostres, s'ha fet un rentat amb PBS, tornant a centrifugar les mostres, i tornant a absorbir el contingut dels tubs evitant absorbir les cèl·lules.

D'aquesta manera han quedat les cèl·lules soles, als diferents tubs d'assaig.

⁴⁹ Tal com s'ha esmentat anteriorment en aquest treball, el iodur de propidi no té la capacitat de penetrar a les cèl·lules vives, les quals, tenen la membrana cel·lular intacta.

També s'ha preparat una solució de tinció de DNA, basada en iodur de propidi. Aquesta solució s'ha preparat amb dades d'experiències anteriors, les quals indiquen una solució de les següents quantitats per cada mostra que es vol analitzar fent una citometria de flux:

- 500µl de PBS
- 5µl de RNAase⁵⁰ a una concentració de 20mg/ml.
- 10µl de iodur de propidi a una concentració de 1mg/ml.

Degut a una manca de temps i de recursos, s'ha decidit que s'analitzaran 10 mostres per citometria de flux, i s'ha acordat fer un excedent de la solució de dos mostres. És a dir, fer solució per 12 mostres.

Així doncs, s'han multiplicat les quantitats de la solució base per 12, fent una solució amb els següents elements (figura 43):

- 6ml de PBS
- 60µl de RNAase a una concentració de 20mg/ml.
- 120µl de iodur de propidi a una concentració de 1mg/ml.

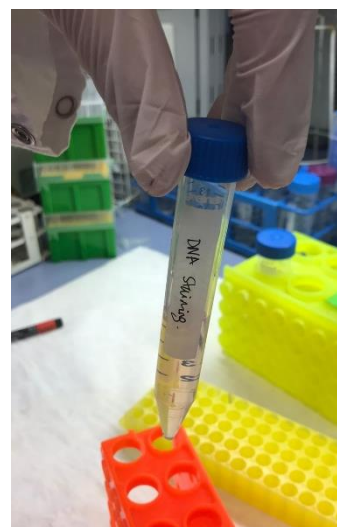


Figura 43: Solució de tinció del DNA basada en el iodur de propidi

Font pròpia

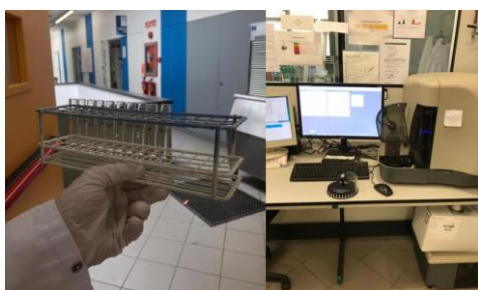


Figura 44: Mostres preparades per fer la citometria de flux a l'esquerra, i el citòmetre de flux a la dreta

Font pròpia

Finalment s'han afegit 515µl de la solució de tinció de DNA a cada una de les mostres de cèl·lules que s'han volgut analitzar per citometria de flux, i s'ha deixat incubar durant 30 minuts a 37°C.

Finalment, s'ha transferit les mostres a uns tubs d'assaig sense tapa especials per fer la citometria de flux, i s'han passat les mostres pel citòmetre, per tal d'analitzar-ne els resultats (figura 44).

⁵⁰ Enzim que catalitza la despolimerització dels àcids ribonucleics, és a dir, enzim que destrueix el RNA. Amb l'ajuda d'aquest enzim es pretén que l'únic àcid nucleic present a la cèl·lula sigui el DNA de la cèl·lula.

6.3 RESULTATS

6.3.1 OBSERVACIONS AL MICROSCOPI

Abans de fer les preparacions de les cèl·lules per a la citometria de flux, s'han observat les diferents mostres dels grups 4, 5 i 6 al microscopi per tal d'observar, qualitativament, quin efecte han tingut els diferents fàrmacs a les cèl·lules al cap de 14 hores.

S'han fet les següents observacions:

En aquesta imatge (figura 45) es pot observar una de les mostres del grup 4, que correspon al grup control de 14 hores. Les cèl·lules de la mostra es troben majoritàriament vives⁵¹, i en alguns casos en divisió cel·lular, com és el cas de la cèl·lula 1 (figura 45) que es troba en citocinesi⁵². La resta de punts lluminosos o brillants s'associen a artefactes que no són intrínsecs a la mostra.

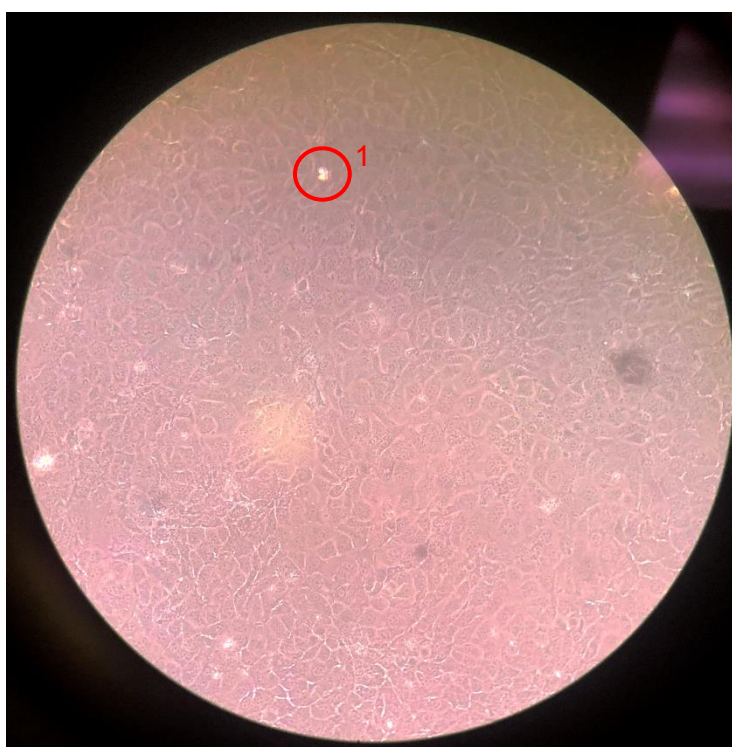


Figura 45: Imatge d'un cultiu cel·lular del grup 4 (control 14h) feta al microscopi

Font pròpia

⁵¹ Se sap perquè les cèl·lules es troben enganxades a la superfície de la cavitat on es troben, qualitat que perden quan aquestes moren.

⁵² Se sap que la cèl·lula s'està dividint, perquè es veu més brillant que la resta de cèl·lules, i amb una forma lleugerament diferent. A més a més, es veu com la cèl·lula està dividint el seu citoplasma i es veu el solc de divisió.

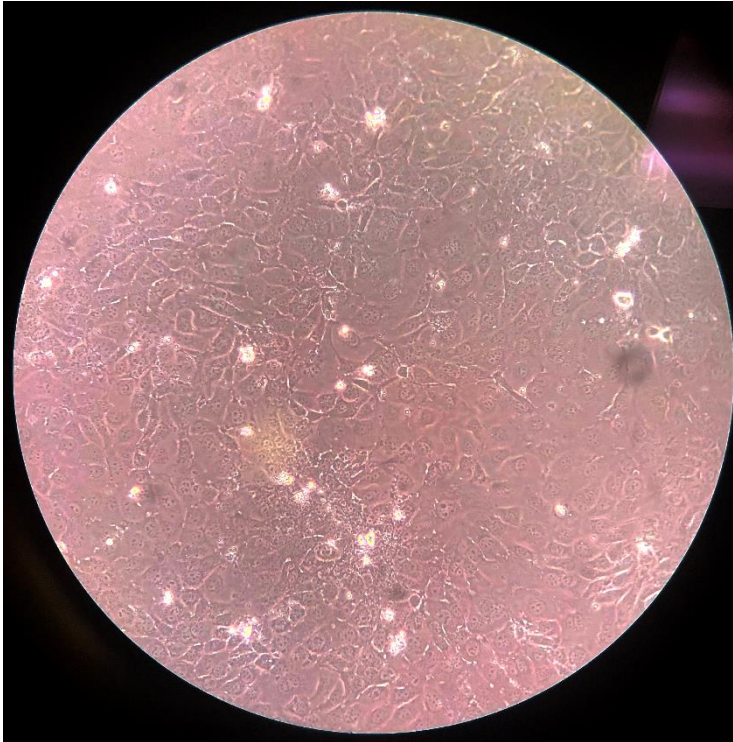


Figura 47: Imatge del cultiu cel·lular del grup 5 (mostres tractades 14h) tractat amb cisplatí, feta al microscopi

Font pròpia

En aquesta imatge (figura 47) es pot observar la mostra del grup 5 tractada amb inhibidors de CDK, en la que les cèl·lules han estat 14 hores amb la presència del fàrmac. A la imatge es poden veure alguns punts brillants que corresponen a cèl·lules mortes o en apoptosi. Per tant, a la mostra hi ha un cert nombre de cèl·lules mortes, tot i que n'hi ha menys que a la figura 46.



Figura 46: Imatge del cultiu cel·lular del grup 5 (mostres tractades 14h) tractat amb inhibidors de CDK1/2, feta al microscopi.

Font pròpia

En aquesta imatge (figura 46) es pot observar la mostra del grup 5 tractada amb cisplatí, en la que les cèl·lules han estat sotmeses al fàrmac durant 14 hores. A la imatge es poden veure diversos punts brillants, que són cèl·lules mortes, o cèl·lules en apoptosi⁵³. Així doncs, hi ha una gran quantitat de cèl·lules que no han pogut finalitzar el seu cicle cel·lular, i han entrat en apoptosi.

⁵³ Les cèl·lules mortes, o aquelles que han entrat en apoptosi, perden la capacitat d'adherir-se a les superfícies, de tal manera que queden flotant pel líquid de la mostra, i per aquest motiu es veuen més brillants.

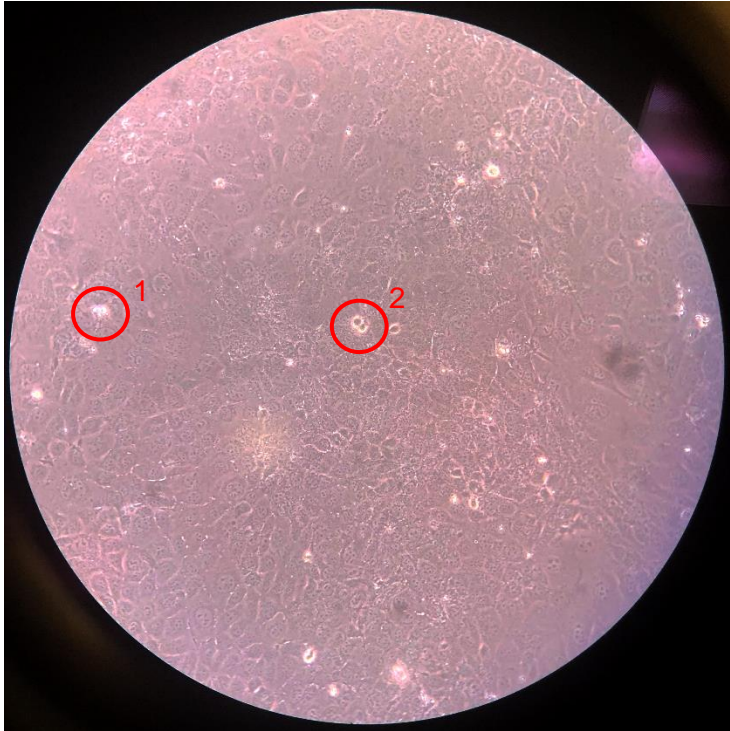


Figura 48: Imatge d'un cultiu cel·lular del grup 6 (CDK release) feta al microscopi.

Font pròpia

En aquesta imatge (figura 48) es pot observar una mostra del grup 6, en la que les cèl·lules han estat 12 hores sotmeses al fàrmac, i posteriorment han estat 2 hores sense aquest. En aquesta mostra hi ha algunes cèl·lules mortes, com ho és la cèl·lula 1 (figura 48), i hi ha altres cèl·lules que han tornat a entrar en mitosi després de l'absència del fàrmac, com la cèl·lula 2 (figura 48).

6.3.2 RESULTATS DE LA CITOMETRIA DE FLUX

La citometria de flux mostra, diferents gràfics que relacionen diferents variables, com ho poden ser: la mida de les cèl·lules i la seva rugositat o la quantitat de cèl·lules i la quantitat de iodur de propidi. Per realitzar aquest treball, s'ha relacionat la quantitat de iodur de propidi (és a dir, quantitat de DNA) amb la quantitat de cèl·lules. És a dir, quantes cèl·lules tenen aquesta quantitat de iodur de propidi. D'aquesta manera es vol intentar deduir quin percentatge de cèl·lules es troba en cada fase del cicle cel·lular per cada mostra.

Als gràfics s'hi veu els resultats de la citometria de flux de les diferents mostres, on s'hi relacionen la quantitat de iodur de propidi amb la quantitat de cèl·lules que el tenen. A més a més s'han classificat les diferents quantitats de iodur de propidi, segons la fase del cicle cel·lular la qual pertanyen⁵⁴.

⁵⁴ Les cèl·lules que contenen la quantitat de DNA que pertany a l'espècie de la cèl·lula es troben en fase G0, o en fase G1. En canvi, les cèl·lules que contenen dues vegades la quantitat de DNA que pertany a l'espècie es troben en fase G2, o en fase M, ja que ja han replicat el material genètic per tal d'iniciar la divisió cel·lular. Finalment, d'aquelles cèl·lules que continguin una quantitat de DNA entre la que pertany a l'espècie, i dues vegades aquesta, se'n dedueix que estan replicant el DNA i per tant, es troben en fase S. Aquelles quantitats de iodur de propidi massa petites o massa grans, s'entendran com trossos de cèl·lules o cèl·lules dobles, que són negligibles.

CITOMETRIA DE FLUX DEL GRUP 1 (grup control de 24h)

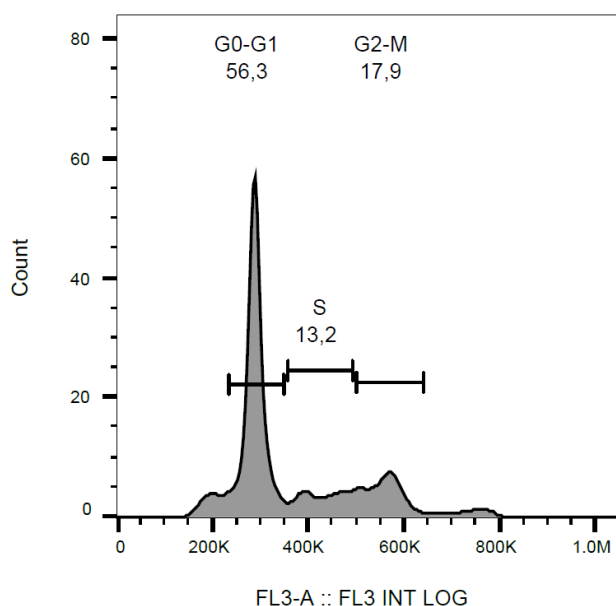


Figura 49: Resultat de la citometria de flux de la mostra del grup 1 (control 24h), que relaciona la quantitat de iodur de propidi amb la quantitat de cèl·lules.

Font pròpia

les cèl·lules. Així doncs, la majoria de cèl·lules es troben en les fases G0-G1, seguit de les fases G2-M, que presenten un petit pic.

S'han fet citometries de flux de dues mostres del grup 1 (control 24h), però degut a la gran semblança entre els resultats d'aquestes, s'ha decidit incorporar-ne només un en aquest treball.

Els resultats de les dues citometries de flux, han estat representats en un altre gràfic més senzill (figura 50), que relaciona directament el percentatge de cèl·lules, i les diferents fases del cicle cel·lular.

Aquest gràfic (figura 49) pertany a una mostra del grup 1 (grup control de 24 hores). En el gràfic es pot observar que hi ha un pic de cèl·lules a les fases G0-G1, que representen un 56,3% de les cèl·lules analitzades. A més a més, es veu com la quantitat de cèl·lules que es troben en fase S baixa dràsticament i només representen el 13,2% de les cèl·lules. També es veu que hi ha un petit pic de cèl·lules en fase G2-M que correspon al 17,9% de

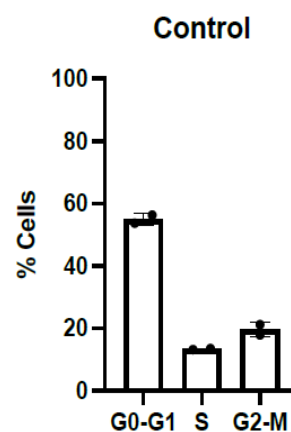


Figura 50: Gràfic representatiu dels resultats de les citometries del grup 1.

Elaboració pròpia

CITOMETRIA DE FLUX DEL GRUP 2 (inhibidors de cdk1/2 24h)

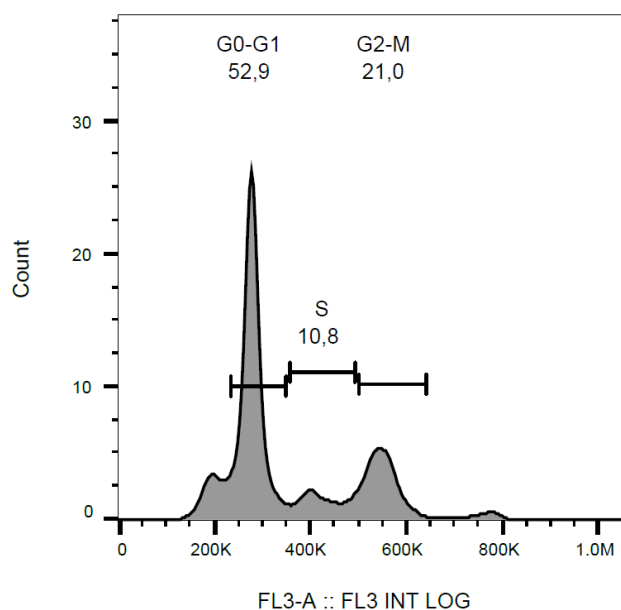


Figura 52: Resultat de la citometria de flux de la mostra del grup 2 (inhibidors de CDK1/2 24h), que relaciona la quantitat de iodur de propidi amb la quantitat de cèl·lules.

Font pròpia

Aquest gràfic (figura 51) pertany a una mostra del grup 2 (grup tractat amb inhibidors de CDK1/2 durant 24 hores). En el gràfic es pot observar que hi ha un gran pic de cèl·lules a les fases G0-G1, que representen un 52,9% de les cèl·lules de la mostra. A més a més, la quantitat de cèl·lules que es troben en fase S és inferior a la del grup control, ja que només un 10,8% de les cèl·lules es troben en aquesta fase. Per altra banda, el pic de les cèl·lules en les fases G2-M ha augmentat lleugerament

respecte les cèl·lules del grup control. En aquest cas, un 21% de les cèl·lules es troben en aquesta fase. Així doncs, en comparativa al grup control hi ha un percentatge inferior de cèl·lules en les fases G0, G1 i S, que s'han traslladat a les fases G2 i M. A més a més, per l'escala de la quantitat de cèl·lules (escala de l'eix vertical del gràfic) podem deduir que a la mostra hi havia poques cèl·lules vives⁵⁵.

En aquest grup també s'han fet citometries de flux de dues mostres diferents, però degut a la gran semblança entre els resultats de les dues mostres, s'ha decidit incorporar-ne només una a les memòries d'aquest treball.

Els resultats d'aquestes citometries de flux, han estat representats en un altre gràfic més senzill (figura 52), que relaciona directament el percentatge de cèl·lules, i les diferents fases del cicle cel·lular.

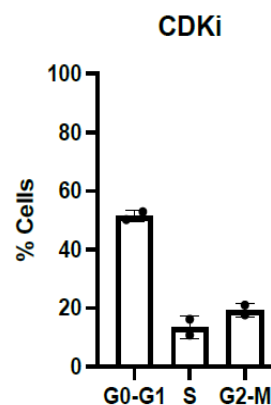


Figura 51: Gràfic representatiu dels resultats de les citometries del grup 2.

Elaboració pròpia

⁵⁵ En cultius normals, l'escala hauria d'arribar a quantitats superiors a 250 aproximadament.

CITOMETRIA DE FLUX DEL GRUP 3 (cisplatí 24h)

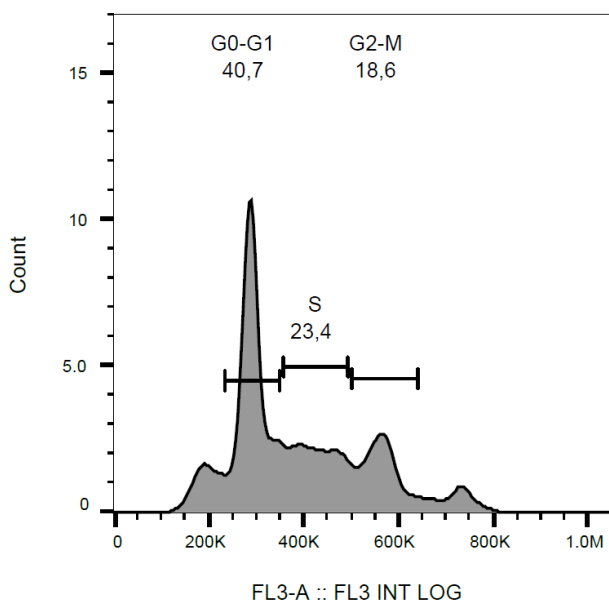


Figura 53: Resultat de la citometria de flux de la mostra del grup 3 (cisplatí 24h), que relaciona la quantitat de iodur de propidi amb la quantitat de cèl·lules.

Font pròpia

23,4% de les cèl·lules, un augment dràstic del 10,2% respecte el grup control. Així doncs, en comparativa al grup control hi ha una gran disminució de cèl·lules que es troben en les fases G0-G1, i un gran augment de les cèl·lules que es troben en fase S. Per altre banda, hi ha un lleuger augment de les cèl·lules que es troben en les fases G2-M, però es podria considerar intrascendent.

A més a més, veient l'escala de l'eix vertical del gràfic, podem deduir que en aquesta mostra hi havia molt poques cèl·lules vives.

En aquest cas, també s'han fet dues citometries de flux diferents, de dues mostres del mateix grup. Tot i així, altra vegada, s'ha decidit incorporar-ne només una en aquest treball.

S'ha fet realitzar un altre gràfic de barres, que inclogui els resultats de les dues citometries (figura 54).

Aquest gràfic (figura 53) pertany a una mostra del grup 3 (grup tractat amb cisplatí durant 24 hores). Com en els gràfics anteriors, el pic més gran de cèl·lules es troba a les fases G0-G1, que en aquest cas consta del 40,7% de les cèl·lules de la mostra, un 15,6% menys que el grup control. A més a més, el percentatge de cèl·lules que es troben en les fases G2-M és d'un 18,6%, lleugerament superior al percentatge del grup control. Per altra banda, les cèl·lules en fase S representen el

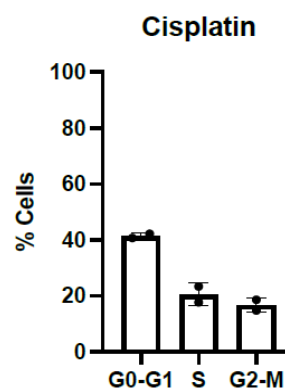


Figura 54: Gràfic representatiu dels resultats de les citometries del grup 3.

Elaboració pròpia

CITOMETRIA DE FLUX DEL GRUP 4 (control 14h)

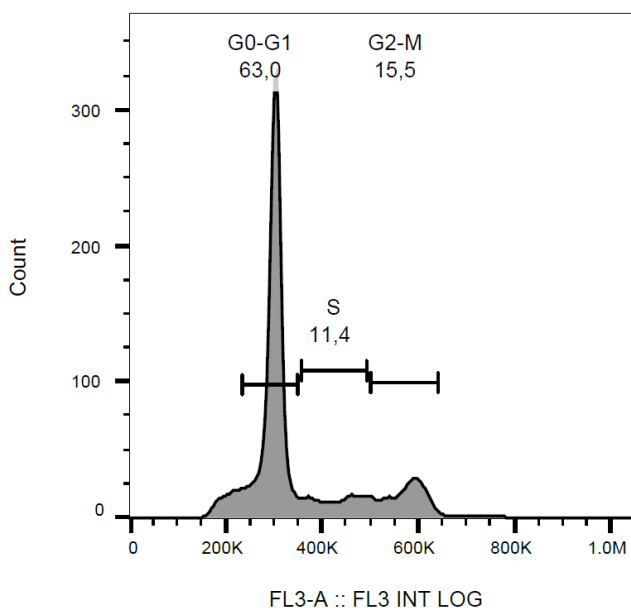


Figura 55: Resultat de la citometria de flux de la mostra del grup 4 (control 24h), que relaciona la quantitat de iodur de propidi amb la quantitat de cèl·lules.

Font pròpia

Aquest gràfic (figura 55) pertany a una mostra del grup 4 (grup control de 14 hores). Al gràfic s'observa un gran pic de cèl·lules que es troben a les fases G0-G1, que representen el 63% del total de cèl·lules analitzades. També s'observa, com en l'altre grup control (grup 1), que hi ha una part molt petita de cèl·lules que es troben en fase S, en aquest cas, només un 11,4% de les cèl·lules. Una altra vegada, hi ha un pic tímid de cèl·lules que es troben en les fases G2-M, que són un 15,5% de les cèl·lules de la mostra. Els resultats d'aquesta citometria de flux són molt semblants als del grup 1. Ambdues mostres tenen la majoria de les cèl·lules a les fases G0 i G1, i una petita part en les altres fases del cicle cel·lular. Aquest gràfic presenta una escala de l'eix vertical que es podria considerar normal.

S'ha fet un gràfic de barres (figura 56) on s'hi representen les mateixes dades del gràfic de la citometria però de forma més clara i comprensible. En aquest nou gràfic no s'hi relaciona la quantitat de iodur de propidi amb la quantitat de cèl·lules, sinó que es mostra el percentatge de cèl·lules que hi ha en cada una de les diferents fases del cicle cel·lular.

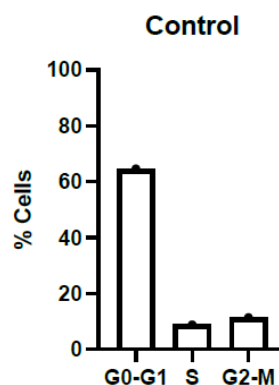


Figura 56: Gràfic representatiu dels resultats de la citometria del grup 4.

Elaboració pròpia

CITOMETRIA DE FLUX DEL GRUP 5 (inhibidors de CDK1/2 14h)

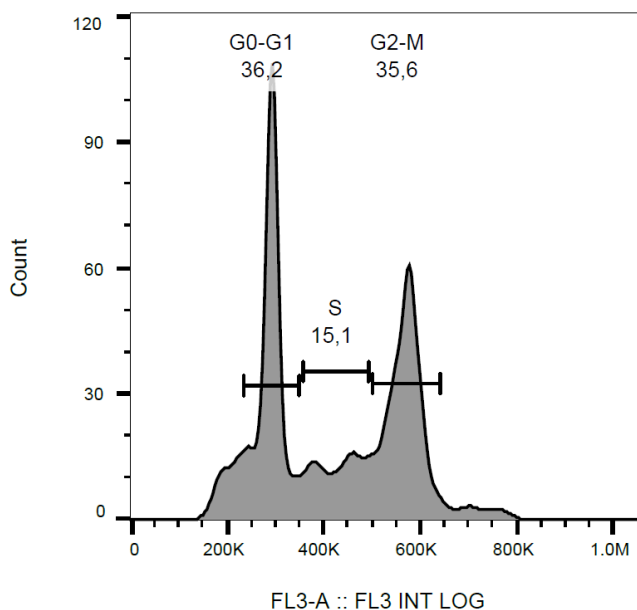


Figura 57: Resultat de la citometria de flux de la mostra del grup 5 (inhibidors de CDK 14h), que relaciona la quantitat de iodur de propidi amb la quantitat de cèl·lules.

Font pròpia

Aquest gràfic (figura 57) exposa els resultats de la citometria de flux de la mostra del grup 5 tractada amb inhibidors de CDK1/2. Aquest gràfic difereix en varis aspectes del gràfic del grup control (grup 4). Primerament, la el percentatge de cèl·lules en les fases G0-G1 és molt més petit que el del grup control. En aquest cas, les cèl·lules en les fases G0-G1 representen només el 36,2% de les cèl·lules de la mostra. Es produeix una gran diferència

respecte el gràfic del grup control en el percentatge de cèl·lules en les fases G2-M, que en aquest cas és 35,6%, més del doble del percentatge de cèl·lules en aquestes fases en el grup control. També s'observa un petit augment del percentatge de cèl·lules en fase S respecte al grup control.

A més a més, l'escala de l'eix vertical del gràfic es podria considerar lleugerament baixa, però de manera tant extrema com altres mostres anteriors.

Una altra vegada, s'ha fet un gràfic de barres (figura 58), en el que s'hi representa les dades del resultat de la citometria de flux, però de forma més simple i entenedora. En aquest nou gràfic es mostra directament, el percentatge de cèl·lules en cada una de les diferents fases del cicle cel·lular.

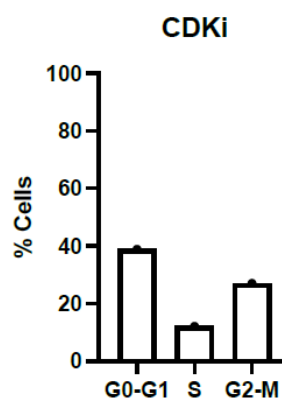


Figura 58: Gràfic representatiu dels resultats de la citometria del grup 5 (iCDK1/2).

Elaboració pròpia

CITOMETRIA DE FLUX DEL GRUP 5 (cisplatí 14h)

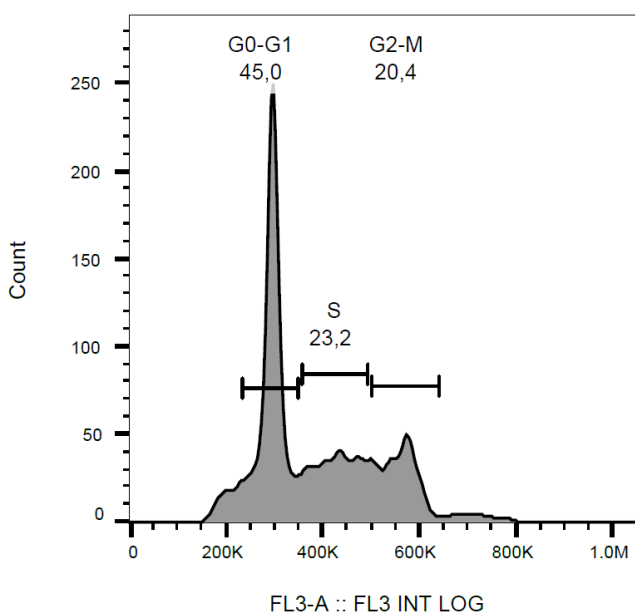


Figura 59: Resultat de la citometria de flux de la mostra del grup 5 (cisplatí 14h), que relaciona la quantitat de iodur de propidi amb la quantitat de cèl·lules.

Font pròpia

les cèl·lules en fase S. Per altra banda, malgrat hi hagi un percentatge similar de cèl·lules en les fases G2-M (un 20,4%), aquest últim tan sols s'ha vist incrementat un 4,9% respecte el grup control.

A més a més, l'escala de l'eix vertical del gràfic es pot considerar correcte, és a dir, no hi ha gaires cèl·lules mortes, malgrat ser lleugerament baixa.

En aquest cas s'ha tornat a fer un gràfic de barres (figura 60) on s'exposi la informació dels resultats de la citometria de flux de forma més senzilla i entenedora. Aquest gràfic expressa directament el percentatge de cèl·lules en cada fase del cicle cel·lular.

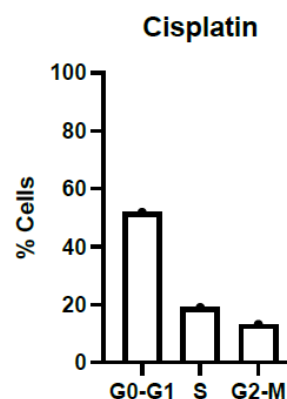


Figura 60: Gràfic representatiu dels resultats de la citometria del grup 5 (cisplatí).

Elaboració pròpia

CITOMETRIA DE FLUX DEL GRUP 6 (CDK *release*)

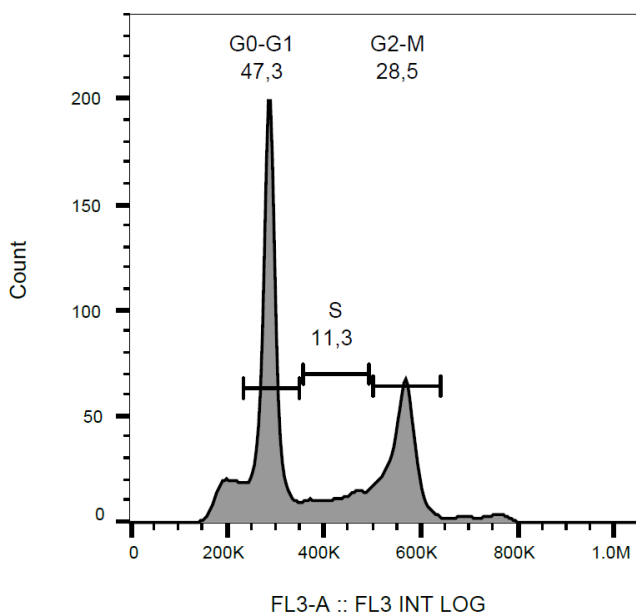


Figura 61: Resultat de la citometria de flux de la mostra del grup 6 (CDK *release*), que relaciona la quantitat de iodur de propidi amb la quantitat de cèl·lules.

Font pròpia

El gràfic (figura 61) correspon a una mostra del grup 6 (inhibidors de CDK1/2 *release*). Al gràfic s'hi observa que el percentatge de cèl·lules en les fases G0-G1 és notablement menor al del grup control (grup 4). En aquest cas, un 47,3% de les cèl·lules analitzades es troben en les fases esmentades. Per altra banda, es s'observa que el percentatge de cèl·lules en fase S ha tornat a ser el mateix que en el grup control (grup 4), un 11,3%. Tot i això, el percentatge

de cèl·lules que es troben en les fases G2-M segueix essent una mica incrementat respecte el control. En aquesta mostra, aquest percentatge és d'un 28,5%, que té una diferència d'un 13% respecte al percentatge del grup control (grup 4).

L'escala vertical del gràfic és lleugerament baixa, però es podria considerar que no hi ha una gran quantitat de cèl·lules mortes.

Finalment, s'ha tornat a fer un gràfic de barres (figura 62) que exposi les dades d'una manera més senzilla i simplificada. Una altra vegada, aquest gràfic relaciona cada fase del cicle cel·lular amb el percentatge de cèl·lules que es troben en aquesta fase.

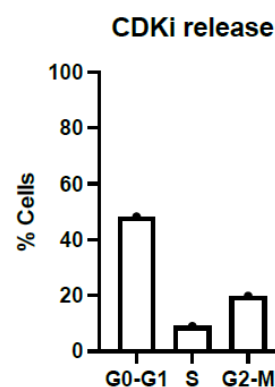


Figura 62: Gràfic representatiu dels resultats de la citometria del grup 6.

Elaboració pròpia

6.3.3 DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

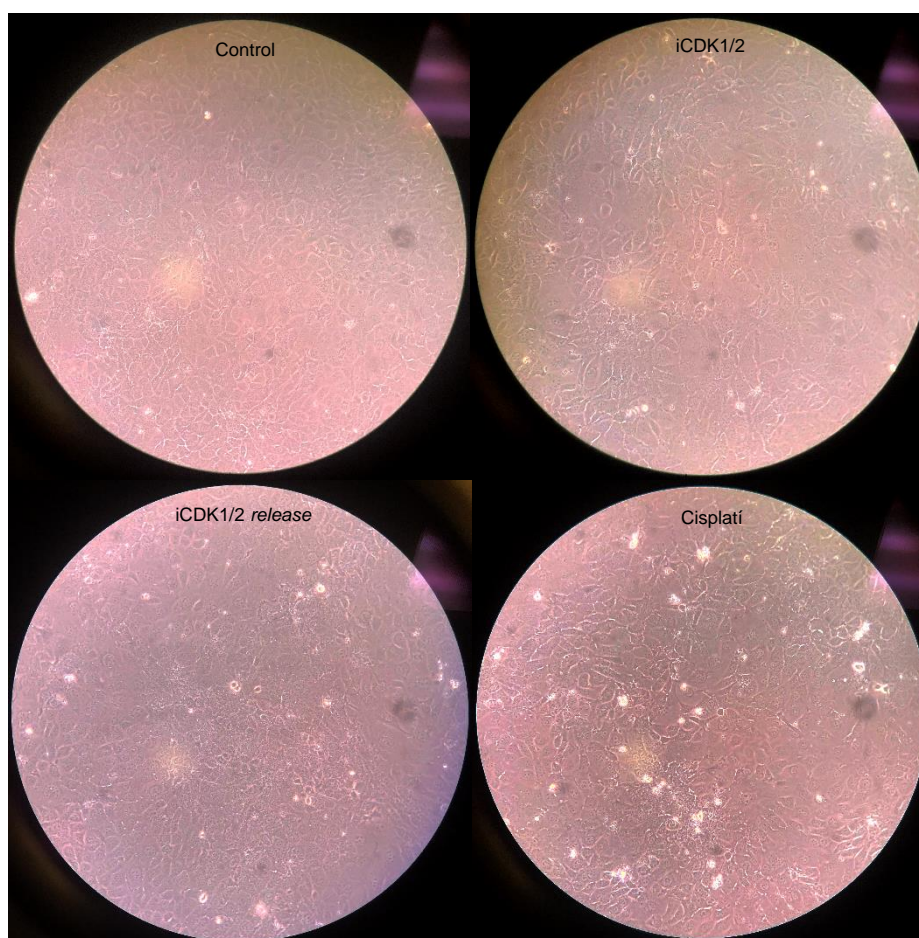


Figura 63: Mostres de les cèl·lules tractades 14 hores vistes al microscopi.

Font pròpia

Tal com s'ha vist a les observacions al microscopi (figura 63), els inhibidors de CDK1/2 han resultat efectius contra les cèl·lules canceroses, ja que, amb tan sols 14 hores, ja es veuen més cèl·lules mortes que en el grup control⁵⁶. Tot i així, es pot observar, clarament, que el cisplatí té una mortalitat molt més alta entre les cèl·lules canceroses, ja que en aquesta s'hi veuen moltes més cèl·lules mortes. La mostra tractada amb inhibidors de CDK1/2, els quals s'han eliminat posteriorment (*iCDK1/2 release*) també presenta cèl·lules mortes en una quantitat semblant a la mostra de inhibidors de CDK1/2, i per tant, una quantitat inferior a la de la mostra tractada amb cisplatí.

⁵⁶ Les cèl·lules mortes perden la capacitat d'adherir-se a les superfícies i per tant queden flotant al medi. Això les fa ser més brillants i blanquinoses vistes des del microscopi. A les mostres de la figura 63, es poden veure cèl·lules mortes a totes elles, menys a la del grup control. Altres taques menys brillants, poden ser restes d'una cèl·lula que ha entrat en apoptosi, o bé poden ser artefactes externs a la mostra.

Malgrat haver matat unes quantes cèl·lules, encara es poden observar una gran majoria de les cèl·lules vives. Aquest fet podria ser degut al fet que les mostres es tracten de les que han estat tan sols 14 hores sotmeses als diferents fàrmacs. De fet, en les escales dels eixos verticals dels gràfics de les citometries de flux (vegeu punt 6.3.2), s'ha pogut observar clarament que les mostres tractades durant 14 hores tenien més cèl·lules vives que aquelles tractades durant 24 hores. Aquest fet obre la porta a estudis posteriors, els quals podrien deixar actuar els fàrmacs durant un temps determinat, superior a 24 hores, per tal de determinar quin grau de sensibilitat tenen les cèl·lules envers el fàrmac.

Pel que fa a la mostra del *release* dels inhibidors de CDK1/2 (figura 63, iCDK1/2 release) es veu com hi ha cèl·lules que després de ser tractades tornen a entrar en mitosi. Això vol dir que, una vegada es retira el fàrmac, el tumor cancerós tornaria a activar-se, creixent de nou. Per tant es podria considerar que la capacitat de rebrot d'un tumor tractat amb inhibidors de CDK1/2 és força alt. Per altra banda, l'entrada en mitosi de les cèl·lules després d'haver estat sotmeses al fàrmac, significa que les cèl·lules normals tindrien una recuperació ràpida després que el pacient finalitzi el tractament amb inhibidors de CDK1/2. Es podria considerar un estudi en el qual es repetís l'experiment d'aquest treball amb una línia cel·lular de cèl·lules normals, amb l'objectiu de determinar si les cèl·lules normals patirien una recuperació tan ràpida com la que s'ha vist que tenen les cèl·lules canceroses.

Un altre possible estudi que es podria dur a terme, és repetir l'experiment fet en aquest treball, però incorporar-hi una mostra de *release* del cisplatí per tal de poder fer una comparació entre la capacitat de rebrot d'un tumor tractat amb cisplatí, i la capacitat de rebrot d'un tumor tractat amb inhibidors de CDK1/2.

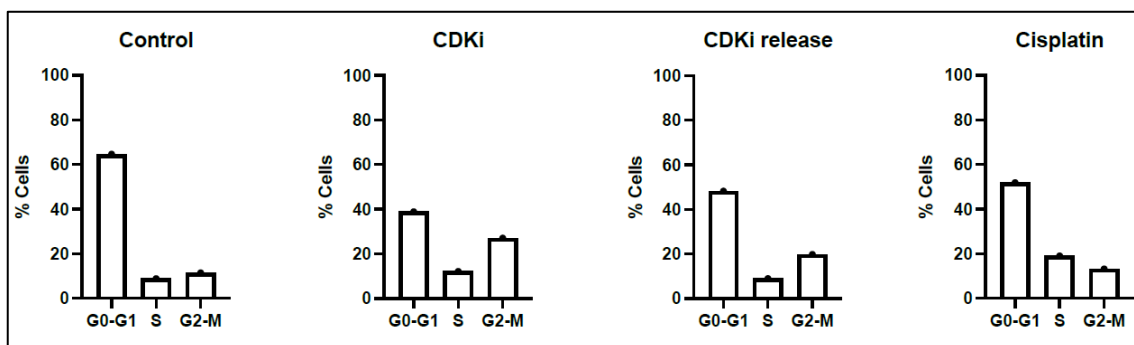


Figura 64: Gràfics dels resultats de les citometries de flux de les mostres tractades durant 14 hores.

Elaboració pròpia

En el segon gràfic (figura 64, CDKi) s'hi observa un augment del percentatge de cèl·lules en les fases G2-M respecte al grup control. A més a més també hi ha un lleuger increment del percentatge de cèl·lules en fase S. Tal com s'ha esmentat en aquest treball (vegeu punt 2.3.3.3) el CDK2 actua sobretot al llarg de la fase S, i el CDK1 al llarg de les fases G2 i M. La solució que s'ha fet servir per aquest treball, contenia més inhibidors de CDK1 que de CDK2. Així doncs, els resultats concorden amb el que era d'esperar: a l'inhibir els CDK1/2, la cèl·lula no pot passar els checkpoints de les fases S i sobretot G2 i M, i queda estancada en aquestes fases fins que entra en apoptosi. Per aquest motiu, el cultiu presenta un gran augment del percentatge de cèl·lules que es troben en les fases G2-M, i un augment més petit del percentatge de cèl·lules que es troben en fase S.

Pel que fa al gràfic del *release* de inhibidors de CDK1/2 (figura 64, CDKi release), es veu una disminució del percentatge de cèl·lules en les fases G2-M respecte la mostra CDKi, i en canvi, s'hi observa un augment en el percentatge de cèl·lules que es troben en les fases G0-G1. Pel que fa al percentatge de cèl·lules en fase S, malgrat fer una disminució respecte la mostra CDKi, aquesta és molt petita. Podem interpretar, per tant, que les cèl·lules han quedat estancades a les fases S, i majoritàriament G2 i M, però quan se les ha alliberat dels inhibidors de CDK1/2, han pogut superar el checkpoint i han prosseguit amb el cicle cel·lular.

Pel que fa a l'últim gràfic (figura 64, Cisplatin) s'hi veu clarament com es produeix un augment del percentatge de cèl·lules que es troben en fase S respecte el grup control. Tal com s'ha esmentat en aquest treball (vegeu punt 4.1) el cisplatí es posa entremig del DNA i impedeix la seva replicació. Això fa que la cèl·lula quedi

estancada en la fase S, i al no superar el checkpoint s'indueixi l'apoptosi. Així doncs, les dades expressades pel gràfic concorden amb el que s'esperava segons la teoria: en sotmetre cèl·lules a l'efecte del cisplatí, aquestes quedarien estancades en la fase S, i no superarien el checkpoint, fent que la cèl·lula entri en apoptosi. És per això que el cultiu presenta un gran augment del percentatge de cèl·lules en fase S respecte el grup control.

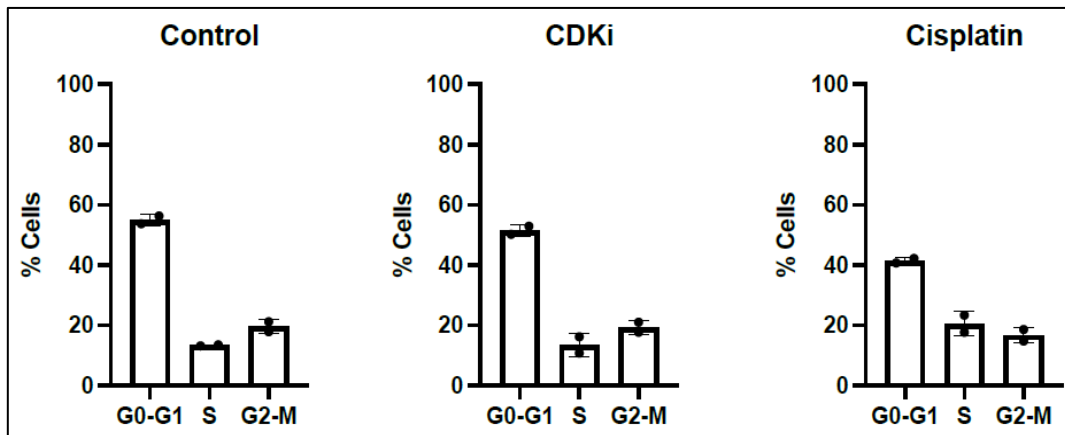


Figura 65: Gràfics dels resultats de les citometries de flux de les mostres tractades durant 24 hores

Font pròpia

Els tres gràfics (figura 65) mostren resultats similars als gràfics anteriors (figura 64), però són menys marcats. Per exemple, gairebé no es denota cap diferència entre el percentatge de cèl·lules en les fases G2-M del segon gràfic (figura 65, CDKi), i el percentatge de cèl·lules en aquestes fases del grup control. Això podria ser, perquè la majoria de les cèl·lules ja han patit apoptosi, i per tant, queda una mostra molt petita de cèl·lules, que podria no ser representativa. Cal recordar que en els resultats de la citometria de flux, aquestes mostres són les que tenen unes escales dels eixos verticals dels gràfics més baixes, i per tant, les que contenen menys cèl·lules vives. En conseqüència, les cèl·lules que resten vives, són cèl·lules que no han entrat en divisió cel·lular, o que han estat capaces de superar els impediments que imposa el fàrmac, i per tant, els resultats de les mostres tractades s'assimilen als del grup control.

7. CONCLUSIONS

El càncer és la proliferació descontrolada d'un conjunt de cèl·lules del cos. Per altra banda, els CDK són unes proteïnes essencials per tal que la cèl·lula pugui prosseguir amb el cicle cel·lular. Per tant, la inhibició d'alguns CDK podria ser una diana per combatre el càncer.

Tal com s'ha observat en aquest treball, els inhibidors de CDK1 i CDK2 són efectius per combatre el càncer, és a dir, contribueixen a la mort de les cèl·lules canceroses, i podrien esdevenir-se la base d'un nou fàrmac.

S'ha comprovat mitjançant una citometria de flux que aquests inhibidors inutilitzen els CDK1 i CDK2 (que actuen sobretot durant les fases S, G2 i M), causant que la cèl·lula no superi els checkpoints necessaris, i es quedi estancada en aquestes fases del cicle cel·lular, condemnant-la a entrar en apoptosi, i per tant, provocant la mort cel·lular.

A més a més s'ha comprovat que el cisplatí és una molècula que danya el DNA, impedit que la cèl·lula passi de fase del cicle cel·lular, i per tant estancant-la en la fase S. Per aquest motiu, el cisplatí i els inhibidors tenen mecanismes d'acció semblants, ja que ambdós fàrmacs tenen l'objectiu d'impedir que la cèl·lula superi els checkpoints del cicle cel·lular, estancant-la en una fase del cicle cel·lular i provocant l'apoptosi. Tanmateix, els dos fàrmacs tenen maneres diferents d'assolir aquest objectiu.

S'ha observat que el cultiu tractat amb cisplatí ha resultat amb la mort de més cèl·lules que el cultiu tractat amb inhibidors de CDK1 i CDK2. És per això que malgrat que els inhibidors de CDK1 i CDK2 són efectius per combatre el càncer, ataquen a les cèl·lules canceroses amb menys agressivitat que el cisplatí.

Finalment s'ha comprovat la capacitat de rebrot d'un tumor tractat amb inhibidors de CDK1 i CDK2, realitzant una mostra *release*. S'ha observat que un tumor tractat amb aquest fàrmac té una gran capacitat de rebrot, i per tant, es podria fer difícil matar del tot un tumor utilitzant inhibidors de CDK1 i CDK2, però sí que podrien ser útils per la desacceleració del creixement del tumor, i fins i tot, per la reducció d'aquest.

Per altra banda, la gran capacitat de rebrot en cèl·lules canceroses, es tradueix a una recuperació ràpida en les cèl·lules normals, motiu pel qual podria ser interessant compaginar un tractament oncològic amb inhibidors de CDK1 i CDK2 com a complement.

Es proposa la realització d'un nou estudi, que consisteixi en la repetició d'aquest estudi però incloent-hi mostres de cèl·lules no canceroses, i afegint-hi un grup de mostres en el que s'hi barregin els dos fàrmacs: els inhibidors de CDK1 i CDK2, i el cisplatí.

Es creu que els resultats no variarien, segons si el fàrmac afecta cèl·lules canceroses o cèl·lules no canceroses, i que els resultats de la segona part de l'ampliació no variaran gaire dels resultats obtinguts tractant les cèl·lules canceroses amb cisplatí. Això és degut al fet que el cisplatí impedeix que les cèl·lules passin de la fase S, i per tant, poques cèl·lules arribarien a la fase G2, on hi ha l'efecte dels inhibidors de CDK1 i CDK2. De totes maneres, la combinació dels dos fàrmacs podria resultar en un fàrmac molt més agressiu i eficaç per combatre el càncer.

BIBLIOGRAFIA

1. *Cell cycle development*. **Coffman, J.A.** 2004, Dev. Cell, Vol. 6, p. 321-327.
2. **Brody, Lawrence C.** National Human Genome Research Institute. *Cell Cycle*. [Online] <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle>.
3. **OpenStax.** CNX. *The cell cycle*. [Online] https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:1tJ55Ot6@7/The-Cell-Cycle.
4. **OpenStax Biology.** Khan Academy. *Phases of the cell cycle*. [Online] <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/cell-cycle/a/cell-cycle-phases>.
5. *Mitosis*. **McIntosh, J. R.** 2016, Cold Spring Harbor perspective in biology, Vol. 8.
6. *Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling*. **Cleveland, Don W., Mao, Yinghui i Sullivan, Kevin F.** 2003, Cell, Vol. 112, p. 407-421.
7. **OpenStax.** Control of the cell cycle. *OpenStax*. [Online] <https://openstax.org/books/biology/pages/10-3-control-of-the-cell-cycle>.
8. *Cell cycle regulation by checkpoints*. **Barnum, K. J. i O'Connell, M. J.** 2014, Methods in molecular biology, Vol. 1170, p. 29-40.
9. **OpenStax.** Khan Academy. *Cell cycle checkpoints*. [Online] <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/regulation-of-cell-cycle/a/cell-cycle-checkpoints-article>.
10. *DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis*. **Dasika, G, et al.** 1999, Oncogene, Vol. 18, p. 7883-7899.
11. *Less-well known functions of cyclin/CDK complexes*. **Palmer, N and Kaldis, P.** 2020, Semin Cell Dev Biol., Vol. 107, pp. 54-62.
12. *DRG2 Regulates G2/M Progression via the Cyclin B1-Cdk1 Complex*. **Jang, Soo Hwa, et al.** 2016, Mol Cells, Vol. 39, p. 699-704.
13. *Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer*. **Wenzel, E i Singh, A.** 2018, In Vivo, Vol. 32, p. 1-5.
14. **NIH.** National Cancer Institute . *What Is Cancer?* [Online] 2021. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
15. **Cooper, GM.** *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA) : Sinauer Associates, 2000.
16. **Eldridge, Lynne.** Verywell Health. *Cancer Cells vs. Normal Cells: How Are They Different?* [Online] 2019. <https://www.verywellhealth.com/cancer-cells-vs-normal-cells-2248794>.
17. *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. **Dasari, S i Tchounwou, P. B.** 2014, European journal of pharmacology, Vol. 740, p. 364–378.

18. *CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development.* **Zhang, Mengna, et al.** 2021, American Journal of Cancer Research, Vol. 11, p. 1913-1935.
19. *Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica.* **Pérez Lara, Jocelyn Carolina, et al.** 2018, Revista Médica de la Universidad Veracruzana, Vol. 18.
20. **Nanocollect.** Biomedical, Inc. *How Does Flow Cytometry Work?* [Online] <https://nanocollect.com/how-does-flow-cytometry-work/>.
21. **ThermoFisher.** ThermoFisher Scientific. *Propidium Iodide.* [Online] <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/propidium-iodide.html>.
22. *La citometría de flujo como herramienta para el estudio del efecto tóxico de diferentes contaminantes sobre microalgas.* **Cid, Angeles, et al.** 1999, Simposio científico en biología celular y molecular, p. 41-55.
23. **Segre, Julie A.** National Human Genome Research Institute. *Centrosoma.* [Online] <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Centrosoma>.
24. **Nature Education.** Scitable. *Microtubules and Filaments.* [Online] 2014. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/microtubules-and-filaments-14052932/>.
25. *The quantification and regulation of microtubule dynamics in the mitotic spindle.* **Vicente, J. J. and Wordeman, L.** 2019, Current opinion in cell biology, Vol. 60, pp. 36-43.