

1. INTRODUCCIÓ

Avui en dia el càncer encara és una de les malalties que afecta a més persones del món i tot i que és de les malalties més estudiades, encara no se'n coneix la cura.

El meu treball es centra especialment en què és el càncer de bufeta i en quines són les teràpies utilitzades actualment per eradicar-lo. A més, s'ha dut a terme la recerca d'un nou possible tractament.

La idea d'aquest treball va sorgir arrel d'una estada a la la Universitat Autònoma de Bellaterra. Durant dues setmanes, concretament, des del 28 de juny fins al 14 de juliol, vaig realitzar una estada al departament de microbiologia de la UAB. Durant aquestes dues setmanes la meva tutora va ser la Dra. Esther Julián. Ella em va explicar que en aquell laboratori es dedicaven a la recerca de nous micobacteris, millors que l'utilitzat actualment, per tal de combatre el càncer de bufeta amb una teràpia anomenada immonuteràpia. Aquesta consisteix en estimular el sistema immunitari del pacient amb un micobacteri anomenat BCG, per tal que el propi cos sigui capaç de combatre el càncer. Normalment aquest tractament s'utilitza després de l'extirpació del càncer perquè el pacient no recaigui en el càncer. Per aquesta raó, durant aquestes dues setmanes ella i altres integrants del laboratori em van ensenyar un protocol segons el qual preteníem comprovar si la mescla de tractaments quimoestàtics (Mitomicina) i estimuladors del sistema immunitari (un micobacteri) era un bon tractament pel càncer de bufeta. A més també vam voler comprovar si la secreció de interleucines augmentava amb aquests tractaments.

Arrel d'aquestes pràctiques a la UAB he desenvolupat el meu treball sobre el càncer de bufeta. Les parts a tractar en aquest treball són un apartat dedicat a explicar els components bàsics del sistema immunitari i com reacciona aquest davant del càncer. En un segon apartat s'explica què és el càncer i més concretament el de bufeta i com és tractat. I finalment, s'exposa un protocol on s'estudia si la barreja de tractaments quimioestàtics i estimuladors del sistema immunitari pot servir com a tractament pel càncer de bufeta. Aquests blocs principals van complementats amb 3 annexes, dos dels quals són els resultats d'un anàlisi de variància.

2. EL SISTEMA IMMUNITARI

El sistema immunitari està format per aquelles cèl·lules i molècules responsables de protegir als individus davant de microorganismes infecciosos. Tot i així, altres substàncies poden provocar respostes immunitàries. Per tant, el sistema immunitari du a terme una reacció envers a substàncies estranyes als individus, inclosos microorganismes, virus o macromolècules com les proteïnes i els polisacàrids¹.

Totes les cèl·lules del sistema immunitari són creades a la medul·la òssia, a partir de cèl·lules mare pluripotencials. D'aquestes cèl·lules mare se'n diferencien dues classes: la limfoide i la meloide. La primera dona lloc als limfòcits i la segona als fagòcits. La primera classe de cèl·lules migra cap a altres llocs del cos per tal d'especialitzar-se. De la classe limfoide se'n diferencien dos tipus de limfòcits: els B i els T. Les cèl·lules mare pluripotencials que donen lloc als limfòcits B, en els mamífers, es diferencien a la medul·la òssia, en canvi, les que donen lloc als limfòcits T, migren cap al tim² per ser diferenciades. Tan sols el 5% de les cèl·lules diferenciades són viables per dur a terme una resposta immunitària i per tant, passen al sistema circulatori. El 95% restant moren per apoptosi³ cel·lular. Però al arribar a l'adolescència la diferenciació de les cèl·lules pluripotencials limfoides, es du a terme a la mucosa intestinal i a la pell. D'altra banda, la classe meloide també es diferencia directament a la medul·la òssia i dona a lloc als fagòcits. D'aquests n'hi ha varies classes: els neutròfils, els monòcits, les cèl·lules dentífriques i els eosinòfils.

A més a més, hi ha dues classes de reacció immunològica: la innata i l'adaptativa. La primera està formada per mecanismes existents abans que es desenvolupi una infecció i representa la primera línia defensiva contra els microorganismes. En canvi, la segona són mecanismes de defensa que són estimulats després de l'exposició a agents infecciosos i la seva capacitat defensiva augmenta després d'exposicions repetides al mateix microorganisme. A més, les respostes immunitàries adaptatives potencien i milloren la immunitat innata.

La resposta immunitària innata davant d'un microorganisme, estimula que es duguin a terme respostes immunitàries adaptatives, i a més, les respostes immunitàries adaptatives potencien l'activitat dels mecanismes de defensa innats.

2.1 REACCIÓ IMMUNOLÒGICA INNATA

Els components principals d'aquesta classe d'immunitat són:

- Barreres físiques o químiques. Per exemple: els epitelis, els enzims⁴ que contenen les llàgrimes, les mucoses, etc.

- Proteïnes sanguínies. Són responsables dels processos d'inflamació i n'és un exemple el sistema del complement. Aquest és un mecanisme amplificador de la resposta immunitària ja que les 18 proteïnes que el formen ajuden al sistema immunitari a combatre les infeccions. Produeixen inflamació, duen a terme la lisis cel·lular dels bacteris i les cèl·lules tumorals i ajuden a la presentació d'antígens⁵ a les cèl·lules B.

- Les cèl·lules assassines naturals (NK). Les cèl·lules assassines naturals són una classe de limfòcits que s'encarreguen de reconèixer aquelles cèl·lules que no tenen els complexos d'histocompatibilitat principal o que els tenen danyats. Per tant, reconeixen a les cèl·lules: infectades per virus, recobertes per anticossos o les tumorals. Al reconèixer-les, les ataca produint una proteïna anomenada perforina. Aquesta genera forats a la cèl·lula, pels quals entren enzims i destrueixen a la cèl·lula.

- Els leucòcits. N'hi ha diverses classes: els neutròfils, els monòcits, les cèl·lules dendrítiques i els eosinòfils.

Els neutròfils són les primeres cèl·lules fagocítiques que arriben al lloc de la infecció. Al arribar-hi, ingereixen les partícules estranyes dins d'un lisosoma, les digereixen i les eliminen a l'exterior. Cada dia es produeixen uns 100 milions de neutròfils. Després d'haver estat creats a la medul·la òssia, circulen per la sang durant 7 o 10 hores i després s'introdueixen als teixits on al cap de dos o tres dies moren.

Els monòcits són cèl·lules que estan presents sempre a la sang. Quan són activats aquests passen als teixits i s'anomenen macròfags. Els macròfags són capaços de sintetitzar citocines i de fagocitar tot allò estrany que troben i fusionar-ho amb un lisosoma. Seguidament presenten l'antigen estrany a la membrana. Tenen una vida més llarga que la dels neutròfils ja que poden viure mesos i inclús anys. A més, estan especialitzats en eliminar virus, bacteris i protozous.

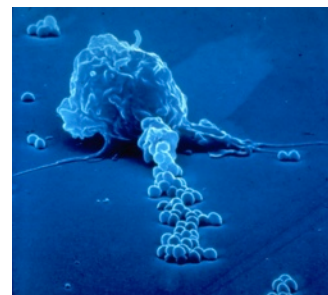


Fig.1 Macròfag en acció

De cèl·lules dendrítiques n'hi ha de dues classes: les interdigitades i les fol·liculars. Les primeres, presenten antígens als limfòcits T per tal de que s'iniciï la resposta immunitària. I les segones, és a dir, les fol·liculars tenen un paper clau en el desenvolupament dels limfòcits B de memòria.

I per últim, els eosinòfils representen entre l'1 i el 3% dels leucòcits presents a un individu sa. La seva funció principal és defensar de grans paràsits secretant una toxina i enzims que controlen la resposta inflamatòria.

- Les citocines són unes proteïnes, concretament són polipèptids⁶ o glucoproteïnes⁷, que estan formades per entre 120 i 180 aminoàcids i que tenen un baix pes molecular. Aquestes molècules tenen una vida mitja molt curta i actuen en baixes concentracions (en picograms). Poden ser sintetitzades per qualsevol classe de cèl·lula però ha d'estar estimulada per tal de poder-les produir. Un cop sintetitzades, són alliberades a l'espai extracel·lular. Tot i així, algunes es poden acumular a l'interior de la cèl·lula i quedar enganxades a la membrana cel·lular. Les seves funcions principals són regular i coordinar accions de les cèl·lules que intervenen en la resposta immunitària (cada una s'encarrega de regular una cosa diferent a la resta, però hi ha citocines amb els mateixos efectes) i regular altres processos com la mitosi o la mort cel·lular. Generalment, les citocines actuen localment, mitjançant un procés que pot ser: autocrí (sobre la mateixa cèl·lula), paracrí (sobre les cèl·lules veïnes), yuxtacrí (sobre les cèl·lules veïnes però interactuant intercel·lularment), retrocrí (sobre la cèl·lula o les veïnes a través de formes solubles de certs receptors de la membrana) o endocrí (quan s'alliberen a la sang o al sistema limfàtic per afectar a altres òrgans o teixits). Però per produir els seus efectes, primer s'han d'unir a receptors específics de les cèl·lules, per això cada cèl·lula té receptors de múltiples citocines

L'activitat biològica de les citocines es pot mesurar mitjançant bioassaigs. Per exemple, la tècnica Elisa és un immunoassaig que serveix per quantificar la concentració de citocines presents en fluids biològics o l'Elispot que serveix per conèixer el número de cèl·lules productores de citocines.

A més, les citocines poden dividir-se depenent del seu origen, estímul i efectes biològics en cinc grups:

1) Interleucines (IL). Estan numerades segons van ser descobertes. Però cada una té una funció específica. En són exemples la IL-6 i la IL-8. IL-6 és una glicoproteïna secretada per macròfags, fibroblasts, limfòcits T i cèl·lules de l'endoteli; després de la seva activació produïda per un virus, per la IL-1 o el TNF- α . Estimula el creixement i la diferenciació de limfòcits T i limfòcits B. Juntament amb la IL-1 és la principal inductora de síntesi de proteïnes de fase aguda⁸. També pot augmentar la producció de IL-2 i de IL-3. Té activitat antiinflamatòria⁹ i proinflamatòria¹⁰. IL-8 és una interleucina produïda per macròfags, leucòcits, fibroblasts, cèl·lules tumorals, cèl·lules de l'endoteli, cèl·lules del fetge, etc.; després de ser activats per senyals com la IL-1, virus o plaquetes. Inicia la resposta inflamatòria atraient a limfòcits i neutròfils. També estimula la angiogènesi.

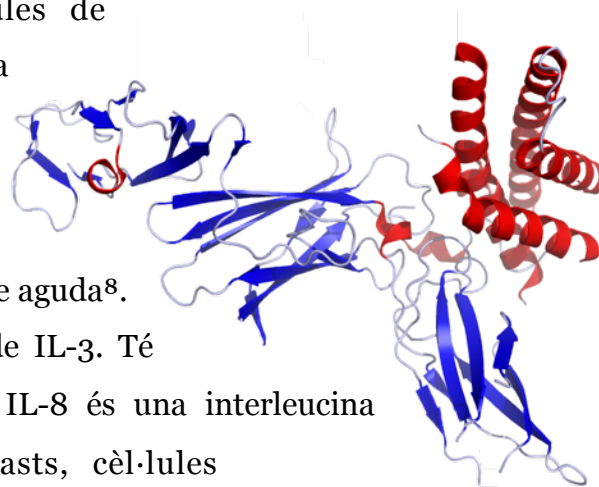


Fig.2 Estructura tridimensional de la interleucina 12

2) Factors de necrosi tumoral (TNF). És el mediador principal de la resposta inflamatòria provocada pels bacteris Gram negatius. Atrau a neutròfils i monòcits per tal d'eradicar els microorganismes. A més, estimula als macròfags i a les cèl·lules de l'endoteli perquè produeixin citocines. Produeix necrosi¹¹ cel·lular quan està present en concentracions elevades. El TNF és secretat per cèl·lules assassines naturals i macròfags. N'hi ha dos: TNF - α i TNF - β .

3) Factors estimuladors de colònies. Són substàncies que estimulen la producció de cèl·lules sanguínies. En són exemples: GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SCF, EPO i LIF.

4) Interferons (INF). Són glicoproteïnes alliberades per qualsevol tipus de cèl·lula. La seva funció és unir-se a la membrana de la cèl·lula que els ha secretat i evitar que sigui infectada. Se'n coneixen tres: INF- γ , INF- β i INF- α . L'interferó γ és produït per limfòcits i cèl·lules NK. La seva presència atrau a macròfags. A més l'INF- γ augmenta l'efecte antitumoral de les NK.

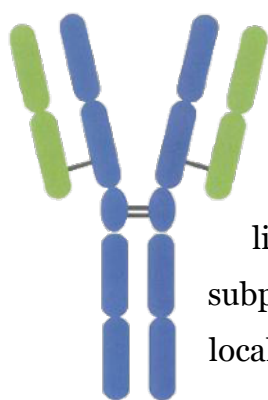
5) Quimiocines. Són sintetitzades per tots els leucòcits, moltes classes de cèl·lules (per exemple els hepatòcits) i cèl·lules tumorals. Actualment tan sols es coneixen 40 quimiocines diferents. Aquestes són proteïnes implicades en l'atracció de leucòcits cap als teixits on s'està duent a terme un procés inflamatori.

2.2 REACCIÓ IMMUNOLÒGICA ADAPTATIVA

També és anomenada específica. Està constituïda pels limfòcits i els seus productes. Els limfòcits són cèl·lules que reconeixen i responen davant d'antígens estranys. Hi ha dues classes de limfòcits: els limfòcits B i els T. Es diferencien pel mecanisme que utilitzen per reconèixer els antígens i per les seves funcions. La reacció als antígens té dues classes de resposta:

- La immunitat humoral.

Aquest és el principal mecanisme de defensa davant els microorganismes. Les cèl·lules que duen a terme aquesta resposta són els limfòcits B. Els limfòcits B són secretors d'anticossos específics i a més, gràcies als anticossos que tenen a la membrana (150.000), també anomenats immunoglobines, endociten de forma selectiva antígens i



després els presenten al seu exterior per tal que els reconeixin els limfòcits T. A més a més, els limfòcits B després d'haver-se unit al seu antígen específic, comencen una proliferació clonal que dura entre 4 o 5 dies, i el resultat és la seva especialització en dues subpoblacions de limfòcits B: cèl·lules plasmàtiques i cèl·lules B de memòria. La primera subpoblació, té com a característiques principals: viuen pocs dies; es localitzen als òrgans limfoides secundaris ja que no circulen ni per la sang ni pels vasos limfàtics i tenen el reticle endoplasmàtic més desenvolupat que

Fig.3 Anticòs

la resta de cèl·lules, per tal de poder secretar més anticossos. D'altra banda, les cèl·lules B de memòria duen a terme una resposta immunitària més ràpida, més efectiva i més intensa al unir-se amb l'antigen específic. I al contrari que les cèl·lules plasmàtiques, poden viure durant llargs períodes, fins hi tot més de 20 o 30 anys. Però si els limfòcits B no han estat activats no s'especialitzen i al cap d'uns dies de ser creats, moren per apoptosi.

- La immunitat cel·lular

En aquesta resposta hi participen els limfòcits T, els quals també tenen receptors d'antígens però que no són anticossos. Aquests receptors d'antígens són molècules de superfície, i els limfòcits T en tenen dues de diferents: CD4+ o CD8+. Depenent de si tenen una molècula o l'altra, són: cèl·lules T col·laboradores o cèl·lules T citotòxiques. Les primeres són

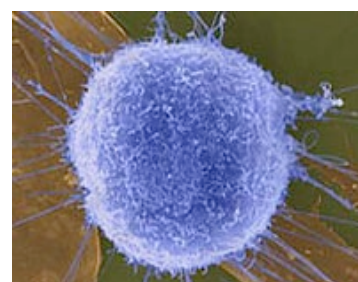


Fig 4. Limfòcit T

aquelles que tenen el receptor de membrana CD4+ i les segones tenen el CD8+. Les col·laboradores s'encarreguen de sintetitzar citocines, gràcies a la secreció de les quals, s'estimulen els macròfags i els limfòcits B perquè produeixin anticossos. D'altra banda, les citotòxiques són capaces de reconèixer les cèl·lules tumorals o les infectades per virus. I gràcies a les senyals proporcionades per les citocines, aquesta classe de cèl·lules proliferen clonalment i es diferencien en limfòcits citolítics. Aquests són capaços de destruir les cèl·lules pròpies que estan infectades o malaltes, gràcies a uns enzims que posseeixen, que poden passar a través dels porus de la membrana i fragmentar l'ADN per tal d'induir a l'apoptosi i també gràcies a les proteïnes, com la perforina, que sintetitzen. Aquestes proteïnes generen porus mortals per les cèl·lules malaltes. Algunes cèl·lules citotòxiques després de dur a terme la seva funció no es destrueixen, sinó que algunes anomenades cèl·lules citotòxiques de memòria, es mantenen per tal de poder actuar de nou si és necessari. Recentment, també s'ha descobert una nova classe de limfòcits T que es localitzen en epitelis i que són capaços de reconèixer certs patògens com els micobacteris.

3. EL CÀNCER

3.1 QUÈ ÉS EL CÀNCER I QUIN ÉS EL SEU INICI

Les cèl·lules es reproduïxen periòdicament i de manera regular per tal de substituir les mortes o envellides, però quan senten que tenen cèl·lules al seu voltant inhibeixen la seva divisió. Tot i així, de vegades els mecanismes de control situats en l'ADN que indiquen a la cèl·lula quan ha de començar a dividir-se i quan parar, s'alteren. Errors durant la replicació de l'ADN, anormalitats de l'ADN que s'han heretat i agents infecciosos o cancerígens poden ser-ne els causants.

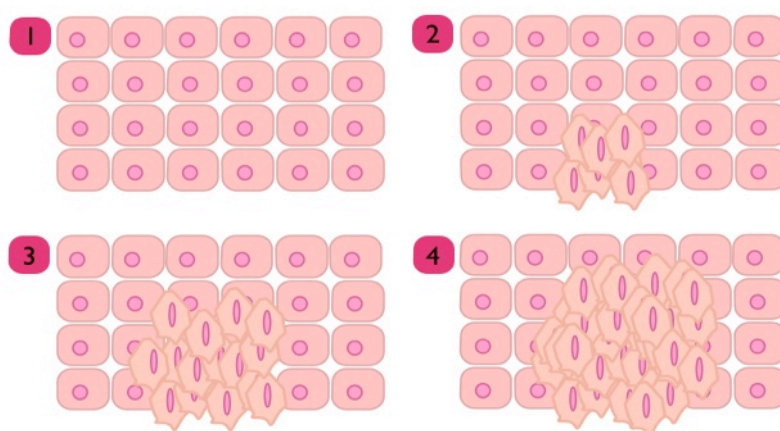


Fig.5 Evolució d'un tumor

Hi ha gens que codifiquen receptors de factors de creixement anomenats protooncogens que són més susceptibles que la resta dels gens a patir mutacions que desencadenin un càncer i al patir una d'aquestes mutacions els protooncogens es passen a anomenar oncògens. Les mutacions poden provocar que els oncògens puguin codificar els factors de creixement i fer que se'n produeixin en excés sense cap mena de control, o bé, que creïn receptors permanentment activats. Com a resultat les cèl·lules inicien una divisió descontrolada. Aquestes cèl·lules ja no n'inhibeixen la seva reproducció al tenir més cèl·lules al voltant i finalment acaben envaint teixits d'altres òrgans. Amb el temps aquestes cèl·lules donaran lloc a un tumor.

Tot i així, no tots els tumors són malignes, també n'hi ha de benignes. La seva principal diferència és que els malignes poden propagar-se per la via sanguínia o limfàtica i d'aquesta forma poden envair els teixits d'altres òrgans i escampar el tumor per altres parts del cos. Els més afectats solen ser els pulmons i els ossos. Tot i així, normalment el

càncer de bufeta només s'escampa localment o pel sistema limfàtic. Aquest procés és anomenat metàstasi. En canvi, els benignes no s'escampen i per aquesta raó, es poden extirpar amb la garantia que en la majoria dels casos no tornaran a créixer.

3.2 ACTUACIÓ DEL SISTEMA IMMUNITARI DAVANT DEL CÀNCER

Encara que les cèl·lules tumorals derivin de les cèl·lules de la persona que pateix el càncer, els tumors provoquen respostes immunitàries. Això passa perquè els tumors expressen antígens que són reconeguts com estranys pel sistema immunitari adaptatiu del portador del tumor. N'és una evidència que es trobin cèl·lules NK (una classe de limfòcits T) i macròfags al voltant dels tumors. Tot i així, la majoria dels tumors expressen només una quantitat d'antígens que poden ser reconeguts com a invasors i com a conseqüència, la majoria provoquen respostes immunitàries dèbils o no en provoquen. Els que sí que les provoquen són els tumors provocats per substàncies cancerígenes o per virus oncògens, ja que en aquestes ocasions es presenten antígens estranys o proteïnes mutades de la persona. Tot i així, molts tumors tenen mecanismes per evadir les respostes del sistema immunitari i a més, en moltes ocasions la rapidesa del creixement del tumor pot superar la de la resposta immunitària d'eradicar les cèl·lules tumorals.

A més, durant la dècada dels 50 es va demostrar que quan s'indueix a un ratolí endogàmic a tenir un tumor, pintant la seva pell amb una substància cancerígena anomenada metilcolantrè¹², si se li extirpa el tumor i aquest es trasplanta a un altre ratolí singènic¹³, en aquest segon, el tumor creix. En canvi, si se li torna a trasplantar al que inicialment el tenia, el ratolí rebutja el tumor perquè s'hi ha tornat immune. I si se li aïllen limfòcits T i es transfereixen al ratolí al qual s'havia trasplantat el tumor, aquest és capaç d'eradicar també el tumor. D'aquesta forma va ser com va quedar demostrat que el sistema immunitari del propi individu pot eradicar el tumor i no recaure. Però com que el sistema immunitari humà no és capaç de fer-ho sol, s'està estudiant com pot ser estimulat per tal que destrueixi eficaçment les cèl·lules tumorals i acabi amb el tumor. Aquesta classe de teràpia es coneix com a immunoteràpia. A més, cal destacar que la principal raó d'interès d'aquesta classe de tractament recau en què actualment, per tal de superar el càncer, s'utilitzen fàrmacs que no distingeixen entre les cèl·lules normals i les tumorals i per tant, creen greus problemes a la proliferació de les cèl·lules normals dels pacients tractats.

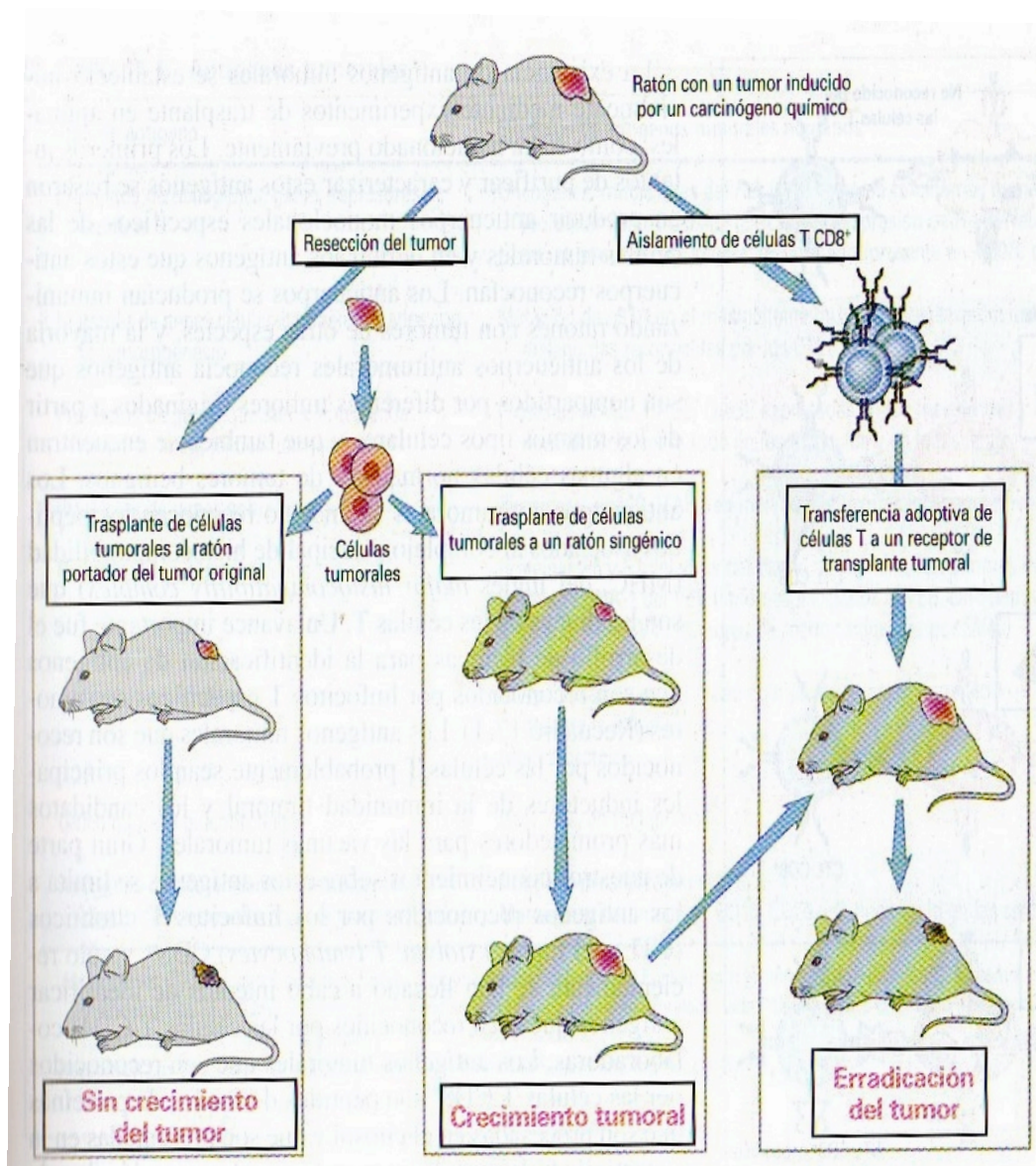


Fig.6 Demostració de la immunitat tumoral

3.3 CLASSES DE CàNCER

Els càncers es poden classificar de moltes maneres. Una d'elles és segons si és invasiu o no. El càncer és invasiu quan el càncer creix cap a les capes més profundes, en canvi, no ho és el que es manté a les cèl·lules que recobreixen la bufeta i per tant, no hi ha cap risc que s'escampi per altres parts del cos.

També es poden classificar segons el lloc on s'origini aquest. I depenent del lloc, cada un rep un nom o un altre. Alguns càncers poden ser curats i la majoria tractats, tot i així, això depèn de: el tipus, el lloc on es localitzi i l'etapa en què es trobi. Però concretament aquest treball es centrarà en el càncer de bufeta.

3.3.1 CÀNCER DE BUFETA

El càncer de bufeta es produeix quan el tumor s'origina en la bufeta urinària. Aquest normalment comença sent superficial i amb el temps, depenent de la classe de càncer de bufeta que sigui, pot arribar a invadir les capes musculars, la paret de la bufeta, l'exterior d'aquesta i fins hi tot altres òrgans; i en els casos més extrems es pot escampar pel sistema limfàtic. Tradicionalment, la incidència en els homes ha estat major, però actualment està incrementant la seva afectació a les dones.

3.3.1.1 ESTRUCTURA DE LA BUFETA

La bufeta és un òrgan en forma de bossa que emmagatzema l'orina, procedent dels ronyons, fins que aquesta és expulsada a l'exterior. Aquest òrgan està format per tres capes: una capa serosa, una capa muscular i una capa mucosa. La capa muscular està formada pel múscul detrusor un múscul llis que envolta a la bufeta i juntament amb els músculs abdominals és l'encarregat de la contracció d'aquesta en el moment de l'evacuació de l'orina a través de la uretra; aquest acte és anomenat micció. A la vegada, el múscul detrusor està recobert pel peritoneu que descansa sobre una capa fina de teixit connectiu. El peritoneu forma la capa serosa. I per últim, la capa mucosa està formada per un epitelí transicional. Aquesta capa forma l'interior de la bufeta ja que és impermeable. Aquesta classe d'epitelí és un teixit estratificat en el qual les cèl·lules superficials són rodones però quan el teixit s'estén s'aplanen.

La cúpula vesical és la part superior de la bufeta. És molt àmplia i va augmentant el seu volum a mesura que la bufeta està més plena d'orina. Els ronyons i la bufeta estan comunicats mitjançant els urèters. L'orina va a parar a la bufeta pels orificis ureterals; aquests són dos i creen una forma de triangle amb el trígon situat a la base de la bufeta. El trígon és una àrea de la base de la bufeta. En aquesta zona també hi ha un plec anomenat plec interuretèric i s'estén entre els orificis ureterals. La part de la bufeta que es comunica amb la uretra està envoltada per dos esfínters¹⁴. La seva funció és impedir que l'orina surti involuntàriament. Tot i així, a més hi ha fibres estirades que ajuden a retenir l'orina voluntàriament.

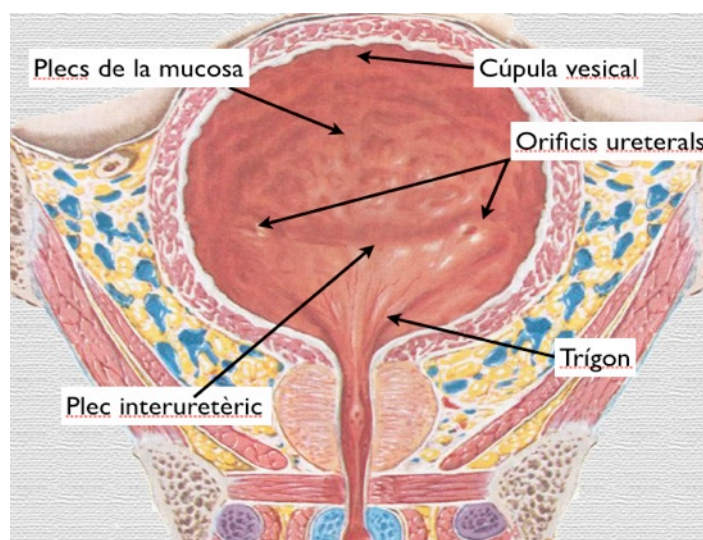


Fig.7 Parts de la bufeta urinària

3.3.1.2 CAUSES DEL CÀNCER DE BUFETA

No hi ha una clara causa principal pel desenvolupament de càncer de bufeta, però es creu que hi ha diversos factors que el provoquen:

- El consum de tabac. Els fumadors tenen el doble de probabilitats de patir càncer de bufeta que els qui no fumen. Ja que al fumar, els pulmons absorbeixen les substàncies cancerígenes que porta el tabac i les passen a la sang. Seguidament a través dels vasos sanguinis la sang va a parar als ronyons, on moltes de les substàncies cancerígenes presents són filtrades i incorporades a la orina. Aquesta orina plena de substàncies cancerígenes està molta estona en contacte amb la membrana que revesteix l'interior de la bufeta i quan aquesta es buida, seguidament es torna omplir amb noves substàncies de la mateixa classe. Per tant, com que la bufeta dels fumadors està constantment en contacte amb cancerígens, com a conseqüència hi ha un alt risc de patir càncer en aquesta zona del cos.
- Infeccions urinàries. Tot i que no està completament comprovat es creu que la irritació de la membrana de la bufeta produïda per repetides infeccions urinàries pot ser un factor de predisposició al càncer d'aquesta classe.
- La esquistosomiasis. És una infecció produïda pel contacte amb aigua contaminada ja que en aquesta hi viu un paràsit anomenat cercària. Un cop aquest paràsit entra en contacte amb les persones penetra a la pell i madura. A continuació emigra cap als pulmons i al fetge, on pot desenvolupar-se fins a la seva forma adulta. Llavors l'adult torna a migrar cap a una altra part del cos que pot ser: els intestins, el recte, el fetge, els

pulmons, les venes que transporten la sang des dels intestins fins al fetge, la melsa o la bufeta; depenent de l'espècie. Concretament a la bufeta aquest paràsit produeix una irritació crònica que pot originar un càncer.

- L'exposició a determinades substàncies químiques industrials com dissolvents, colorants i també a altres substàncies cancerígenes. Algunes d'aquestes són la b-naftilamina, la benzidina, 4-amino-bifenil, la MOCA i la O-toluidina. Per tant, les persones que treballen en els sectors tèxtil, del cuir, del cautxú, de la impremta, del petroli, del metall, els maquinistes, el pintors, els perruquers i els camioners; són persones que estan en contacte amb productes químics tòxics, cosa que poden inhalar i a la llarga patir aquest càncer. Aquestes persones representen entre el 20-25% dels casos de càncer de bufeta.



Fig.8 Pots de pintura

- El tractament de quimioteràpia amb ciclofosfamida. La ciclofosfamida és una droga que s'utilitza per evitar o revertir la fibrosis pulmonar als pacients amb esclerodèrmia. Els qui tenen aquesta malaltia tenen una acumulació de col·làgena a la pell i a altres òrgans.

- Dieta. El consum alt de grasses i fregits contribueix a l'aparició de càncer.

- Les persones de raça blanca que tenen entre 65 i 85 anys tenen més possibilitats de patir-lo que les persones joves.

- La predisposició genètica.

- L'exposició a l'arsènic.

- La radioteràpia que reben les dones que tenen càncer d'úter és un factor de risc per tenir càncer de bufeta de les cèl·lules de transició.

3.3.1.4 VARIANTS DEL CÀNCER DE BUFETA

- Carcinoma de les cèl·lules de transició, també anomenat carcinoma urotelial. Més del 90% dels càncers de bufeta són d'aquesta classe, per tant, és el més comú. S'anomenen així perquè el càncer es comença a desenvolupar en el recobriment de la bufeta. N'hi ha de dues classes: tumors papil·lars i els carcinomes plans. Aquests primers creixen des de la superfície interna de la bufeta fins al centre buit. Formant així una forma similar a un cactus. Aquesta classe de càncer pot ser tant invasiu com no ser-ho. En canvi, en els carcinomes plans només es veuen involucrades les cèl·lules del revestiment de la bufeta i el tumor mai creix cap a la part buida d'aquesta. Aquesta classe sol ser un càncer no invasiu,

tot i així aquest es pot complicar i créixer inclús fins al múscul. Serà llavors quan parlarem d'un càncer de bufeta invasiu.

- L'adenocarcinoma té entre 1 i 2% d'afectació a les persones que pateixen càncer de bufeta. Casi tots els adenocarcinomes són invasius.

De adenocarcinomes n'hi ha de dues classes: de les cèl·lules escamoses i de cèl·lules petites. El 4% de les persones que tenen el càncer de bufeta és de cèl·lules escamoses i la majoria de carcinomes d'aquest tipus són invasius. En canvi, els carcinomes de cèl·lules petites tan sols el pateixen l'1% dels afectats pel càncer de bufeta.

- Els sarcomes són anomenats així els càncers que s'originen al múscul de la bufeta. No són gaire comuns i normalment els pateixen els nens petits.

- La invasió limfàtica es produeix quan el càncer s'escampa mitjançant el sistema limfàtic cap a altres parts del cos. Normalment primer s'escampa cap els ganglis limfàtics perivesiculars.

3.3.1.5 GRAU D'INVASIÓ

Hi ha diferents estadis de càncer de bufeta per aquesta raó s'utilitza un sistema anomenat TNM per poder-los definir. La TNM és una sigla i com a tal, cada lletra té un significat. La T indica el grau d'invasió de la bufeta i d'altres teixits l'extensió del tumor. El grau va de l'1 al 4 i com més gran és el número que acompanya la T vol dir que el tumor està més estès. La N descriu si el càncer s'ha escampat pels ganglis limfàtics¹⁵ i es numera de l'1 al 3. Finalment, la M indica les metàstasis.

Ta- Tumors papil·lars no invasius.

Tis- Carcinoma in situ. És a dir cèl·lules amb un numero triaploide i tetraploide de cromosomes.

T1- Són classificats en aquest grau aquells que envaeixen la mucosa de la bufeta.

T2- En són els tumors que envaeixen el múscul de la paret de la bufeta

T2a: Són aquells que envaeixen el múscul superficial.

T2b: Envaeixen el múscul profund.

T3- Ho són els que arriben a l'exterior de la bufeta

T3a- A l'exterior de la bufeta hi ha cèl·lules microscòpiques

T3b- A l'exterior de la bufeta es poden apreciar cèl·lules a simple vista.

T4- Són aquells que s'han escampat per altres òrgans.

T4a- S'ha escampat per la pròstata, la vagina o l'úter

T4b- S'ha escampat cap a l'abdomen o la paret pèlvica.

N0- No envaeix els ganglis limfàtics

N1- El càncer envaeix a un gangli de menys de 2 cm.

N2- El tumor envaeix a ganglis de entre 2 i 5 cm.

N3- S'han envaït ganglis limfàtics de més de 5 cm.

M0- No s'envaeixen altres òrgans

M1- S'invadeixen òrgans que no són propers a la bufeta.

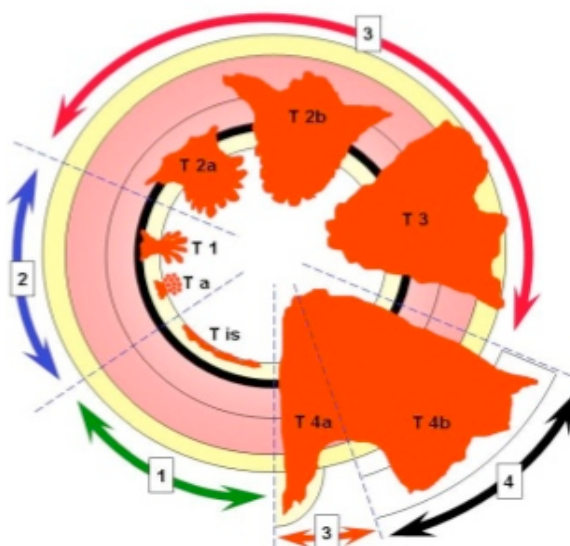


Fig.9 Representació de les capes de la bufeta: la mucosa (blanc), la submucosa (negre), el múscul (rosa) i la grassa perivesical (groc). I en taronja es representen els graus d'invasió. A més, les fletxes representen els estadis d'evolució del tumor.

3.3.1.6 TRACTAMENTS DEL CÀNCER DE BUFETA

Hi ha diferents tractaments per tal de curar el càncer de bufeta depenent de la classe de càncer i del grau d'invasió. A continuació hi ha explicades les teràpies que se solen utilitzar: la cirurgia, la radioteràpia, la quimioteràpia, la fototeràpia i la immunoteràpia:

- Cirurgia

Abans de dur-la a terme s'ha de realitzar un estudi preoperatori que consisteix en: un anàlisi de sang i coagulació, un electrocardiograma, una radiografia del tòrax i una consulta amb l'anestèsista que és qui determinarà el risc que té l'anestèsia general pel pacient. A més a més, és necessari un ingrés hospitalari, el qual pot durar entre una i dues setmanes, després de l'operació. Classes de cirurgia utilitzades:

1) Resecció¹⁶ transuteral (RTU). És el tractament més comú del càncer de bufeta. Aquesta classe de cirurgia tan sols es pot aplicar a tumors que no estiguin dispersos i que no siguin gaire grans ni profunds. Consisteix en inserir a la bufeta, a través de la uretra, un tub llarg, flexible i amb llum; anomenat cistoscopi¹⁷. En el seu extrem hi ha un sistema que permet tallar el tumor i extreure'l de la bufeta. També pot anar-hi un sistema que sigui capaç de cremar el càncer. Un cop finalitzada la intervenció es deixa col·locada una sonda vesical¹⁸ per tal de poder fer-hi rentats amb sèrums fisiològics¹⁹ fins que desapareix-hi l'hemorràgia. Durant els tres primers dies, el malalt pot sentir dolor i cremor al orinar. Al cap de 3 a 7 dies de la intervenció els metges retiren la sonda vesical i el pacient és donat d'alta. El principal avantatge de la resecció transuteral és que aquesta cirurgia no fa malbé la bufeta i per tant, es pot seguir orinant de forma natural. Però tot i que aquesta teràpia és efectiva, la possibilitat de recurrència del tumor és força elevada.

2) Cistectomia. Quan el càncer de bufeta és invasor, és a dir, que s'escampa més enllà del teixit en el qual va començar, s'ha d'extirpar parcialment (cistectomia parcial) o totalment (cistectomia radical) la bufeta. La cistectomia parcial no és gaire utilitzada i tan sols es du a terme quan el càncer es troba limitat a una zona de la bufeta. Consisteix en treure la part de la bufeta on es troba el càncer. D'altra banda, la radical és la més utilitzada. Es basa en l'extirpació de la bufeta i la resecció els ganglis limfàtics i òrgans pròxims. Els teixits extirpats a les dones, normalment, són: l'úter, els ovaris, les trompes de falopi, part de la vagina i la uretra. En canvi, en els homes es sol extirpar: la pròstata, les vesícules seminals i, de vegades, també és necessari extirpar també l'uretra.

Després de la intervenció els malalts han de prendre uns medicaments per tal d'alleugerir el dolor postoperatori. I el personal sanitari s'encarrega de cuidar i netejar la zona intervinguda fins que els punts siguin retirats. Posteriorment de la operació, s'ha de realitzar una urostomia. Aquesta és una obertura a l'abdomen per tal que l'orina pugui ser

evacuada a l'exterior del cos. Com que l'esfínter és qui regula l'expulsió de l'orina en una persona sana i als malalts després de que se'ls hagi realitzat una urostomia, l'orina no surt pel seu camí natural, per tant no pot ser controlada de forma voluntària, per això és necessari per poder recollir l'orina, portar una bossa a sobre.

- Radioteràpia

Normalment s'utilitza quan els pacients no poden o no volen sotmetre's a la cirurgia. Tot i així, de vegades és un complement de la cirurgia per disminuir la possibilitat de recaiguda, o també s'utilitza com a tractament pal·liatiu perquè en els casos de càncer incurables els símptomes millorin. Abans de començar les sessions cal dur a terme una comprovació, anomenada simulació, que consisteix en definir les parts del cos que s'irradiaran.

Hi ha dues classes de radioteràpia: externa i interna. En la primera s'utilitzen màquines anomenades acceleradors lineals que en cap moment contacten amb el pacient però que emeten radiacions X que destrueixen les cèl·lules cancerígenes. En canvi, en la segona, també anomenada radioteràpia intersticial, s'utilitza material radioactiu que s'introdueix a l'interior de l'organisme en contacte directe amb el tumor. Aquestes substàncies es retiren al cap d'uns dies.

Els efectes adversos més comuns són les nàusees i els vòmits. Tot i així, abans d'administrar el tractament de radioteràpia es recreen medicaments anomenats antiemètics, per tal de prevenir aquesta situació. Altres efectes secundaris són la caiguda de cabell i la reducció de glòbuls vermells i blancs a la sang.

- Quimioteràpia

La quimioteràpia es basa en utilitzar fàrmacs per destruir les cèl·lules cancerígenes o bé per ajudar a prevenir la reparació del tumor. La quimioteràpia pot constar d'un sol medicament o de combinacions. Alguns dels més utilitzats són: el Carboplatí, el Cisplatí, la Ciclofosfamida, el Docetaxel, la Doxorubicina, la Gemcitabina, la Ifosamida, el Metotrexato, el Paclitaxel, la Mitomicina o la Vinblastina. Els medicaments es poden subministrar tan abans de la cirurgia, per així reduir la mida del tumor i facilitar l'extirpació, com després, per tal de prevenir la reparació del càncer de bufeta. Tot i així, sempre és necessari prèviament realitzar un anàlisi de sang per determinar els nivells de

glòbuls vermells i glòbuls blancs; a més de mirar si la funció hepàtica i renal és correcta. Depenent dels resultats obtinguts les dosis dels medicaments variaran.

Però no tots els fàrmacs utilitzats actuen de la mateixa forma. N'hi ha de dues classes: els específics al cicle cel·lular i els no específics al cicle cel·lular. Tal com el seu nom indica, els específics al cicle cel·lular, destrueixen les cèl·lules durant la divisió cel·lular. I els altres les destrueixen quan estan en fase de repòs. Cal remarcar que el procés de divisió cel·lular es realitza a través del cicle cel·lular, que va des d'una fase de repòs fins a la mitosi (que és la divisió).

L'inconvenient principal de la quimioteràpia és que els fàrmacs no reconeixen la diferència entre les cèl·lules tumorals i les que no ho són, per tant, actua en les dues classes de cèl·lules (tot i que en les no tumorals ho fa en menor intensitat); cosa que provoca efectes secundaris. Quan es deixa d'administrar la quimioteràpia, les cèl·lules que no són tumorals tornen a créixer i els efectes secundaris desapareixen. Les cèl·lules sanguínies, les de la boca, l'estómac, l'intestí i els fol·licles pilosos²⁰; solen ser les cèl·lules no tumorals més afectades pels fàrmacs utilitzats en la quimioteràpia.

Els fàrmacs utilitzats danyen l'ADN o l'ARN que indica a la cèl·lula com fer una còpia de si mateixa. Quan aquesta no pot dividir-se, mor sense cap còpia d'ella. Aquesta classe de fàrmacs, són molt efectius per destruir les cèl·lules que es divideixen ràpidament, i com que les cèl·lules tumorals ho fan molt més ràpid que la resta, aconsegueixen reduir la mida del tumor ràpidament. A més, també indueixen a les cèl·lules a morir per apoptosi o per mort cel·lular programada.

A més, la quimioteràpia en el càncer de bufeta pot administrar-se de dues formes: per via intravesical o per via intravenosa. La intravesical s'utilitza com a part del tractament dels tumors superficials, després de realitzar la resecció transuteral. Els fàrmacs d'aquest tractament es subministren directament a la bufeta a través d'un caràcter²¹ i s'han de mantenir durant dues hores a la bufeta. Aquesta forma de subministrament normalment es du a terme quan els tumors no són invasius i estan limitats a la bufeta o quan s'estenen a través de la paret d'aquesta però no arriben al múscul. D'altra banda, quan els fàrmacs s'administren per via intravenosa, s'introdueixen en una vena per on viatgen per tot l'organisme. Aquesta darrera via, s'utilitza quan el càncer invadeix el múscul, quan el

traspasa i s'expandeix fins el teixit que recobreix la bufeta o quan el tumor s'ha estès cap als ganglis limfàtics. Les dues classes de quimioteràpia es realitzen mitjançant cicles ja que la seva administració depèn de la classe de cèl·lules, la velocitat en què es divideixen i en el moment que el fàrmac pot ser eficaç. S'alterna el temps de tractament (normalment subministrat a l'ambulatori) i el temps de descans (que pot oscil·lar entre 3 o 4 setmanes). Durant el període de descans es pot portar una vida normal. Però sempre abans de començar un nou cicle de tractament s'han de repetir els anàlisis de sang i orina. D'aquesta forma, el metge s'assegura que la quimioteràpia no té un efecte negatiu al pacient fent-li mal als ronyons o alterant el nivell de glòbuls blancs.

Els efectes secundaris depenen dels fàrmacs administrats, però els més comuns són: vòmits, caiguda de cabell, deficiència de glòbuls blancs, diarrea, etc.

Mitomicina

La Mitomicina és un fàrmac antitumoral utilitzat en la quimioteràpia de diferents classes de càncer. Concretament, s'administra com a tractament de: l'adenocarcinoma d'estómac o de pàncrees, el càncer anal, càncer de bufeta, el de mama, cervical, el de pulmó o el de cap i coll, etc. Els tipus de fàrmac com la Mitomicina estan fets amb productes naturals produïts per diferents espècies del Streptomices²² i són específics al cicle cel·lular.

Aquest antibiòtic antitumoral s'activa en els teixits i té dos mecanismes d'acció. Un, és desorganitzar l'àcid desoxiribonucleic de les cèl·lules cancerígenes mitjançant la formació de complexos amb l'ADN. I l'altre, és inhibir la divisió cel·lular interferint en la síntesi de l'ADN.

La quantitat administrada de Mitomicina és diferent en cada pacient ja que depèn de molts factors com: l'altura, el pes, el tipus de càncer, altres malalties, etc. Però aquest medicament, sempre l'ha d'administrar un metge o una infermera ja que és una substància vesicant; i com a tal provoca un gran dany tissular²³ i la formació d'ampolles si s'escapa de la vena. Normalment la Mitomicina s'injecta de forma intravenosa. Però en el càncer de bufeta s'administra directament a la bufeta a través d'un catèter urinari inserit a través de la uretra. Moure's i caminar és beneficiós mentre es té la solució a la bufeta ja que ajuda a què es dispersi. Després d'unes dues hores el pacient ha d'orinar per tal de buidar la bufeta.

Els efectes adversos provocats per la Mitomicina depenen de la dosi i de la manera d'administració. Però els més comuns són: nàusees, vòmits, pèrdua de gana, cabell més fràgil que de costum, cansament i disminució temporal dels glòbuls blancs, dels vermells i de les plaquetes (TAULA 1). Normalment tan sols es tenen alguns dels efectes mencionats anteriorment i, tal com s'ha dit abans, desapareixen al finalitzar el tractament. A més, hi ha diverses formes de minimitzar i prevenir les reaccions adverses.

TAULA 1: Efectes secundaris i probabilitat d'aquests en el la quimioteràpia amb Mitomicina

EFFECTES SECUNDARIS	MITOMICINA C
Micció freqüent	42%
Dolor al orinar	35%
Síntomes de grip	20%
Febre o calfreds	3%
Infeccions sistèmiques	No hi ha informació
Rash cutani ²⁴	13%
Supressió de l'activitat de la medul·la òssea	2%

- Fototeràpia.

La fototeràpia consisteix en injectar fotosensibilitzadors, és a dir, molècules sensibles a la llum, al torrent sanguini. D'aquesta manera les cèl·lules de tot el cos les absorbeixen. Els fotosensibilitzadors romanen més temps dins de les cèl·lules cancerígenes que no pas de les cèl·lules sanes, per tant, al inserir un cistoscopi a dins de la bufeta, com que aquest porta incorporat un làser, les cèl·lules tumorals moren a causa de l'activació de les molècules sensibles a la llum. Aquesta classe de teràpia es relativament nova i tan sols funciona amb els tumors superficials del càncer de bufeta. Però com tots els tractaments, té diversos efectes secundaris. Aquests són, fotosensibilitat severa, ja que la fototeràpia fa ser, als pacients, més sensibles al sol i per tant, es poden cremar amb facilitat; símptomes gripals com el malestar; nàusees; calfreds; febre; dolor; necessitat urgent i freqüent d'orinar i també hematúria.

- Immunoteràpia

Per evitar la recurrència del càncer, després d'haver extirpat el tumor mitjançant una resecció transuteral, normalment es du a terme la immunoteràpia. Aquest és un tractament basat en l'estimulació del sistema immunitari gràcies a la utilització del BCG (bacil²⁵ de Calmette-Guerin) en forma de solució (Vejiour, Oncotice o Immucyst). Aquesta

estimulació provoca que les cèl·lules del sistema immunològic siguin capaces de destruir el tumor o les restes que en queda.

El BCG és el micobacteri que provoca la tuberculosi (*Mycobacterium bovis*) però pel tractament de càncer de bufeta, està modificat genèticament perquè no sigui capaç de produir la infecció. Aquest és més eficaç que altres estratègies terapèutiques ja que provoca una llarga activació del sistema immunològic, a més es pot tractar el tumor *in situ*, es preveu la progressió de la malaltia i es redueixen les recurrències del càncer.



Fig.10 BCG

El medicament s'administra directament dins de la bufeta del pacient gràcies a un catèter de Foley i aquest l'ha de mantenir durant dues hores. Primer de tot, el BCG s'ha d'unir a la bufeta, cosa que depèn de la interacció entre la fibroctenina del bacteri i la del uroteli, és a dir, el bacteri ha d'interaccionar amb la del recobriment de les vies urinàries. Aconseguir que el BCG s'uneixi al uroteli és el més complicat ja que han d'interaccionar l'antigen 85²⁶ de la superfície de la membrana del micobacteri amb la fibroctenina present a la paret de la bufeta.

Les cèl·lules uroepiteliales²⁷ responen al BCG a través de receptors membranals. Aquests receptors són molècules que regulen la concentració de citocines com la IL-1, IL-6 o IL-8 i del factor de necrosi tumoral gràcies al qual s'estimulen macròfags per tal d'activar el factor kB. Aquest factor s'encarrega de regular la resposta immunitària; per tant, estimula més la producció de citocines per part de les cèl·lules uroepiteliales, provoca que les cèl·lules cancerígenes morin per apoptosi i per últim, estimula la producció de més macròfags. Però les primeres cèl·lules del sistema immunitari que entren en contacte amb la bufeta són les polimorfonuclears (els granulòcits²⁸). Aquests són els primers fagòcits que arriben a la zona d'infecció, en aquest cas al lloc on ha estat inserit el BCG. Al entrar en contacte amb el *Mycobacterium*, secreten més citocines com la IL-8, el factor de creixement, la proteïna 1-alpha inflammatòria i el factor inhibidor de la migració. Les citocines atrauen a macròfags i limfòcits TCD4+ i a la vegada aquests secreten més citocines, entre elles, IFN-γ, IL-2 i IL-12. Aquestes al mateix temps, atrauen a més macròfags i a limfòcits B. Estudis *in vitro* han demostrat que les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica²⁹ després d'haver estat estimulades amb el BCG i gràcies al augment de la presència de IFN-γ, IL-2 i IL-12;

adquireixen la capacitat d'aniquilar cèl·lules tumorals de la bufeta a través del què són capaces de secretar: la perforina. En el moment que es converteixen cèl·lules assassines naturals, s'anomenen BAK (BGC activated killer). (ANNEX 1)

A causa del BCG, granulòcits, limfòcits i macròfags arriben a la bufeta. Aquest s'expressen antígens d'activació que poden durar fins a dos mesos després de l'aplicació inicial del bacil. L'acumulació de cèl·lules immunocompetents pot ser un centre d'activació immunològica local i persistent.

El resultat d'aquest procés són més cèl·lules del sistema immunitari atretes cap a la paret de la bufeta i d'aquesta forma es provoca una cascada immunològica. La gran varietat de cèl·lules immunocompetents, les cèl·lules del uroepiteli i les cèl·lules de la bufeta participen en el sistema immunològic durant la teràpia intravesical amb el BCG.

Actualment es quantifiquen les IL-2 i les IL-8 presents en l'orina dels pacients per tal d'establir un pronòstic de recurrència al tumor. Però aquest no és del tot fiable ja que sembla ser que la producció de citocines varia entre els pacients i no s'ha trobat cap altre marcador de pronòstic que pugui indicar com podria arribar de ser beneficiosa aquesta teràpia per cada pacient. Per aquesta raó, s'estan investigant marcadors de pronòstics fiables. Sembla ser que una opció seria veure les variacions en l'ADN de la seqüència dels gens que codifiquen les citocines, ja que s'han descobert certs polimorfismes³⁰ de citocines antiinflamatòries com a factors de risc per la progressió de càncer de bufeta. Per tant, si s'aconsegueix saber exactament quins polimorfismes són els factors de risc, observant l'ADN dels pacients, es podria saber quina és la teràpia més adequada per a cada un.

Un altre inconvenient és que no se sap si el BCG retarda o prevé la progressió del tumor, tampoc si es necessària una teràpia de manteniment, ni quins són els seus efectes adversos. Ni tan sols quina classe de pacients se'n podrien beneficiar més d'aquesta teràpia. Actualment, entre 2-3 setmanes després de la resecció transuteral, durant sis setmanes, aquest tractament es du a terme una vegada per setmana i s'administren 81mg de BCG. Però tot i així, no es sap quina n'és la dosis ideal. Per aquesta raó, es duen a terme forces estudis on es compara una dosis de 27mg amb l'actual. Sembla ser que a la dosis més baixa s'observa una menor toxicitat. Potser administrant una dosis més baixa s'eliminarien o es reduirien alguns dels efectes secundaris actuals, ja que el 90% dels

pacients tractats amb aquesta solució pateixen: cistitis³¹, augment de la freqüència urinària, dolor i cremor a l'orinar i també sensació urgent d'orinar. A més hi ha altres efectes adversos, tot i que menys freqüents, com: el malestar, nàusees, calfreds, dolors en les articulacions i sang en l'orina anomenada hematúria (TAULA 2). Rarament una infecció sistèmica³² n'és un efecte secundari, però n'és un símptoma la febre elevada durant més d'un dia. Tot i així, aquests efectes secundaris no són permanents, sinó que desapareixen pocs dies després d'haver acabat el tractament.

TAULA 2: Efectes secundaris i probabilitat d'aquests en el la immonuteràpia amb BCG

EFFECTES SECUNDARIS	BCG
Micció freqüent	63%
Dolor al orinar	75%
Símptomes de grip	24%
Febre o calfreds	27%
Infeccions sistèmiques	4%
Rash cutani	6%
Supresió de l'activitat de la medul·la òssea	1%

Cal dir que el malalt no pot beure res a partir de 4 hores abans que li introdueixin la suspensió a la bufeta, ni tampoc durant les dues hores que la mantindrà. I a més, en el moment que aquesta sigui introduïda mitjançant el catèter a dins de la bufeta, aquesta ha d'estar buida d'orina. Un cop l'hagin introduïda el pacient s'ha de moure el més possible per tal que aquesta estigui en contacte amb tota la superfície mucosa de la bufeta. Al cap de dues hores, per tal d'expulsar-la s'ha d'orinar.

En els tumors d'alt risc, tot i que la cascada immunològica pot perdurar fins a un any, actualment es du a terme una teràpia de manteniment amb la solució del bacil Calmette-Guerin que s'aplica cada 3 o 6 mesos durant un any, ja que és durant aquest temps quan les cèl·lules del sistema immunitari comencen a marxar. Un altre esquema de teràpia de manteniment consisteix inicialment una administració per setmana durant sis setmanes i després tres setmanals en els mesos 3,6,12,18,24,30 i 36. Per tant, en total són 27 administracions en 3 anys.

Respecte les contraindicacions, la solució de BCG no la poden utilitzar pacients immunodeprimits ni persones que tinguin deficiències immunològiques. Tampoc es pot

administrar a persones que tinguin activa la tuberculosi. I a més, les persones tractades amb radioteràpia vesical o les dones en fase de lactància no poden utilitzar-lo.

Micobacteris

Els micobacteris pertanyen al gènere *Mycobacterium*. El qual és l'únic gènere de la família *Mycobacteriaceae*. Actualment, se'n coneixen més de 50 espècies diferents, àmpliament distribuïts a la naturalesa. Tots els micobacteris són bacils prims, que poden ser lleugerament corbats, i mesuren aproximadament entre 0,2 i 0,6 µm d'ample per 3-10 µm de llarg. Els micobacteris són organismes aerobis i per tant, necessiten oxigen diatòmic per a poder viure. També n'hi ha alguns que són microaeròfils, per tant, aquests necessiten una atmosfera amb baixa tensió d'oxigen, és dir, amb només un 5% d'oxigen. A més a més, la seva temperatura de creixement òptima va des dels 25°C als 40°C aproximadament. Però per créixer, a part d'una temperatura òptima i la presència d'oxigen, necessiten una atmosfera amb entre el 5 i el 10% de diòxid de carboni. Tot i així, aquests organismes creixen i es reproduïxen molt lentament si els comparem amb altres bacteris; ja que fins al cap de 7 dies, com a mínim, no són visibles les colònies en una placa amb un medi de cultiu apropiat. Els que en tenen prou amb 7 dies per ser visibles, s'anomenen micobacteris de cultiu ràpid. En canvi, els que necessiten períodes més llargs s'anomenen de cultiu lent. Cal aclarir que el micobacteris poden aïllar-se del terra i d'habitats aquàtics per tal de ser cultivats, però algunes espècies són molt difícils de cultivar i d'altres, com el *Mycobacterium leprae*, només es pot en presència de cèl·lules. Els medis de cultiu poden ser tant líquids com sòlids. Els sòlids poden ser en base d'agar i en base d'ou (Lowenstein- Jensen).



Fig.11 *Mycobacterium leprae*

D'altra banda, aquests organismes no són mòbils, excepte el *M. marinum* ja que aquest es mou dins dels macròfags. I es reproduïxen per fracció binària, és a dir, el micobacteri es parteix en dos i dona a lloc a dues cèl·lules filles de la mateixa mida.

Respecte la seva composició, els micobacteris tenen un contingut alt en lípids, entre el 20 i el 60%, per aquesta raó tenen àcid-alcohol resistència. I estructuralment, com totes les cèl·lules procariotes tenen: membrana plasmàtica, paret cel·lular i citoplasma. A la seva membrana plasmàtica hi abunden lípids i la seva funció és proporcionar protecció

osmòtica i permetre fer intercanvi d'ions. D'altra banda, la seva paret cel·lular, és més gruixuda que la de la majoria dels bacteris i està formada per tres capes per tal d'oferir protecció i suport mecànic. La capa més externa té una estructura glucolipídica, la mitja és rica en àcids micòlics i la més interna està formada per peptidoglicà i polisacàrids. A més, a la paret cel·lular hi tenen proteïnes. Algunes de les quals són enzims que participen en la reconstrucció de la paret durant la divisió cel·lular. I finalment, en el citoplasma tenen abundants grànuls. Per aquesta raó resisteixen a la majoria dels tins comuns, com per exemple a la tinció de gram. Tot i així, es consideren gram positius.

Hi ha diverses classificacions de micobacteris. Una és segons la producció d'un pigment. Si pigmenten en foscor, s'anomenen escotocromògens. En canvi si pigmenten després de l'exposició a la llum, s'anomenen fotocromògens. Una altra classificació és segons si són patògens o no:

- Espècies que sempre són patògenes per l'humà. Aquestes solen ocasionar malalties cròniques.
- Espècies que mai són patògenes per l'humà.
- Espècies que poden convertir-se en patògenes per l'humà. Aquestes s'anomenen micobacteris atípics.

Tinció de Gram

Mitjançant la tinció de Gram podem determinar si els bacteris són Gram positiu o negatiu ja que es tenyeixen de forma diferent a causa de l'estructura de la seva paret cel·lular. Els Gram positiu tenen entre el 80 i 90% de la paret cel·lular composta per peptidoglicà³³, en canvi, els gram negatiu tenen una paret molt més fina (només té entre un 10 i un 20% de pepidoglicà) i està rodejada d'una membrana exterior de fosfolípids, lipopolisacàrids i lipoproteïnes.

Per dur a terme aquesta tinció s'han de tenyir els bacteris durant un minut amb cristalls violetes. Seguidament s'han de rentar amb aigua i tenyir-los de nou amb lugol³⁴. Al cap d'un minut cal tornar-los a rentar amb aigua i finalment s'han de cobrir amb safranina alcohòlica durant uns 20 segons. Es renten i s'assequen. Al tenyir els bacteris sabem que són gram positiu perquè adquireixen un color blau i un color vermell els gram negatiu. Això succeeix d'aquesta forma ja que en els bacteris gram positiu, els cristalls violeta són retinguts pel peptidoglicà de la paret cel·lular i no deixa que res més penetri. En canvi en

les gram negatiu tot i també quedar tenyides pels cristalls violetes, l'etanol penetra per la membrana externa i el cristall violeta marxa. D'aquesta forma al afegir la safranina alcohòlica³⁵, queden tenyits.

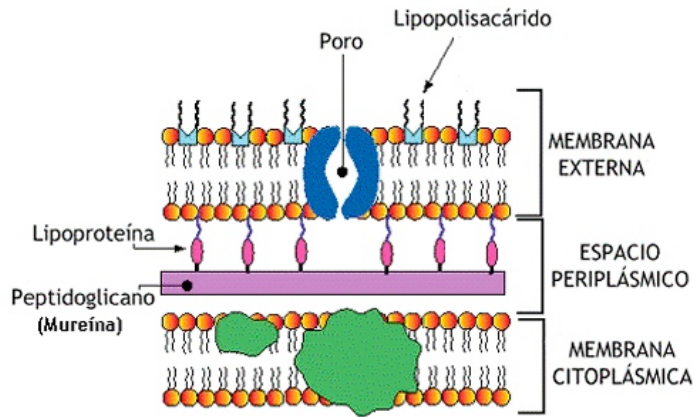


Fig.12 Bacteri Gram negatiu

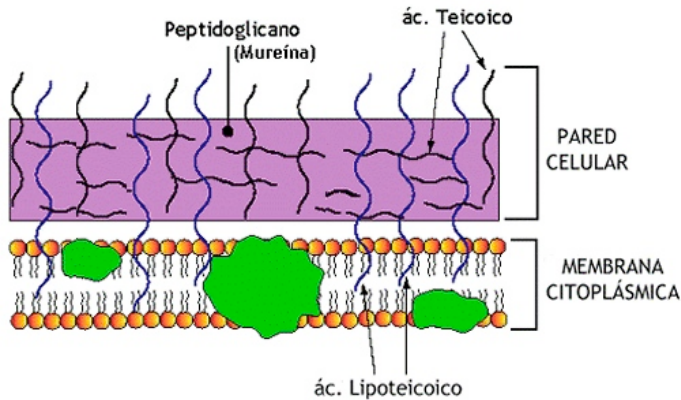


Fig.13 Bacteri Gram positiu

GRAM POSITIU

GRAM NEGATIU

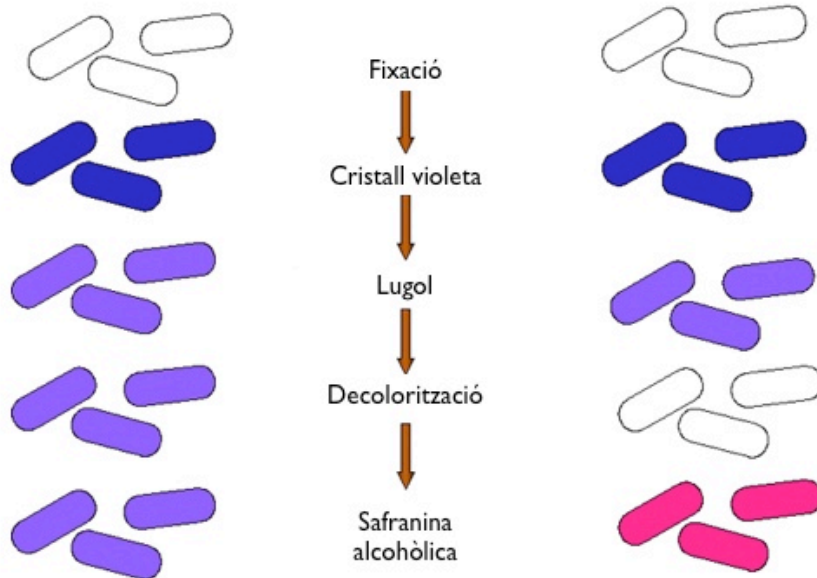


Fig.14 Tinció de Gram

4. PART EXPERIMENTAL: RECERCA D'UN NOU TRACTAMENT D'IMMUNOTERÀPIA PEL CÀNCER DE BUFETA

4.1 OBJECTIU

Estudiar si la barreja de tractaments quimioestàtics i estimuladors del sistema immunitari pot servir com a tractament pel càncer de bufeta. L'estimulació del sistema immunitari es valora indirectament, a partir de la producció de interleucines 6 i 8.

4.2 PROTOCOL

Tal i com s'ha explicat a l'objectiu, pretenem buscar un nou tractament alternatiu, a l'actual, pel càncer de bufeta. I comprovarem la seva efectivitat a partir de la estimulació de les cèl·lules per produir interleucines i per la seva capacitat de matar a les cèl·lules tumorals. Per aquesta raó, per l'estudi de l'efecte dels quimioestàtics es va fer servir la Mitomicina, i per l'estudi de l'efecte dels estimuladors del sistema immunitari es va fer servir el *Mycobacterium 2*. Per estudiar si la mescla d'estimuladors del sistema immunitari amb tractaments quimioestàtics poden servir com a tractament eficaç, cultivarem: cèl·lules tumorals de la línia cel·lular T24³⁶ soles, cèl·lules de la T24 amb el *Mycobacterium 2*, cèl·lules de la T24 amb el *Mycobacterium 2* i Mitomicina, cèl·lules de la T24 amb Mitomicina i per últim, cèl·lules de la T24 amb el bacteri *E.coli* que servirà de control³⁷ negatiu (TAULA 3). Farem tres rèpliques de cada tractament.

Cal aclarir que en aquest protocol s'utilitza *E.coli* com a control negatiu ja que, al ser un dels bacteris més estudiats, se sap que no té efectes antitumorals.

TAULA 3: Tractaments que es van dur a terme

- 1) Cèl· T24 sense infectar
- 2) Cèl· T24 + MMC
- 3) Cèl· T24 + *Mycobacterium 2*
- 4) Cèl· T24 + *Mycobacterium 2* + MMC
- 5) Cèl· T24 + *E.coli*
- 6) Cèl· T24 + *E.coli* + MMC

Per poder aconseguir el nostre objectiu, és molt important que treballem en un ambient estèril perquè sinó les mostres preparades es podrien contaminar i per tant, els resultats

obtinguts no serien fiables. Cal deixar clar que un ambient estèril consisteix en un ambient asèptic, és a dir, que està exempt de microorganismes patògens i de bacteris que puguin provocar una infecció. Nosaltres per aconseguir-ho treballarem a dins d'una cabina de seguretat i utilitzarem instruments d'un sol ús o bé esterilitzats a l'autoclau, que farem servir també una sola vegada. A més, ens posarem guants esterilitzats amb etanol i si els instruments toquen a la cabina, els llençarem i utilitzarem de nous.

A continuació, faré una síntesi sobre les característiques bàsiques d'E.coli i seguidament, detallaré tots els procediments que vaig dur a terme. Començaré explicant com es va dur a terme el cultiu de cèl·lules cancerígenes, com algunes van ser infectades, com als tractaments corresponents se'ls va afegir antibiòtics, per finalment explicar l'obtenció de resultats mitjançant la quantificació de les cèl·lules tumorals que van sobreviure en els diferents tractaments, així com la quantificació de la producció de interleucines 6 i 8.

4.2.1 ESCHERICHIA COLI

L'*Escherichia coli*, abreviat *E.coli*, és un dels bacteris més estudiats per l'ésser humà. Aquest bacteri és present en els intestins de la majoria dels mamífers; on forma part de la flora intestinal³⁸ i on és imprescindible pel correcte funcionament del procés digestiu. També produeix les vitamines B i K. L'*E.coli* té forma de bacil, mesura uns 0,5x2 mm i és gram negatiu. A més, és un organisme anaerobi facultatiu, és a dir, pot créixer tan en presència d'oxigen com en absència.



Fig.15 *E.coli*

La majoria d'*Escherichia coli* són inofensius, tot i així, algunes classes poden causar infeccions intestinals greus o diarrees. Aquestes infeccions s'adquireixen a causa del consum d'un aliment que conté el bacteri. Per aquesta raó, no es pot consumir carn crua o poc cuinada.

4.2.2 POSAR LA LÍNIA CEL·LULAR T24 EN POUS D'UNA PLACA DE CULTIU

4.2.2.1 INTRODUCCIÓ

Es van fer servir cèl·lules de la línia cel·lular T24 donat que són les cèl·lules relacionades amb el càncer de bufeta humana. Aquestes cèl·lules estaven conservades en un flascó de capacitat 75 mL però on hi cabia un volum de 15mL de medi anomenat DMEM a dins d'una incubadora a 37°C i a 5% de CO₂ ja que aquestes són les condicions òptimes perquè es puguin reproduir. El medi on es conserven les T24 té els components idonis per tal que les cèl·lules puguin anar creixent i reproduint-se en el flascó. Els components són: antibiòtics per tal d'evitar les contaminacions (Penicil·lina 1% i Estreptomicina 1%); Sèrum fetal boví o també anomenat FBS (suplementa el medi i que és inactivador de Tripsina³⁹. Cal que abans que sigui utilitzat, els anticossos estiguin inactivats) i un indicador de pH. Les cèl·lules tumorals es dipositen al fons del recipient formant un epiteli confluent i finalment acaben ocupant tot el flascó ja que al contrari de les que no ho són, les tumorals es reproduïxen de forma descontrolada encara que no tinguin suficient espai entre elles. Tan sols a l'hora de reproduir-se es desenganxen de les altres. Per això, a causa d'aquesta reproducció massiva és necessari agafar-ne unes quantes i posar-les en un altre flascó amb un medi nou per tal que tinguin més espai. Aquests procediments s'anomenen "passes". I l'indicador de pH simplement serveix per saber quan s'han de fer. Quan es fan els "passes" és necessari apuntar: la línia cel·lular, en aquest cas T24; i també cal apuntar número de "passe" que és al flascó, és a dir, quants passes s'han fet anteriorment ja que les cèl·lules tumorals utilitzades en els primers "passes" no seran iguals a les utilitzades darrerament, a causa de les possibles mutacions que s'hagin pogut produir.

4.1.2.2 MATERIAL I EQUIPAMENT

Multicanal, micropipetes, microscopi invertit, pipeta Pasteur, flascó, recipient amb lleixiu, guants, pipetejador, cambra de Neubauer, cobreobjectes, incubador, Eppendorfs, una placa de cultiu de 96 pous, un flascó i una càpsula de Petri.

4.1.2.3 REACTIUS I ALTRES MATERIALS

PBS⁴⁰ i blau Tripà⁴¹.

4.1.2.4 PROCEDIMENT

Primer de tot cal treure el líquid del flascó on hi ha les cèl·lules T24 i dipositar-ho en un potet amb una mica de lleixiu. A continuació s'ha de "rentar" el flascó amb 10 o 12 mL de PBS (Phosphate buffered saline) mesurats amb una pipeta d'un sol ús i un pipetejador. Per rentar és important que totes les parets del flascó estiguin en contacte amb el PBS. Un cop rentat s'ha de retirar el PBS i tirar-ho al potet amb lleixiu. Seguidament s'afegeixen 3 mL de Tripsina al flascó amb una pipeta Pasteur. La Tripsina es compra 10x, és a dir, concentrada 10 vegades i es dilueix 19 vegades abans d'utilitzar-la. S'agita el flascó per tal que aquesta arribi a totes les cèl·lules i finalment es llença aquesta al potet amb lleixiu. Seguidament s'ha de deixar cinc minuts a l'incubador perquè la Tripsina faci efecte. La Tripsina és un enzim que s'utilitza per separar les cèl·lules entre elles i del flascó. Aquest procés s'ha de realitzar amb compte ja que si es sobrepassa el temps que la Tripsina està amb contacte amb les cèl·lules, aquesta és capaç de destruir-les mitjançant una digestió total. Passats aquests 5 minuts cal posar una altra vegada el medi nou anomenat DMEM.

D'aquesta manera com que aquest medi porta un sèrum que inactiva la Tripsina ja no ens haurem de preocupar dels efectes nocius de les restes que han quedat a les cèl·lules. Amb aquest medi es torna a netejar bé la superfície del flascó i a continuació es traspasa tot a un tub de 5 mL ja que les cèl·lules tumorals s'hauran desenganxat del flascó i estaran en suspensió. Això s'anomena suspensió cel·lular. Després es mira el flascó pel microscopi per tal de veure si s'han recollit totes les cèl·lules.

Nosaltres hem decidit que volem treballar amb unes 30.000 cèl·lules per pou d'una placa de cultiu de 96 pous, i com que aquesta classe de cèl·lules es dupliquen cada 24 hores i fins l'endemà no treballarem amb elles, necessitem posar 15.000 cèl·lules a cada pou. Per saber quin volum de contingut del tub hem d'agafar per tal de tenir les 15.000 cèl·lules, cal que les comptem amb la cambra de Neubauer. Per aquesta raó, hem d'afegir-hi el blau Tripà. Aquest colorant només tenyirà les cèl·lules mortes i les vives quedaran refringents; d'aquesta manera podrem diferenciar-les a l'hora de comptar.

Amb una micropipeta estèril s'han d'agafar 10µL del blau Tripà d'una dissolució 1/2 i dipositar-los en un Eppendorf estèril. En aquest també s'hi ha de posar amb una altra micropipeta estèril 10µL de la suspensió cel·lular preparada anteriorment per tal de poder-

ho barrejar. De la mescla obtinguda s'han d'agafar 10µL amb la mateixa micropipeta i posar-los entre la cambra de Neubauer i un cobreobjectes. Per capil·laritat la mescla entra a dins. Seguidament amb un microscopi invertit es compten les cèl·lules de dins dels quadrants i es fa la mitjana del número de cèl·lules dels quatre quadrants.

33	42
44	59

Mitjana = 44,5 cèl·lules

Per obtenir les cèl·lules per mL que tenim a la suspensió cel·lular hem de multiplicar la mitjana obtinguda pel factor de dilució i per 10.000 ja que aquest és el volum de la cambra de Neubauer (CÀLCUL B). Però per poder-ho fer primer hem de calcular quin és el factor de dilució de la suspensió cel·lular (CÀLCUL A).

CÀLCUL A: Càlcul del factor de dilució

Volum final de la dissolució / Volum que s'utilitza = Factor de dilució

$$(10\mu\text{L} + 10\mu\text{L}) / 10\mu\text{L} = 2$$

CÀLCUL B: Càlcul de la concentració de cèl·lules per mL de suspensió cel·lular

Mitjana de cèl·lules · Factor de dilució · Volum de la cambra = cèl/mL de la suspensió cel·lular

$$44,5 \cdot 2 \cdot 10.000 = \underline{890.000 \text{ cèl/mL}}$$

Com que nosaltres volem tenir 15.000 cèl·lules a cada pou i aquests tenen una capacitat de 200µL, necessitem saber quants mL de la suspensió cel·lular de 890.000 cèl/mL necessitem per omplir-los (CÀLCUL C).

CÀLCUL C: mL de suspensió cel·lular

Suspensió cel·lular actual · (µL màxim en un pou / cèl·lules per pou) = µL suspensió cel·lular actual necessària

$$890.000 \text{ cèl} \cdot 200\mu\text{L de medi en el pou} / 15.000 \text{ cèl} = 11.900\mu\text{L} = \underline{11,9 \text{ mL de suspensió necessària}}$$

Llavors agafem 200µL de la suspensió cel·lular amb una pipeta estèril i els posem als pous de la placa de cultiu. Seguidament amb la pipeta multicanal estèril omplim de PBS els pous que ens han quedat buits, és a dir, sense suspensió cel·lular per tal d'evitar l'evaporació d'aquesta. Finalment tanquem la placa de cultiu i ho deixem tot un dia a l'incubador perquè les cèl·lules s'adhereixin a la superfície dels pous.

4.2.3 INFECCIÓ

4.2.3.1 INTRODUCCIÓ

Per fer la infecció utilitzarem els següents bacteris: el *Micobacteri 2* i la *Escherichia coli* (que ens farà de control negatiu). Després de fer moltes proves al laboratori van determinar que la concentració òptima de cèl·lules i bacteris per obtenir resultats és 1:10. Per aquesta raó la nostra infecció serà MOI 1:10, és a dir, cada cèl·lula de la línia cel·lular T24 tindrà 10 bacteris. Donat que 24 hores després de posar les 15.000 cèl·lules a dins de la incubadora obtindrem 30.000 cèl·lules, necessitarem 300.000 cfu⁴²/pou.

4.2.3.2 MATERIAL I EQUIPAMENT

Nansa de Kolle, tub amb boletes de vidre, placa d'agar, vòrtex, pipeta, pipeta Pasteur, micropipeta, Eppendorfs, bany d'ultrasons, gradeta i nanses de Disgralsky.

4.2.3.3 REACTIUS I ALTRES MATERIALS

PBS i McFarland₁.

4.2.3.4 PROCEDIMENT

Per començar, amb la nansa de Kolle agafem les colònies d'una sembra (*E.coli* o *Mycobacterium 2*) i les posem en un tub estèril amb boletes de vidre. Seguidament amb el vòrtex ho disgreguem ja que els micobacteris fan molts agregats. A continuació afegim 4.000µL de PBS (la quantitat de PBS pot variar) a cada tub amb les boletes de vidre i els bacteris. Tornem a disgregar els tubs. I finalment ho deixem reposar 20 minuts perquè si encara hi ha grumolls es dipositin al fons dels tubs. Els següents passos ens serviran per

esbrinar la concentració dels bacteris per mL del tub amb les boletes de vidre (cal tenir en compte que s'ha de dur a terme el procediment per duplicat, és a dir, amb les dues espècies de bacteris.

Primer de tot, amb una pipeta estèril agafem una mica de PBS i el posem en tub nou. Seguidament, amb una pipeta Pasteur agafem una mica del contingut dels tubs amb les boletes de vidre. Amb el vòrtex disgreguem una mica més, per tal que es barregi tot bé i



Fig. 16 Vòrtex

comparem la seva terbolesa amb la del McFarland₁. Per comparar-la utilitzem un paper amb línies horitzontals negres de diferent gruix. Hi posem a sobre el McFarland₁ i els tubs amb *Mycobacterium 2* i *E.coli* i mirem si les línies es veuen igual. Si el contingut dels tubs amb les boletes de vidre és més tèrbol que el del McFarland₁ es pot afegir una mica més de PBS amb una micropipeta estèril. El McFarland₁ és una dissolució salina que sabem que la seva terbolesa equival a $1 \cdot 10^7$ cfu, per tant si els dos tubs tenen la mateixa terbolesa sabem que el n^o de colònies que tenim és $1 \cdot 10^7$. Però tot i sabent la concentració dels bacteris

gràcies a aquest procediment, cal dur a terme un control per verificar-la ja que l'ull no és del tot precís. Aquest control serà un banc de dilucions. Per dur a terme el banc de dilucions necessitem 11 Eppendorfs estèrils. Els col·loquem en una gradeta i en els taps hi apuntem: E-1, E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, 2-1, M-2, M-3, M-4 i M-5. (La E significa *E.coli* i la M *Mycobacterium 2*). En l'Eppendorf E-1 hi afegim 100µL del contingut del tub de vidre que tenia la mateixa terbolesa que el McFarland₁. Aquesta serà una dilució -1 ja que haurem diluït el contingut del tub inicial unes 10 vegades. Ara agafem 100µL de l'E-1 i els afegim a l'Eppendorf E-2. Aquesta dilució serà -2 i el contingut estarà diluït 100 vegades respecte a la inicial. A continuació tornem a agafar una altra micropipeta estèril i agafem 100µL de l'E-2 i els posem en l'E-3. En el Eppendorf E-3 haurem aconseguit tenir una dilució -3, la qual estarà diluïda 1.000 vegades. Finalment agafem 100µL de l'E-3 amb una micropipeta estèril i els posem en l'E-4. En aquest tindrem una dilució -4, on el contingut estarà diluït.10.000 vegades. Anem repetint el procediment fins obtenir una dilució -6. Amb el *Mycobacterium 2* cal dur a terme el mateix procediment però només fins obtenir una dilució -5. Per últim agafem 100µL dels Eppendorfs E-6 i M-5 i els sembrem dues vegades en dues plaques amb el mateix tipus de medi amb dues Nanses de Digrafsky estèrils. Com que cada microorganisme creix millor en un medi de cultiu determinat els sembrem en el medi més òptim: El *Mycobacterium 2* el sembrem en TSA i l'*E.coli* el

sembrem en LB. Perquè creixin les colònies l'*E.coli* ha d'estar a 37°C i el *Mycobacterium 2* a 30°C. Al cap de 24 hores l'*E.coli* ha haurà format colònies i podrem procedir al seu recompte.



Fig. 17 Plaques amb *E.coli* i *Mycobacterium 2*

Nosaltres hem obtingut 12 cfu i 14 cfu; per tant la mitjana és 13 cfu. Per saber les cfu/mL del cultiu necessitem utilitzar la fórmula especificada al CÀLCUL D.

CÀLCUL D. Fórmula pel càlcul d'unitats formadores de colònies per a *E. coli*.

n° colònies / (factor de dilució · volum de sembra) = cfu/mL

$$13 / (10^{-6} \cdot 0,1\text{mL}) = \underline{1,3 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}}$$

El *Mycobacterium 2* tarda una mica més a créixer per això ens haurem d'esperar una mica més de temps. Contant les colònies que hi ha a les dues plaques hem obtingut: 138 cfu i 133 cfu; per tant la mitjana és 135,5 cfu. Per tant utilitzant la fórmula especificada al CÀLCUL D obtindrem:

$$135,5 \text{ cfu} / (10^{-5} \cdot 0,1\text{mL}) = \underline{1,355 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}}$$

Com podem veure en els resultats, aquests valors no s'aproximen al 10^7 cfu/mL, però hem utilitzat igualment aquests tubs ja que havíem continuat amb el procediment abans de procedir al recompte de colònies, ja que si haguéssim esperat que els bacteris creixessin hauríem perdut molt de temps i després d'haver obtingut els resultats no hauríem pogut tornar a repetir tot el procediment per falta de temps.

Per tant, com que nosaltres vàrem continuar el procediment abans d'obtenir els resultats dels bancs de dilucions, vàrem suposar que en 1mL de la dissolució hi havia 10^7 cfu. Com

que en cada pou de 100µL necessitàvem tenir-hi 300.000 cfu, havíem de saber quina quantitat de medi sense antibiòtic necessitàvem, per tant necessitem utilitzar la fórmula especificada al CÀLCUL E.

CÀLCUL E. Fórmula pel càlcul de mL de medi necessari sense antibiòtic

(cfu de la dissolució · 100µL) / 300.000 cfu = medi necessari sense antibiòtic

$$(107 \text{ cfu} \cdot 100\mu\text{L}) / 300.000 \text{ cfu} = \underline{3.333.33\mu\text{L}}$$

Hem agafat 1mL de cada dissolució amb una pipeta Pasteur, ja que sabem que en aquest volum tenim més o menys 10^7 unitats formadores de colònies, i els hem posat en dos tubs cònics. Centrifuguem a 3.000 rpm durant 10 minuts. Gràcies a centrifugar els bacteris, s'hauran quedat dipositats al fons del tub i així podrem retirar el PBS sense despendre'ns de l'*E.coli* i del *Mycobacterium 2*. Seguidament afegim als tubs cònics on hi ha els bacteris 3.333µL d'un medi nou amb sèrum però sense antibiòtic i resuspenem el "pellet" amb els dits (El "pellet" són els bacteris que queden al fons del tub després de centrifugar). Llavors duem a terme tres banys d'ultrasons de 30 segons per tal d'acabar de disgregar els bacteris. El bany es fa amb: aigua destil·lada i una gradeta.

Seguidament traiem 100µL del medi de cada pou de la placa de cultiu de 96 pous on teníem les cèl·lules T24 amb una micropipeta estèril (no es pot tocar el fons ja que allà és on hi ha dipositades les cèl·lules). Ara ja és el moment d'infectar; per això cal afegir on és necessari a la placa de 96 pous 100µL del medi amb el *Mycobacterium 2* que hem preparat abans (omplir els pous segons la taula inicial). També s'ha de fer amb l'*E.coli*. Un cop infectades, cal deixar 3 hores la placa a l'incubador.

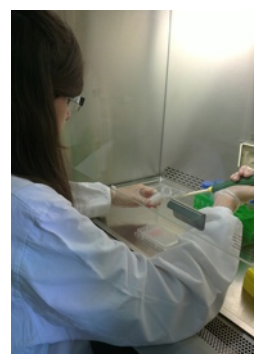


Fig. 18 Traient el medi de cada pou.

4.2.4 ADDICIÓ DE LA MITOMICINA

4.2.4.1 MATERIAL I EQUIPAMENT

Pipeta, micropipeta, incubador i tubs.

4.2.4.2 REACTIUS I ALTRES MATERIALS

Mitomicina (MMC), DMEM i PBS.

4.2.4.3 PROCEDIMENT

Passades les 3 hores, cal treure els 200µL de medi i rentar els pous amb 200µL de PBS tres vegades. A continuació s'ha de posar 200µL de DMEM (amb el 10% de sèrum i antibiòtic). Ara també s'ha de posar la Mitomicina als pous que correspongui, però cal afegir-la al medi abans de posar-lo als pous ja que és més fàcil treballat amb volums grans. La Mitomicina ha d'estar a 10µg/mL i nosaltres la tenim guardada a 500µg/mL. Com que 9 pous necessiten Mitomicina però som dues persones que duem a terme el mateix procediment necessitem calcular el volum final de MMC i DMEM que necessitem per omplir 18 pous. Per tant utilitzarem la fórmula expressada en el CÀLCUL F.

CÀLCUL F. Volum final contingut en els pous

nº de pous · capacitat de cada pou = volum final contingut en els pous

$$18 \cdot 200\mu\text{L} = \underline{3.600\mu\text{L}} \text{ volum final en els 18 pous}$$

I ara per saber quin volum de MMC necessitem de la dissolució hem de calcular-ho a partir de la fórmula expressada en el CÀLCUL G.

CÀLCUL G. Volum de MMC necessària

Concentració inicial · volum inicial = Concentració final · volum final

$$500\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{volum inicial} = \underline{100\mu\text{g}/\text{mL} \cdot 3600\mu\text{L}}$$

$$\text{volum inicial} = 72 \mu\text{L de MMC}$$

Per acabar d'omplir els pous necessitem introduir-hi el medi. Per tant el calcularem amb la fórmula expressada en el CÀLCUL H.

CÀLCUL H. Volum de medi necessari

Volum total que cap en els pous - volum MMC = volum de medi necessari

$$3.600\mu\text{L} - 72\mu\text{L} = \underline{3.528 \mu\text{L de medi}}$$

Ara amb una pipeta agafem el volum de medi necessari i el posem en un tub. Seguidament amb una micropipeta agafem la quantitat de MMC calculada i l'hi barregem. Per acabar omplim els pous corresponents (Mirar TAULA 3). En canvi, en els pous que no han de tenir MMC hi posem directament 200 μ L de medi. I per acabar cal posar la placa de 96 pous a la incubador durant 48 hores.

4.2.5 MESURAR LES CÈL·LULES QUE HAN SOBREVISCUT

4.2.5.1 INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules que estan vives són capaces de metabolitzar el MTT (una sal de tetrazolium) gràcies a un enzim que posseeixen i crear cristalls. Gràcies a aquesta sal podrem veure les cèl·lules de quins pous estan vives i quines no, depenent de si formen cristalls al aplicar-la. Però necessitarem un lector de plaques que llegeixi la longitud d'ona del color lila dels cristalls que crearan per tal de saber a quin pou hi ha més cèl·lules vives i quin menys. Però per tal de que les pugui llegir necessitarem dissoldre els cristalls amb Isopropanol Cíclic.

4.2.5.2 MATERIAL I EQUIPAMENT

Lector de plaques, Eppendorfs, pipetes, micropipetes, tub i microscopi.

4.2.5.3 REACTIUS I ALTRES MATERIALS

MTT, Isopropanol Cíclic

4.2.5.4 PROCEDIMENT

Al cap de 48h, per començar traiem els medis de la placa de cultiu de 96 pous i el posem en Eppendorfs (un per cada pou) que congelarem per tal de poder-los utilitzar més endavant, quan realitzem l'Elisa. Seguidament en posem un de nou que contingui MTT. Per preparar el nou medi amb MTT cal calcular els μ L de MTT i de medi que necessitem (CÀLCUL I).

CÀLCUL I: μL necessaris per omplir la placa

Pous totals \cdot capacitat de cada pou (MTT+medi) = μL totals

$$36 \text{ pous} \cdot 100\mu\text{L} = \underline{3.600\mu\text{L totals}}$$

Però per no quedar curts en prepararem 4.000 μL . El següent pas és calcular els μL de MTT i de medi que necessitem. Per calcular la quantitat de la sal de tetrazolium que necessitem hem de tenir en compte que aquesta ha d'estar al 10% amb el medi (CÀLCUL J).

CÀLCUL J: Volum de MTT necessari

Volum total \cdot (μL de MTT / μL de medi) = volum de MTT necessari

$$4.000\mu\text{L} \cdot (10\mu\text{L} / 100 \mu\text{L}) = \underline{400\mu\text{L de MTT}}$$

En canvi, per calcular volum de medi necessitem restar el volum de MTT necessari a la capacitat de volum de la placa (CÀLCUL K).

CÀLCUL K: Volum de medi necessari

Volum total - volum de MTT= volum de medi

$$4.000\mu\text{L} - 400\mu\text{L de MTT} = \underline{3.600 \mu\text{L de medi}}$$

El següent pas és posar en un tub els 3.600 μL de medi amb una pipeta i mesclar-los amb els 400 μL de MTT. Seguidament cal posar 100 μL d'aquest preparat a cada pou necessari i deixar-ho actuar durant 3 hores. Passat aquest temps hem observat la placa de cultiu al microscopi i hem pogut veure com les cèl·lules estaven plenes de cristalls liles a causa que el MTT havia fet efecte. Concretament sense microscopi això és el què hem pogut observar:

- Les cèl·lules tumorals T24 es podien apreciar molt liles.
- Les T24 amb *Mycobacterium 2* estaven liles però d'un to menys intens.
- Les T24 amb *E.coli* també estaven molt liles.

En canvi a l'afegir Mitomicina a les condicions anteriors (les cèl·lules tumorals T24, les T24 amb *Mycobacterium 2* i les T24 amb *E.coli*), no es podia a veure a simple vista el color lila.

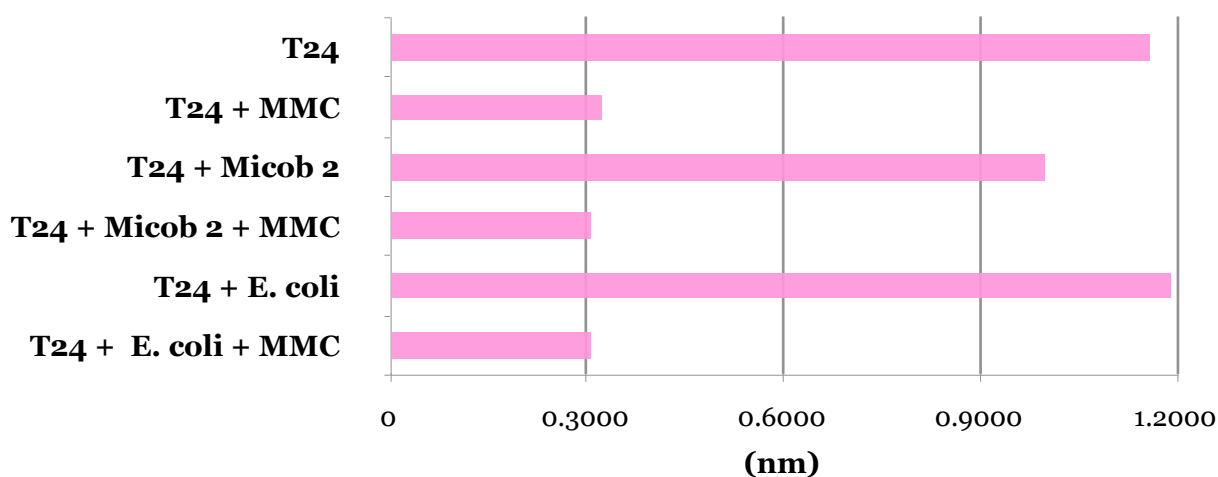
Per tant, sembla ser que la Mitomicina frena el creixement d'aquesta classe de cèl·lules i que el *Mycobacterium 2* també els fa alguna cosa. Tot i així, això tan sols són especulacions i fins que no posem la placa de cultiu en un lector de plaques i aquest no les llegeixi a una longitud d'ona de 550 nm, no podrem afirmar res amb certesa. Seguidament hi hem mesclat bé 100µL d'isopropanolacíclic, ja que aquest és capaç de dissoldre els cristalls liles i així el lector de plaques podrà llegir la longitud d'ona dels pous, i ho hem deixat que faci efecte durant 3 hores. Passat aquest temps hem pogut veure que, en els pous amb Mitomicina, les cèl·lules eren allargades, no s'apilaven i estaven més separades que les dels pous que només hi havia T24 i *Mycobacterium 2* ja que allà no tenien gairebé espai entre unes i altres i s'apilaven; i en les cèl·lules de la línia cel·lular T24 soles, estaven encara més apilades les unes sobre les altres sense cap espai.

Finalment, hem introduït la placa en l'espectrofotòmetre per obtenir un resultat quantitatiu de la creació de cristalls ja que el resultat qualitatiu anterior és molt subjectiu. (TAULA 4 i GRÀFIC 1).

TAULA 4: Resultat de la lectura de la D.O de la placa

	D.O. (550 nm)			
T24	1.1236	1.2076	1.1439	1.1584
T24 + MMC	0.3386	0.3116	0.3198	0.3233
T24 + Micob 2	0.9666	0.9993	1.029	0.9983
T24 + Micob 2 + MMC	0.3001	0.3029	0.3171	0.3067
T24 + <i>E. coli</i>	1.1035	1.2563	1.2147	1.1915
T24 + <i>E. coli</i> + MMC	0.3143	0.3029	0.3036	0.3069

GRÀFIC 1: Proliferació segons la D.O en nm



4.2.6 ELISA

4.2.6.1 INTRODUCCIÓ

Per acabar amb la recerca duren a terme un protocol anomenat Elisa (Enzim-immunoassaig) per tal de determinar les proteïnes que les cèl·lules han produït i que han alliberat en el sobrenedant, és a dir, en el medi on estaven. Cal aclarir que l'Elisa no és necessària dur-la a terme en condicions estèrils.

Concretament nosaltres ens centrarem en la producció de les proteïnes interleucina-6 (IL-6) i de interleucina-8 (IL-8). Aquestes proteïnes es troben al medi extracel·lular ja que actuen com a missatgers del sistema immunitari i per tant, avisen a les cèl·lules del sistema immunitari que han d'actuar. La IL-6 és una glucoproteïna antiinflamatòria i proinflamatòria, d'altra banda, la IL-8 és una proteïna proinflamatòria, que provoca inflamació per tal d'atraure els limfòcits. Per dur a terme aquest protocol utilitzarem també plaques de 96 pous.

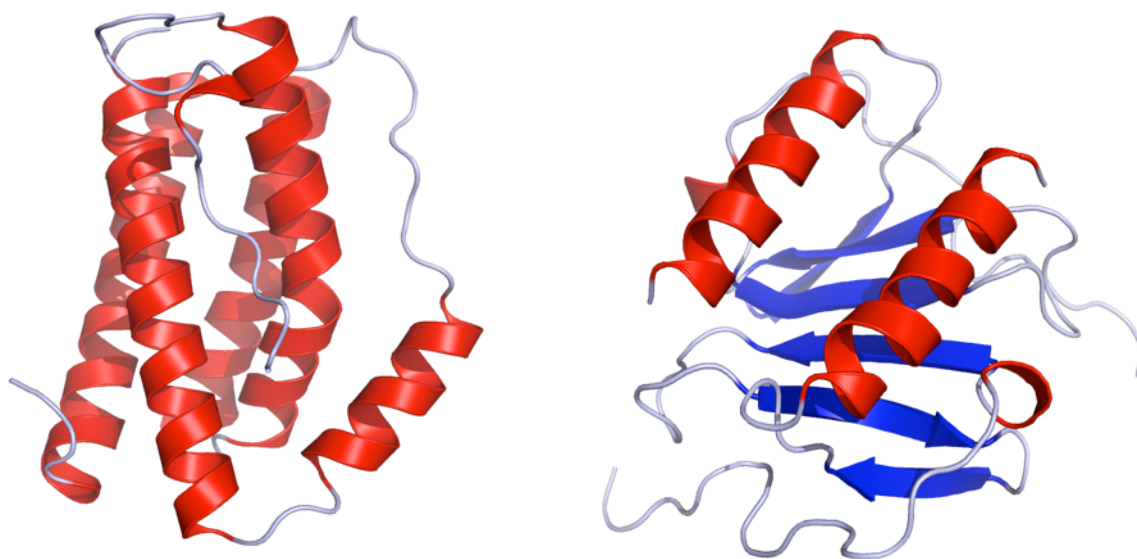


Fig.19 i 20 Estructura tridimensional de les interleucines estudiades.

4.2.6.2 MATERIAL

Eppendorfs, una centrifugadora, una micropipeta, retolador, dues plaques de 96 pous i un espectrofotòmetre.

4.2.6.3 REACTIUS I ALTRES MATERIALS

PBS i Tween20 al 0,05% i PBS+ 10%FBS.

4.2.6.4 PROCEDIMENT

Per dur a terme l'Elisa primer de tot cal posar en els pous, els anticossos diluïts en un tampó PBS i deixar-los durant un dia a 4°C, segons les recomanacions del fabricant del kit. Durant aquest temps els anticossos s'enganxaran al plàstic dels pous. Passat aquest temps, cal rentar tres vegades la placa amb 150µL de PBS i Tween20 al 0,05%. Seguidament, hem de bloquejar els trossos de pou on no hi ha anticossos ja que si afegim directament el sobrenedant, les proteïnes que conté aquest s'enganxaran al plàstic del pou i no als anticossos, com nosaltres volem.

Per bloquejar-los, hem utilitzat un tampó de PBS i amb un 10% de FBS (Sèrum Boví Fetal). Ho hem deixat actuar durant una hora a temperatura ambient. Seguidament, hem tornat a rentar la placa amb el mateix tampó unes 3 vegades. i després hem descongelat els 18 Eppendorfs que contenen els 200µL de medi que havíem tret al cultiu. Un cop descongelats, cal centrifugar-los a 1.000 rpm durant 10 minuts. D'aquesta manera aconseguirem fer precipitar el "pellet", és a dir, les restes de cèl·lules que abans sense voler vam agafar amb la micropipeta i vam dipositar dins dels Eppendorfs. El següent pas és amb una micropipeta, vigilant, per tal de no agafar el "pellet", passar el sobrenedant, és a dir, el medi que havíem tret del cultiu, dels Eppendorfs a uns altres de nous. D'aquesta manera aconseguirem tenir el sobrenedant sense "pellet". Anomenem de nou els Eppendorfs per saber a quin tractament corresponen. A continuació hem d'omplir els pous de dues plaques de 96 pous amb el sobrenedant corresponent. Cal omplir-les tal i com indiquen les taules 5 i 6 per tal de decidir si es dilueix, abans de posar-lo. El zero vol dir que el sobrenedant no s'ha de diluir i els nombres diferent de zero són el factor de dilució que s'ha d'aplicar. Les dues primeres columnes pintades de groc a les taules les utilitzarem com a referència. Aquestes són les concentracions conegudes de IL-6 i de IL-8 que venen amb el Kit, i ens serviran per determinar la concentració de citocines dels pous.

A més, a les taules es pot veure que farem duplicats de les mostres de sobrenedant de cada Eppendorf, per tant, les dues caselles del mateix color són mostres iguals i diluïdes per igual.

TAULA 5: Dilucions fetes a les diferents rèpliques dels tractaments per l'estudi de la IL-6

Concentració pg/mL												
600								T24 + Myco2	1/50	T24 + E.coli	1/50	A
300								T24 + Myco2	1/50	T24 + E.coli +MMC	0	B
150						T24 sense infectar	0	T24 + Myco2	1/50	T24 + E.coli +MMC	0	C
75						T24 sense infectar	0	T24 + Myco2 +MMC	0	T24 + E.coli +MMC	0	D
37.5						T24 sense infectar	0	T24 + Myco2 +MMC	0			E
18.75						T24 + MMC	0	T24 + Myco2 +MMC	0			F
9.375						T24 + MMC	0	T24 + E.coli	1/100			G
0						T24 + MMC	0	T24 + E.coli	1/100			H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

TAULA 6: Dilucions fetes a les diferents rèpliques dels tractaments per l'estudi de la IL-8

Concentració pg/mL												
400		T24 sense infectar	1/10	T24 + Myco2	1/50	T24 + E.coli +MMC	0					A
200		T24 sense infectar	1/10	T24 + Myco2	0	T24 + E.coli +MMC	0					B
100		T24 sense infectar	10	T24 + Myco2	0							C
50		T24 + MMC	0	T24 + Myco2 + MMC	0							D
25		T24 + MMC	0	T24 + E.coli	1/100							E
12.5		T24 + MMC	0	T24 + E.coli	1/100							F
6.25		T24 + Myco2	1/50	T24 + E.coli	1/100							G
0		T24 + Myco2	1/50	T24 + E.coli +MMC	0							H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

En total, a cada pou s'hi ha de posar 50µL de sobrenedant que tenim guardat a cada Eppendorf. Però de cada dissolució, prepararem 200µL. Per tant, en les mostres que no estiguin diluïdes posem directament 50µL del sobrenedant corresponent amb una micropipeta; i les que s'hagin de diluir, per tal de saber la quantitat de sobrenedant i de medi necessari, utilitzarem la fórmula expressada en el CÀLCUL L.

CÀLCUL L: *Calcular els µL de sobrenedant i de medi a partir dels factors de dilució*

Factor de dilució · µL totals = µL de sobrenedant

Les mostres 1/10

$$(1/10) \cdot 200 = 20\mu\text{L de sobrenedant}$$

$$200\mu\text{L totals} - 20\mu\text{L sobrenedant} = \underline{180\mu\text{L de PBS+ 10\%FBS}}$$

Les mostres 1/20

$$(1/20) \cdot 200 = 10\mu\text{L de sobrenedant}$$

200µL totals - 10µL sobrenedant= 190 de PBS+ 10%FBS

Les mostres 1/50

$(1/50) \cdot 200 = 4\mu\text{L}$ de sobrenedant

200µL - 4µL= 196µL de PBS+ 10%FBS

Les mostres 1/100

$(1/100) \cdot 200 = 2\mu\text{L}$ de sobrenedant

200µL-2µL= 198µL de PBS+ 10%FBS

Ara és el moment de diluir les mostres pertinents, en uns Eppendorfs a part i amb l'ajuda de micropipetes, i omplir les dues plaques segons indiquen la taula 5 i la taula6. Un cop omplerts tots els pous necessaris deixem tota la nit a 4°C el sobrenedant a les plaques. L'endemà traiem el sobrenedant i tornem a rentar les plaques, amb 150µL de PBS i Tween20 al 0,05% per cada pou, quatre vegades cada una. Durant la nit, les citocines s'enganxaran als anticossos de la placa, per aquesta raó, al rentar els pous aquestes no es despendran.

El dia següent, després de rentar-les s'han de posar 5mL PBS amb FBS al 10% en dos tubets i afegir-hi un anticòs marcat que porta enganxat un enzim anomenat Biotina unit a un altre enzim anomenat Peroxidassa (que aporta color) i Estreptavidina. Aquest color donat per la Peroxidassa el llegirem amb l'espectrofotòmetre, un medidor de la llum de tot el color de l'espectre. I llavors podrem comparar els valors de l'espectrofotòmetre de les dues primeres columnes del Kit de referència amb les altres per tal de poder saber la concentració de citocines en els pous. Aquest anticòs ha d'estar diluït al 1/250 amb el tampó de PBS amb el 10% de FBS per aquesta raó hem de fer els càlculs expressats en el CÀLCUL M:

CÀLCUL M: µL d'anticòs necessaris

$\mu\text{L de tampó} \cdot (1 \mu\text{L d'anticòs} / 250 \mu\text{L del tampó}) = \mu\text{L d'anticòs}$

$5.000 \mu\text{L (de PBS amb FBS al 10\%)} \cdot (1\mu\text{L d'anticòs}/250\mu\text{L de PBS amb FBS al 10\%)} = 20\mu\text{L d'anticòs}$

Però com que cal dividir la quantitat d'anticòs entre dos tubets; posarem 10 μ L d'anticòs a cada un. Després d'haver diluït l'anticòs, posem 50 μ L d'aquesta dilució a cada pou. Cal deixar actuar durant 6 hores l'anticòs i després rentar les plaques 6 vegades una altra vegada amb 150 μ L de PBS i Tween20 al 0,05%. Finalment cal afegir 50 μ L de substrat de Peroxidassa a cada pou. Ara ja podem mesurar les D.O o valors d'absorbància de les plaques de cultiu (TAULA 7 i TAULA 8).

Com podem veure en els valors de D.O obtinguts, hi ha valors que superen les concentracions pg/mL del Kit de referència, per tant no podem dir quina concentració de citocines IL-6 i IL-8 hi ha a cada pou, però si en quins pous les concentracions són més elevades i en quins menys. Tot i així igualment podem fer un gràfic a partir de la D.O dels pous multiplicada pel factor de dilució. El gràfic l'haurem de representar en valors logarítmics, ja que com que hi haurà molta diferència entre els valors de D.O obtinguts, alguns valors no s'apreciaran representats. Per fer-ho, primer de tot cal calcular la mitjana dels pous que contenen el mateix: cèl·lules tumorals de la línia cel·lular T24 soles, cèl·lules de la T24 amb el *Mycobacterium 2*, cèl·lules de la T24 amb el *Mycobacterium 2* i Mitomicina, cèl·lules de la T24 amb Mitomicina, o bé, cèl·lules de la T24 amb el bacteri *E.coli* per separat. Però per fer les mitjanes no utilitzarem els valors de D.O obtinguts en els pous on hi havia menys sobrenedant del que era necessari. (TAULES 9 i 10)

Seguidament si en els pous que tenen un contingut diluït multipliquem els factors de dilució per la mitjana de la D.O obtindrem l'absorbància d'aquests pous que tindriem si no haguessin estat diluïts (TAULES 11 i 12).

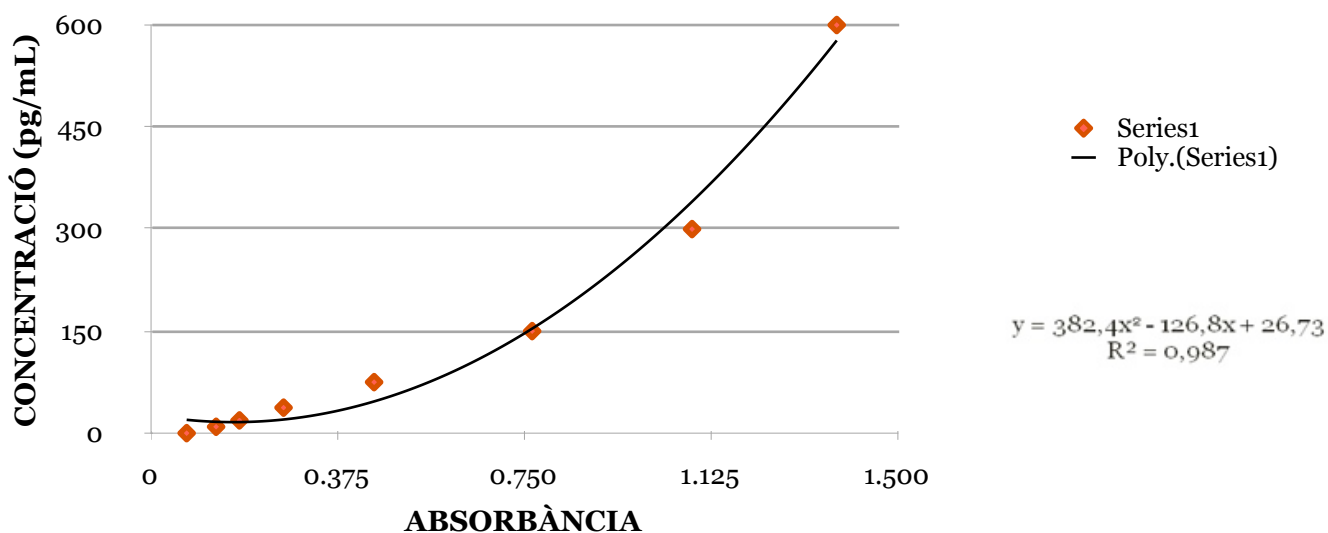
El valor d'absorbància no aporta una dada sobre la que es pugui treballar, cal conèixer la quantitat d'interleucines que representa un determinat valor d'absorbància. Per fer aquesta conversió es fan servir les dades d'absorbància de la corba patró que ens dona un valor d'absorbància per una quantitat coneguda d'interleucina que vam afegir. Per fer aquesta conversió, es van representar les dades d'absorbància i la quantitat d'interleucina en un gràfic i es va obtenir l'equació que relaciona totes dues variables (GRÀFIC 2 i 4). A les equacions obtingudes es va substituir el valor x (absorbància) pels obtinguts als nostres experiments i així es van obtenir les quantitats que es mostren als gràfics 3 i 5.

4.3 RESULTATS OBTINGUTS I CÀLCULS NECESSARIS

TAULA 7: D.O de la placa IL-6

Concentració pg/mL												
1.3916	1.3628							1.2275	1.2327	1.0766	1.0325	A
1.0991	1.0741							0.8164	0.8025	1.7808	1.7117	B
0.7827	0.7482				1.6728	1.6873		0.6785	0.6466	1.7825	1.6878	C
0.4593	0.4367				1.6542	1.6221		1.6872	1.5844	1.7552	1.6983	D
0.2702	0.2621				1.5647	1.6645		1.5874	1.5589			E
0.1759	0.1792				1.5624	1.0322		1.5806	1.1776			F
0.1299	0.1314				1.4996	1.0459		1.1564	1.1299			G
0.0594	0.0836				1.5512	1.5188		0.9032	0.9341			H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

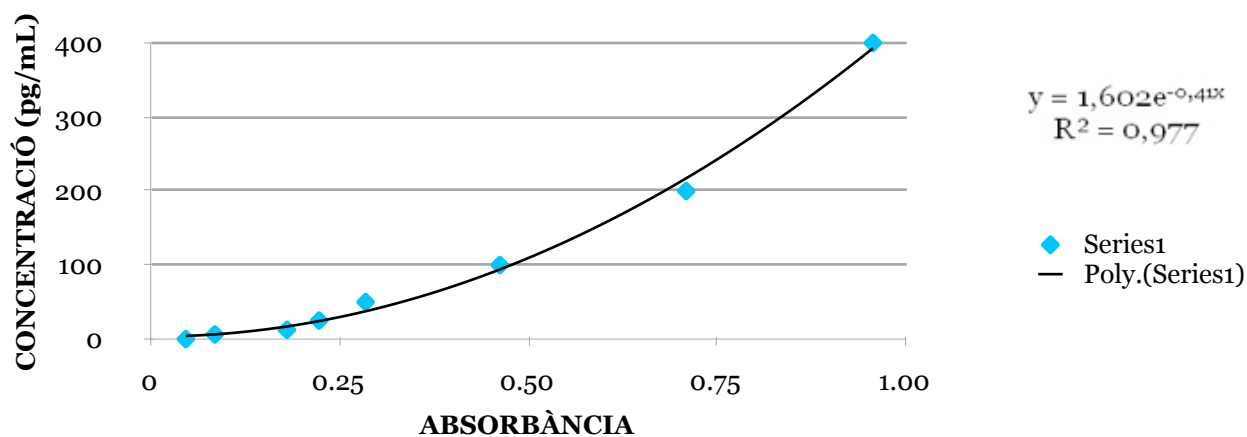
GRÀFIC 2: Patró del kit de referència IL-6



TAULA 8: D.O de la placa IL-8

Concentració pg/mL												
0.953	0.9606	1.4341	1.5238	1.4774	1.4171	1.6652	1.6651					A
0.6956	0.7231	1.4971	1.4047	1.5134	1.5582	1.487	1.4555					B
0.4354	0.4896	1.4183	1.4685	1.4368	1.4717							C
0.2798	0.2896	1.6492	1.5122	1.4368	1.617							D
0.1882	0.2579	1.541	1.4144	1.1153	1.0616							E
0.2348	0.1261	1.5036	1.5061	1.0669	1.0144							F
0.0937	0.0762	1.625	1.4855	1.1325	1.1005							G
0.044	0.0491	1.3582	1.3419	1.6941	1.6149							H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

GRÀFIC 3: Patró del Kit de referència de IL-8



TAULA 9: Mitjana de les D.O de la placa de IL-6

IL-6	T24	T24+ MMC	T24+ Myco2	T24+MM C+ Myco 2	T24+ E.coli	T24+ E.coli +MMC
Mitjana	1.644	1.533	0.901	1.599	1.039	1.736
Factor de dilució			20		50	
RESULTAT	1.644	1.533	18.014	1.599	51.939	1.736

TAULA 10: Mitjana de les D.O de la placa de IL-8

IL-8	T24	T24+MMC	T24+ Myco2	T24+ MMC+ Myco 2	T24+ E.coli	T24+ E.coli +MMC
Mitjana	1.45775	1.52108	1.45085	1.53128	1.08186	1.59696
Factor de dilució	10		50		100	
RESULTAT	14.577	1.521	72.543	1.531	108.186	1.597

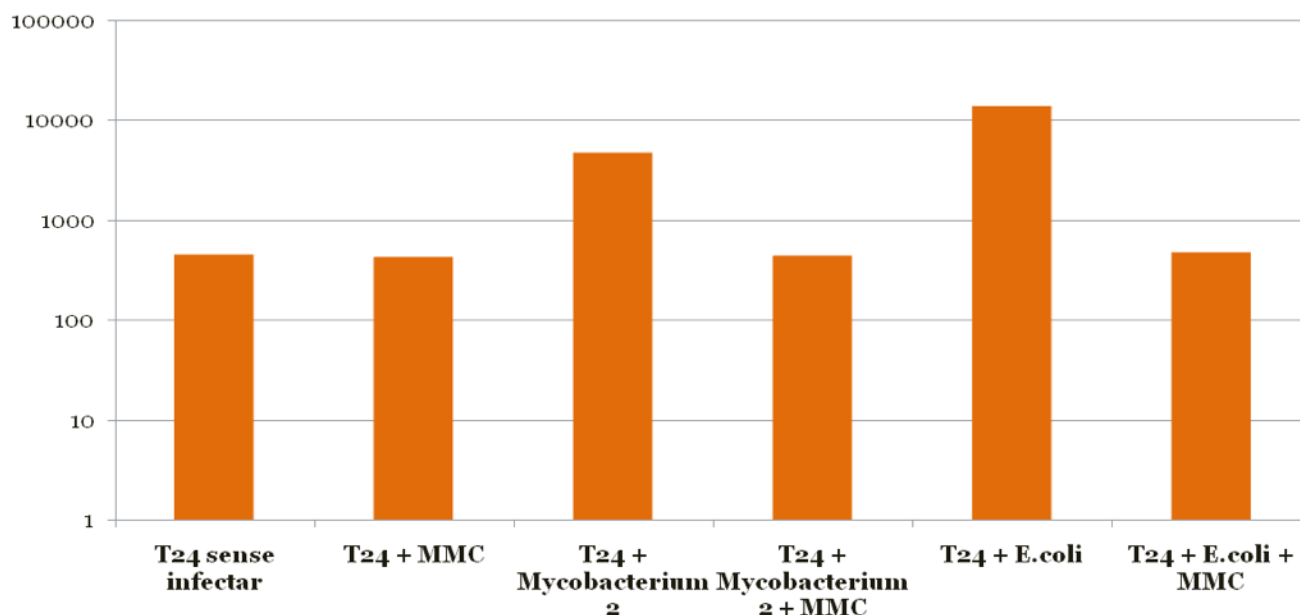
TAULA 11: Valors de D.O obtinguts en la placa IL-6 aplicant el factor de dilució corresponent

T24 sense diluir	T24+MM C sense diluir	T24+ Myco 2 dilució 1/20	T24+MM C+ Myco 2 sense diluir	T24+ E.coli dilució al 1/50	T24+ E.coli +MMC sense diluir
1.6728	1.5624	1.2275	1.6872	1.1564	1.7808
1.6542	1.4996	0.8164	1.5874	0.9032	1.7825
1.5647	1.5512	0.6785	1.5806	1.0766	1.7552
1.6873		1.2327	1.5844	1.1299	1.7117
1.6221		0.8025	1.5589	0.9341	1.6878
1.6645	1.5188	0.6466		1.0325	1.6983
1.644	1.533	0.901	1.599	1.039	1.736

TAULA 12: Valors de D.O obtinguts en la placa IL-8 aplicant el factor de dilució corresponent

T24 dilució 1/10	T24+MMC sense diluir	T24+ Myco 2 dilució 1/50	T24+MM C+ Myco 2 sense diluir	T24+ E.coli dilució al 1/100	T24+ E.coli +MMC sense diluir
1.4341	1.6492	1.625	1.5134	1.1153	1.6941
1.4971	1.541	1.3582	1.4368	1.0669	1.6149
1.4183	1.5036	1.4855	1.5906	1.1325	1.6652
1.5238	1.5122	1.3419	1.5582	1.0616	1.487
1.4047	1.4144	1.4774	1.4717	1.0144	1.6651
1.4685	1.5061	1.4171	1.617	1.1005	1.4555
1.458	1.521	1.451	1.531	1.081	1.596

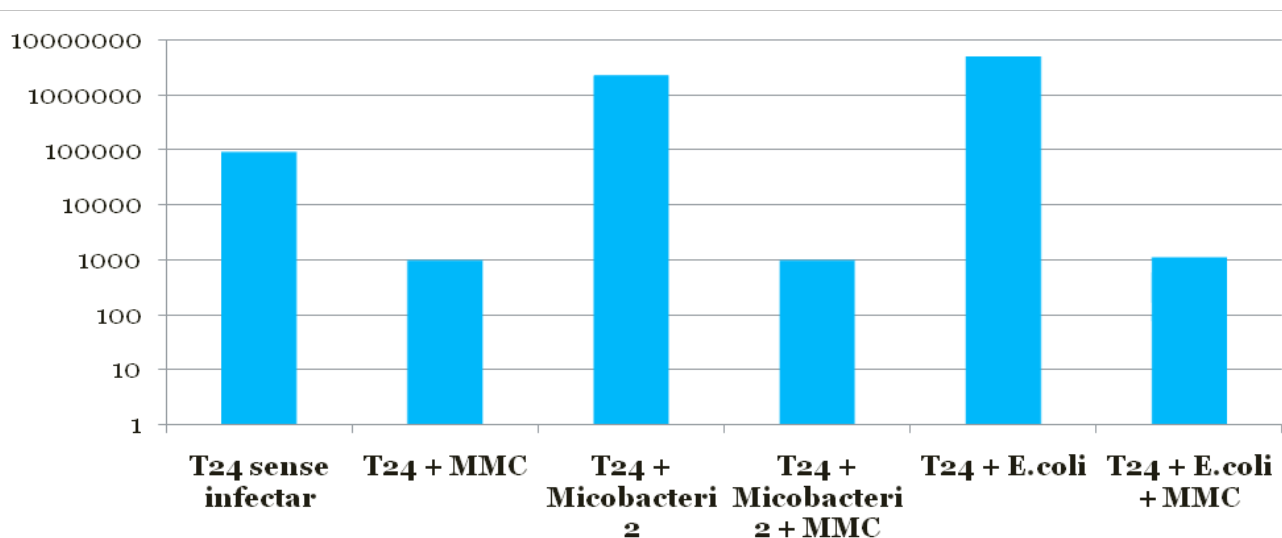
GRÀFIC 4: D.O de les IL-6 obtingudes dels sobrenedants



Els valors obtinguts de IL-6 s'han calculat a partir de l'absorbància, i s'ha tingut en compte la seva dilució així com l'equació resultant de la corba patró.

L'eix d'ordenades es representa a escala logarítmica per tal de poder observar millor les diferències entre tractaments.

GRÀFIC 5: D.O de les IL-8 obtingudes dels sobrenedants



Els valors obtinguts de IL-8 s'han calculat a partir de l'absorbància, i s'ha tingut en compte la seva dilució així com l'equació resultant de la corba patró.

4.4 ANÀLISI DE VARIÀNCIA

Per comparar els diferents tractaments, les dades obtingudes s'han analitzat mitjançant un anàlisi de variància fet amb el programa Excel. D'aquesta forma s'ha pogut valorar si hi havia diferències significatives entre els tractaments.

4.4.1. INTRODUCCIÓ

L'anàlisi de variància és un mètode que serveix per comparar dues o més mitges. Inicialment a cada comparació hi ha una hipòtesi nul·la la qual és que entre les mitjanes no hi ha diferències significatives ja que les dues dades provenen de la mateixa població. La hipòtesi nul·la es rebutja quan la probabilitat és inferior a 0,005. Quan la hipòtesi nul·la és rebutjada significa que la diferència entre les dades és estadísticament significativa.

4.4.2 PROCEDIMENT

Per tal de poder comparar la proliferació de cèl·lules T24 en tots els tractaments a l'anàlisi de variància, he creat una taula de dades amb tots els valors d'absorbància dels tractaments. A continuació, he anat comparant els tractaments de dos en dos. Per poder-ho fer, he clicat Eines i he marcat l'opció Anàlisi de dades. Seguidament he marcat l'opció Anàlisi de variància un factor i he especificat que el Rang de sortida fos al mateix full de càlcul. He marcat acceptar i l'Excel automàticament m'ha creat l'anàlisi (ANNEX 2). A la columna de probabilitat (p) se'ns mostra el valor segons el qual se'ns rebutja o se'ns afirma la hipòtesi nul·la. A continuació, he repetit el procediment amb la resta de tractaments. Un cop acabat, he creat una taula on comparava tots els valors de p, i he marcat amb vermell aquells que afirmaven la hipòtesi nul·la (TAULA 13). I depenent de si rebutjava o afirmava la hipòtesi nul·la, he assignat una lletra a cada tractament. El valor de mitjana més gran de tots els tractaments li corresponia la lletra a, al segon b i així successivament. Però si dos valors estadísticament no eren significatius els hi he assignat la mateixa lletra. (TAULA 14).

TAULA 13: Valors de probabilitat (p) de la proliferació dels tractaments

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
T1		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T2			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
T3				>0,05	>0,05	>0,05
T4					>0,05	>0,05
T5						>0,05
T6						

TAULA 14: Assignació de lletres segons l'anàlisi de variància de la proliferació dels tractaments

T1	T2	T3	T4	T5	T6	
T24	T24 + MMC	T24 + Myco2	T24 + Myco2 + MMC	T24 + E.coli	T24 + E.coli + MMC	Lletra
1.1584	0.3233	0.9983	0.3067	1.1915	0.3069	
a	c	b	c	a	c	

Per comparar tots els tractaments a l'anàlisi de variància, primer de tot he creat una taula de dades amb tots els valors d'absorbància dels tractaments. Seguidament, he multiplicat els valors d'absorbància obtinguts pel factor de dilució. El resultat obtingut, de la multiplicació anterior, l'he substituït a la x de l'equació del patró del kit de referència. Per fer l'anàlisi més fàcil, he anat comparant els tractaments de dos amb dos.

He seleccionat tots els valors obtinguts al substituir les x de l'equació del patró i en el menú principal he clicat Eines i he marcat l'opció Anàlisi de dades. Seguidament he marcat l'opció Anàlisi de variància un factor i he especificat que el Rang de sortida fos al mateix full de càlcul. He marcat acceptar i l'Excel automàticament m'ha creat l'anàlisi (ANNEX 3). He repetit aquest procediment amb tots els valors d'absorbància de la placa IL-6 i amb els valors de p he creat una taula on comparava tots els valors. I he marcat amb vermell aquells que afirmaven la hipòtesi nul·la (Taula 15). I depenent de si rebutjava o afirmava la hipòtesi nul·la, he assignat una lletra a cada tractament. El valor de mitjana més gran de tots els tractaments li corresponia la lletra A, al segon B i així successivament. Però si dos valors estadísticament no eren significatius els he assignat la mateixa lletra.

TAULA 15: Valors de probabilitat de la placa de cultiu amb IL-6

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
T1		<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
T2			<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
T3				<0,05	<0,05	<0,05
T4					<0,05	<0,05
T5						<0,05
T6						

L'anàlisi de la variància es va repetir per valorar les diferències les quantitats de IL-6 i IL-8. Les dades es mostren en les Taules 15 i 16 pels valors de IL-6 i en les Taules 17 i 18 pels valors de IL-8.

TAULA 16: Assignació de lletres segons l'anàlisi de variància de la placa de cultiu amb IL-6

T1	T2	T3	T4	T5	T6	
T24	T24 + MMC	T24 + Myco2	T24 + Myco2 + MMC	T24 + E.coli	T24 + E.coli + MMC	
446.888	418.4492	4629.6743	435.4923	13298.2327	467.9587	
4						
d	e	b	de	a	c	Lletra

TAULA 17: Valors de probabilitat de la placa de cultiu amb IL-8

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
T1		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
T2			<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
T3				<0,05	<0,05	<0,05
T4					<0,05	>0,05
T5						<0,05
T6						

TAULA 18: Assignació de lletres segons l'anàlisi de variància de la placa de cultiu amb IL-8

T1	T2	T3	T4	T5	T6	
14.577	1.521	72.543	1.531	108.186	1.597	
c	d	b	d	a	d	Lletra

4.5 COMENTARI DELS RESULTATS OBTINGUTS

4.5.1 PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Tal i com es pot observar a la taula 4 i al gràfic 1, els pous amb T24 soles, i en els que s'ha disposat T24 amb *E.coli*, les cèl·lules s'han anat reproduint, i fins i tot sembla ser que amb *E.coli* s'afavoreixi el seu creixement una mica més, tot i així, gràcies a l'anàlisi de variància realitzat podem afirmar que sabem que la diferència entre aquests el tractament i el control, no és significativa. En canvi, si comparem les T24 soles amb les T24 amb *Mycobacterium 2*, veiem que gràcies al *Mycobacterium 2* moltes cèl·lules han mort sense duplicar-se i per aquesta raó, no han estat capaces de metabolitzar el MTT i crear cristalls liles. Tot i així, els tractaments més eficaços han estat els tractaments que tenien Mitomicina ja que entre ells són iguals estadísticament. Per tant, podem afirmar que quan hi ha MMC, els efectes de *Mycobacterium* són inapreciables.

En conclusió podem dir que per inhibir el creixement de cèl·lules canceroses el tractament més eficaç és utilitzant mitomicina. Amb aquest tractament es redueix un 74% aproximadament la proliferació de cèl·lules canceroses. No obstant, no cal despreciar el tractament amb *Mycobacterium*, donat que malgrat que no ha inhibit el creixement de les cèl·lules canceroses a un nivell tan elevat com la mitomicina, ha provocat una reducció de fins un 13 % en la seva proliferació.

4.5.2 PRODUCCIÓ D'INTERLEUCINES

Com podem observar en el gràfic 4 i en el gràfic 5, quan no hi ha la Mitomicina tan a l'*E.coli* com el *Mycobacterium 2* incrementen significativament la secreció de IL-6 i de IL-8, sent més important la immunoestimulació produïda per l'*E.coli* que pel *Mycobacterium*. D'altra banda, quan afegim Mitomicina i *Mycobacterium 2* a les T24, aquestes no secreten més interleucines 6 que el control, ja que els valors no són estadísticament significatius. I quan afegim tan sols MMC a les cèl·lules aquestes secreten una mica menys interleucines 6. Per tant, podria ser que l'efecte immunoestimulador del *Mycobacterium* es veïés inhibit per la Mitomicina. Aquest efecte inhibidor no és tan evident amb *E.coli* i per això dóna uns valors estadísticament més elevats que el control. Però en el cas de les IL-8, el valor obtingut de les cèl·lules de la línia cel·lular T24 sense infectar és molt més petit del d'aquestes infectades pel *Mycobacterium*; i a la vegada,

també és força diferent de la resta de valors (de la línia cel·lular amb: Mitomicina, amb Mitomicina i *Mycobacterium 2* i amb Mitomicina i *E.coli*; que entre ells no són estadísticament significatius).

4.5.3 RESULTATS GLOBALS

Si tenim en compte els resultats obtinguts respecte la proliferació de les cèl·lules T24 en cada tractament i els obtinguts en la producció d'interleucines; el millor tractament és el *Mycobacterium 2*. Ja que tal i com hem dit abans, la Mitomicina disminueix més la proliferació de les cèl·lules tumorals del càncer de bufeta però en canvi, no estimula el sistema immunitari. I a més, tot i que l'*E.coli* immunoestimuli més les cèl·lules T24 que el *Mycobacterium*, cal tenir present que el *Mycobacterium 2* redueix el creixement de les cèl·lules tumorals mentre que *E.coli* no. Per tant, el *Mycobacterium 2* és millor tractament que l'*E.coli*.

En conclusió el millor tractament, si tenim en compte els resultats de la proliferació de les cèl·lules tumorals de bufeta, és la Mitomicina. Però si no només tenim en compte aquests resultats, sinó que també tenim els de la producció d'interleucines, tant IL-6 com IL-8 el millor tractament és el *Mycobacterium*. Tot i així, ara caldria comprovar si és més eficient la Mitomicina, que és capaç d'inhibir el creixement i reproducció de les cèl·lules T24, o si la producció de citocines al estimular les cèl·lules del sistema immunitari, és més eficaç combatent les cèl·lules de la bufeta cancerígenes. Però en un laboratori, mitjançant una placa, no és possible quantificar com les citocines estimulen el sistema immunitari. A més a més, s'hauria de comprovar si la "cascada" immunològica en comptes de frenar la proliferació del càncer actua contra el *Mycobacterium*. Per tant, amb aquest protocol tan sols podem afirmar que tant el *Mycobacterium 2* com la Mitomicina són efectius contra el càncer de bufeta.

5. CONCLUSIONS

El càncer de bufeta afecta al 2% de la població que pateix alguna classe de càncer. I tot i que tradicionalment afectava més als homes que a les dones, actualment això està canviant. Aquest canvi ha estat produït a causa de la integració de les dones en el sector de la indústria i el transport; ja que certes substàncies químiques utilitzades en aquests sectors poden provocar càncer de bufeta. Tot i així, hi ha altres factors, per exemple alguns hàbits poc saludables com el consum de tabac o el consum alt de grasses i fregits, que també l'afavoreixen.

Però no tots els càncers de bufeta són iguals, segons el grau d'afectació a les parets de la bufeta n'hi ha quatre tipus diferents: carcinoma de les cèl·lules de transició, andeocarcinoma, sarcoma i invasió limfàtica. I tot i que actualment no se'n coneix la cura definitiva hi ha diversos tractaments per curar-lo. Com en altres tipus de càncer és cura mitjançant cirurgia (n'hi ha de dues classes: la resecció transuteral és utilitzada quan el càncer és superficial i la cistectomia utilitzada si és invasor), radioteràpia (s'utilitza quan el pacient no vol sotmetre's a la cirurgia, també com a tractament pal·liatiu en casos extrems i per evitar la recaiguda en el càncer) o quimioteràpia (s'utilitzen fàrmacs, com la Mitomicina, per evitar la recaiguda). Tot i així hi ha altres tractaments nous i utilitzats només en aquesta classe de càncer. Aquests són la fototeràpia i la immunoteràpia.

La immunoteràpia és un tractament nou basat en la utilització d'un bacil anomenat BCG per estimular el sistema defensiu del pacient per tal que aquest pugui lluitar contra el càncer. Normalment s'utilitza per evitar la recaiguda després que al pacient se li hagi dut a terme una resecció transuteral. Actualment s'està investigant aquesta teràpia ja que té l'avantatge de no perjudicar a les cèl·lules sanes del pacient que pateix el càncer ja que no és necessiten productes químics ni radiacions per dur-la a terme. Concretament, s'estan investigant bacteris del gènere *Mycobacterium* ja que pertany a aquest gènere el bacil utilitzat actualment.

La part experimental d'aquest treball s'ha basat en la recerca d'un nou tractament pel càncer de bufeta. Concretament, està centrat en l'estudi de la barreja de tractaments quimioestàtics (la Mitomicina) i d'estimuladors del sistema immunitari (el *Mycobacterium 2*). Per valorar la seva efectivitat s'han tingut en compte la seva capacitat de matar a les cèl·lules tumorals i la producció de interleucines 6 i 8. Després de dur a terme l'estudi, s'ha arribat a la conclusió que la mescla de tractaments quimioestàtics i d'estimuladors del sistema immunitari no és factible; ja que d'una banda, en presència de Mitomicina, el *Mycobacterium 2* no afecta a la proliferació de les cèl·lules T24(cèl·lules tumorals de bufeta humana) i d'altra banda, la Mitomicina inhibeix l'estimulació de producció d'interleucines 6 i 8 per part del *Mycobacterium*. En canvi si tenim en compte els tractaments per si sols, la Mitomicina és el millor tractament per disminuir la proliferació de les cèl·lules tumorals i el *Mycobacterium 2* és el millor per estimular el sistema immunitari. Però si tenim en compte els resultats obtinguts en la proliferació i en l'estimulació, sembla ser que el *Mycobacterium 2* és el millor tractament. Tot i així, això no ho podem assegurar ja que no sabem si la producció d'interleucines és més eficaç combatent les cèl·lules de la bufeta cancerígenes o si ho és més a Mitomicina, que és capaç d'inhibir el creixement i reproducció de les cèl·lules T24.

Finalment, m'agradaria dir que gràcies a aquest treball he après moltes coses sobre el càncer. A més, aquest treball de recerca ha tingut per a mi un aspecte orientatiu pel què fa a la futura carrera que vull estudiar ja que m'ha fet decidir estudiar una carrera dins de l'àmbit biosanitari amb la qual en un futur em pugui dedicar a la recerca. I per últim, dir que haver fet una estada a la UAB ha estat una experiència inoblidable, amb la qual he pogut conèixer a professionals, aprendre a utilitzar certes tècniques i instruments de laboratori, entre moltes altres coses. Per aquesta raó, aconsello a futurs estudiants aquesta estada.

6. GLOSSARI

¹ **Polisacàrid:** molècula formada per la unió de molts monosacàrids, és a dir, de molts glúcids simples.

² **Tim:** Glàndula endocrina dels vertebrats, situada darrere de l'estern que té un paper essencial a les funcions immunitàries i que desapareix o esdevé sense ús en els individus adults.

³ **Apoptosi:** és una de les classes de mort cel·lular programada ja que està regulada genèticament. Quan una cèl·lula mor per apoptosi, fragmenta el nucli i empaqueta el seu contingut plasmàtic en forma de vesícules. D'aquesta forma mitjançant la fagocitosi poden ser reutilitzades per altres cèl·lules o macròfags.

⁴ **Enzim:** molècula de naturalesa proteica que faciliten i acceleren les reaccions químiques que es duen a terme en els éssers vius.

⁵ **Antigen:** és una molècula, normalment una proteïna o polisacàrid, estranya a l'organisme que s'uneix a un anticòs específic. Poden produir una resposta al sistema immunitari ja que aquest el reconeix com a una amenaça. De vegades l'antigen pot unir-se a l'anticòs però no generar resposta immune.

⁶ **Polipèptid:** és una molècula formada per la unió de més de 10 aminoàcids.

⁷ **Glucoproteïna:** és una molècula composta per una proteïna unida a un o més d'un hidrat de carboni.

⁸ **Fase aguda:** reacció inflamatòria local que consisteix en provocar febre, en augmentar els factors humorals inflamatoris i augmentar la síntesi de proteïnes o glucoproteïnes que es troben normalment en el plasma, per part de les cèl·lules del fetge (els hepatòcits).

⁹ **Antiinflamatori:** els seus mecanismes d'acció que impedeixen o inhibeixen la síntesi de prostaglandines, unes hormones que participen en els processos de regulació del sistema immunitari.

¹⁰ **Proinflamatòria:** significa que promou la inflamació sistèmica.

¹¹ **Necrosi:** és la mort d'una o varies cèl·lules provocada per un agent nociu que ha provocat una lesió tant greu que no es pot reparar ni curar.

¹² **Metilcolantrè:** hidrocarburi cancerigen que crema compostos orgànics.

¹³ **Singènics:** bessons homozigòtics.

¹⁴ **Esfínter:** és un múscul amb forma d'anell que al dilatar-se permet el pas d'una substància cap a un altre òrgan; però a la vegada també té com a funció impedir que la substància torni a entrar

¹⁵ **Gangli limfàtic:** és una estructura nodular que forma part del sistema limfàtic que ajuda al cos a reconèixer i combatre gèrmens, infeccions i altres substàncies estranyes al cos. Actua com a filtre.

¹⁶ **Resecció:** extirpació total o parcial d'un òrgan.

¹⁷ **Cistoscopi:** Instrument utilitzat per visualitzar la uretra i la bufeta

¹⁸ **Sonda vesical:** és un instrument medi, d'un sol ús, que s'utilitza per evacuar la orina continguda en l'interior de la bufeta o bé per omplir-la d'alguna substància amb finalitat terapèutica.

¹⁹ **Sèrum:** és una dissolució amb substàncies compatibles amb els organismes vius a causa de les seves característiques com el pH. Està compost per aigua, substàncies amb electrons lliures i a vegades de substàncies com la glucosa.

²⁰ **Fol·licle pilós:** és la part de la pell que dina creixement al cabell a causa de la presència de cèl·lules mare.

²¹ **Caréter o caréter de Foley:** és un dispositiu que permet la injecció de fàrmacs, el drenatge de líquids i l'accés d'altres instruments mèdics; mitjançant la seva introducció a un teixit o a una vena.

²² **Streptomices:** és un gènere d'accionbacteris del qual pertanyen més de 500 espècies. Són gram positius i produeixen dos terços dels antibiòtics d'origen natural utilitzats. Rarament aquest gènere és patogen per l'ésser humà, tot i així pot provocar infeccions.

²³ **Dany tissular:** dany en els teixits.

²⁴ **Rash cutani:** erupció de la pell que pot aparèixer a causa d'una substància (intoxicació o al·lèrgia).

²⁵ **Bacil:** classe de bacteri que té una forma allargada.

²⁶ **Antigen 85:** es un complex produït per tres proteïnes. L'antigen 85 s'activa com una resposta al mal produït al bacil. Les 3 proteïnes per les quals està compost, són essencials per la síntesi de la paret bacteriana.

²⁷ **Uroepiteli:** és una barrera protectora que permet l'emmagatzematge de l'orina.

²⁸ **Granulòcit o cèl·lula polimorfonuclear:** és una cèl·lula de la sang. Aquest terme inclou tres tipus: neutròfils, eosinòfils i basòfils. S'anomenen granulòcits perquè estan compostos de petits grànuls que contenen proteïnes. En general ajuden al cos a combatre infeccions causades per bacteris.

²⁹ **Cèl·lula mononuclear de sang perifèrica:** és una classe de cèl·lules del sistema immunitari, que tenen un nucli rodó i tenen com a funció combatre les infeccions.

- ³⁰ **Polimorfisme:** són els diferents al·lels d'un gen d'una població en concret, per tant la variació de la seqüència en un punt concret de l'ADN.
- ³¹ **Cistitis:** és una infecció de la bufeta urinària.
- ³² **Infecció sistèmica:** és aquella infecció, en la qual el patògen està distribuït per tot l'organisme, en comptes de centrar-se en una zona.
- ³³ **Peptidoglicà:** component de paret cel·lular dels bacteris, el qual li proporciona rigidesa i resistència. És un polímer de sucres i aminoàcids.
- ³⁴ **Lugol:** és una dissolució de iode (I₂) i iodur de potassi amb aigua destil·lada.
- ³⁵ **Safranina alcoholica:** és un colorant biològic utilitzat a la tinció de Gram. També en altres protocols pot colorar el nucli de vermell.
- ³⁶ **Línia cel·lular T24:** són cèl·lules epitelials de la bufeta humana cancerígenes.
- ³⁷ **Control:** una mostra que saps que sortirà 100% el què esperes. Hi ha dues classes de control: el positiu i el negatiu.
- ³⁸ **Flora intestinal:** conjunt de bacteris que viuen a l'intestí, la gran majoria dels quals no són perjudicials per l'organisme, al contrari, són beneficiosos. Moltes espècies depenen de la seva flora intestinal, per exemple les vaques o els tèrmits. Entre les funcions d'aquests bacteris destaquen la síntesi de determinats compostos o l'ajuda en l'absorció de nutrients.
- ³⁹ **Tripsina:** és un enzim peptidasa que trenca mitjançant hidròlisi trenca els enllaços peptídics de les proteïnes (concretament els enllaços formats per carboxil dels aminoàcids arginina i lisina) per formar aminoàcids i pèptids més petits. Cal dir que el tall és du a terme al mig de la cadena. El pàncrees produeix aquest enzim però inactiu i és activat en l'intestí prim. El seu pH òptim és 8 i la temperatura 37°C.
- ⁴⁰ **PBS:** és una dissolució amortidora, és a dir, és una dissolució que ajuda a mantenir un pH constant utilitzada en la recerca biològica. Conté aigua destil·lada, clorur de sodi, di-Sodi Hidrogenfosfat, Potassi di-Hidrògen Fosfat i Potassi Clorur. Les dissolucions amortidores també són anomenades dissolucions tampó.
- ⁴¹ **Blau tripà:** és un colorant que s'utilitza per diferenciar les cèl·lules vives de les mortes.
- ⁴² **cfu (unitats formadores de colònies):** és una mesura indirecta de la quantitat de bacteris o fongs que hi ha en una mostra. Primer de tot cal semblar una mostra en una placa de Petri que contingui un medi de cultiu i a continuació s'ha d'incubar la placa a la temperatura òptima pel microorganisme que hem cultivat. Un cop han crescut les colònies en la placa es procedeix al seu recompte ja que es suposa que cada colònia prové d'una única cèl·lula de les presents a la part que es sembla de la mostra inicial.

7. WEBGRAFIA

Accinelli, Roberto. *Evaluación del tratamiento de la tuberculosis* [en línia]. Volum 6, número 6. Actualització: Desembre del 1998. Disponible des d'Internet a: <<http://www.fihu-diagnostico.org.pe/revista/numeros/1998-99/novdic98/editorial.html>>. [Data de consulta: 04/01/2011]

Calvagna, Mary. *Cáncer de vejiga* [en línia]. Actualització: 20 de setembre del 2010. Disponible des d'Internet a: <http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=od429707-b7e1-4147-9947-abca6797a602&chunkiid=103797> [Data de consulta: 16/08/2010]

Cáncer de vejiga [en línia]. No hi figura l'edició o la versió perquè no s'ha trobat. Disponible des d'Internet a: <http://www.urologyhealth.org/espanol/espanol.cfm?topic=37> [Data de consulta: 16/08/2010 i 19/10/2010]

Carson, Rosalyn. *Síntomas de Cáncer de Vejiga* [en línia]. Actualització: setembre del 2010. Disponible des d'Internet a: <http://www.mbm.com/healthgate/GetHGContent.aspx?token=9c315661-83b7-472d-a7ab-bc8582171f86&chunkiid=125986> [Data de consulta: 19/10/2010]

Chameira, Marta. *Sondas vesicales* [en línia]. Disponible des d'Internet a: <<http://enfermesalud.blogspot.com/2008/02/sondas-vesicales.html>> . [Data de consulta: 04/01/2011]

Diccionario de cáncer [en línia]. No hi figura l'edició o la versió perquè no s'ha trobat. Disponible des d'Internet a: <<http://www.cancer.gov/diccionario/?CdrID=46349>> [Data de consulta: 18/09/2010]

De la Peña Llerandi, Adolfo. *Cáncer de vejiga* [en línia]. Actualització: 14 de novembre del 2007. Disponible des d'Internet a: <<http://cancervesical-adolfo.blogspot.com/>> [Data de consulta: 13/10/2010]

Dugdale, David. *Esquistosomiasis* [en línia]. Actualització: 15 de setembre del 2010. Disponible des d'Internet a: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001321.htm> [Data de consulta: 08/08/2010]

El càncer. [en línia]. Actualització: Juny del 2009. Disponible des d'Internet a: <http://www.taringa.net/posts/info/5787971/Megapost-sobre-el-cáncer.html> [Data de consulta: 06/08/2010]

Enfermedades: cáncer de vejiga [en línia]. Actualització: 3 d'agost del 2010. Disponible des d'Internet a: <http://www.dmedicina.com/enfermedades/cancer/cancer-vejiga-1> [Data de consulta: 19/10/2010]

Explicación básica de lo que es el cáncer [en línia] Disponible des d'Internet a: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/explicacion-basica> [consulta: 06/08/2010]

Iáñez, Enrique. *Curso de inmunología general* [en línia]. Actualització: 1999. Disponible des d'Internet a: http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_02.htm [Data de consulta: 01/12/2010]

Información general sobre el cáncer de la vejiga [en línia]. No hi figura l'edició o la versió perquè no s'ha trobat. Disponible des d'Internet a: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/vejiga/Patient> [Data de consulta: 12/08/2010]

Instituto de Cirugía Urológica Avanzada. *Cáncer de vejiga* [en línia]. Actualització: 2002. Disponible des d'Internet a: <http://www.urologia.tv/icua/es/diseases.aspx?cod=14> [Data de consulta: 12/08/2010]

Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas. *Infecciones por Escherichia coli* [en línia]. Disponible des d'Internet a: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ecoliinfections.html> [Data de consulta: 28/12/2010]

Ministerio de sanidad, política social e igualdad. *Medicamentos y productos sanitarios* [en línia]. No hi figura l'edició o la versió perquè no s'ha trobat. Disponible des d'Internet a: <https://sinaem4.agemed.es/consaem/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=64882&formato=pdf&formulario=FICHAS> [Data de consulta: 13/10/2010]

Nuevos discos con ¿bacterias? [en línia]. Última actualització el 2 de desembre del 2010. Disponible des d'Internet a: <http://www.siempregeek.com.ar/2010/12/nuevos-discos-con-¿bacterias/> [Data de consulta: 28/12/2010]

Ramírez, Roman. *Micobacterias(2)* [en línia]. Última actualització 24/11/2010. Disponible des d'Internet a: [http://www.slideboom.com/presentations/236256/MICOBACTERIAS_\(2\)](http://www.slideboom.com/presentations/236256/MICOBACTERIAS_(2))

Rash [en línia]. Disponible des d'Internet a: <http://es.mimi.hu/medicina/rash.html>. [Data de consulta: 04/01/2011]

Rodríguez Buenavida, Mercedes [et al]. *Micobacterias. Medios de cultivo e identificación. Patología y tipos de Tuberculosis: pruebas de laboratorio*. Disponible des d'Internet a: <http://ses.editorialcep.com/muestra/laboratorio.pdf> [Data de consulta: 30/12/2010]

Rodríguez Cuns, Grisel. *Género mycobacterium* [en línia]. Última actualització el 7 de setembre del 2009. Disponible des d'Internet a: <<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2024.pdf>> [Data de consulta: 31/12/2010]

Rosen, Leo. *¿Qué es el cáncer de vejiga?* [en línia]. Actualització: 5 de novembre del 2010. Disponible des d'Internet a: <http://www.cancer.org/Espanol/cancer/Cancerdevejiga/Guiadetallada/cancer-de-vejiga-what-is-what-is-bladder-cancer> [Data de consulta: 12/11/2010]

Sanofi Aventis. *Cáncer de vejiga: causas* [en línia]. Actualització: Maig del 2008. Disponible des d'Internet a: <http://www.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/vejiga2.html> [Data de consulta: 06/08/2010]

Smith, Rayan P [et al]. *Cáncer de vejiga: Los fundamentos* [en línia]. Actualització: 24 de febrer del 2008. Disponible des d'Internet a: <http://es.oncolink.org/types/article.cfm?c=21&s=66&ss=768&id=9464&p=3> [Data de consulta: 13/10/2010]

Solis, Junior. *Enfermedad cáncer de vejiga* [en línia]. No hi figura l'edició o la versió perquè no s'ha trobat. Disponible des d'Internet a: <http://www.findrxonline.com/articulos-medica/cancer-vejiga.html> [Data de consulta: 16/08/2010]

Suárez, A [et al]. *Citocinas y quimiocinas* [en línia]. Disponible des d'Internet a: <<http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema09/etexto09.htm>> [Data de consulta: 28/11/2010]

The American Society of Health-System Pharmacists, Inc. *Mitomicina* [en línia]. Maryland, 2010. Actualització 18 novembre 2010. Disponible des d'Internet a: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a682415-es.html>> [consulta: 04/12/10]

The Cleveland Clinic Foundation. *Mitomicina-C* [en línia]. Cleveland. No hi figura l'edició o la versió perquè no s'ha trobat. Disponible des d'Internet a: http://www.chemocare.com/es/bio_es/mitomicinac_ES.asp [consulta: 04/12/10]

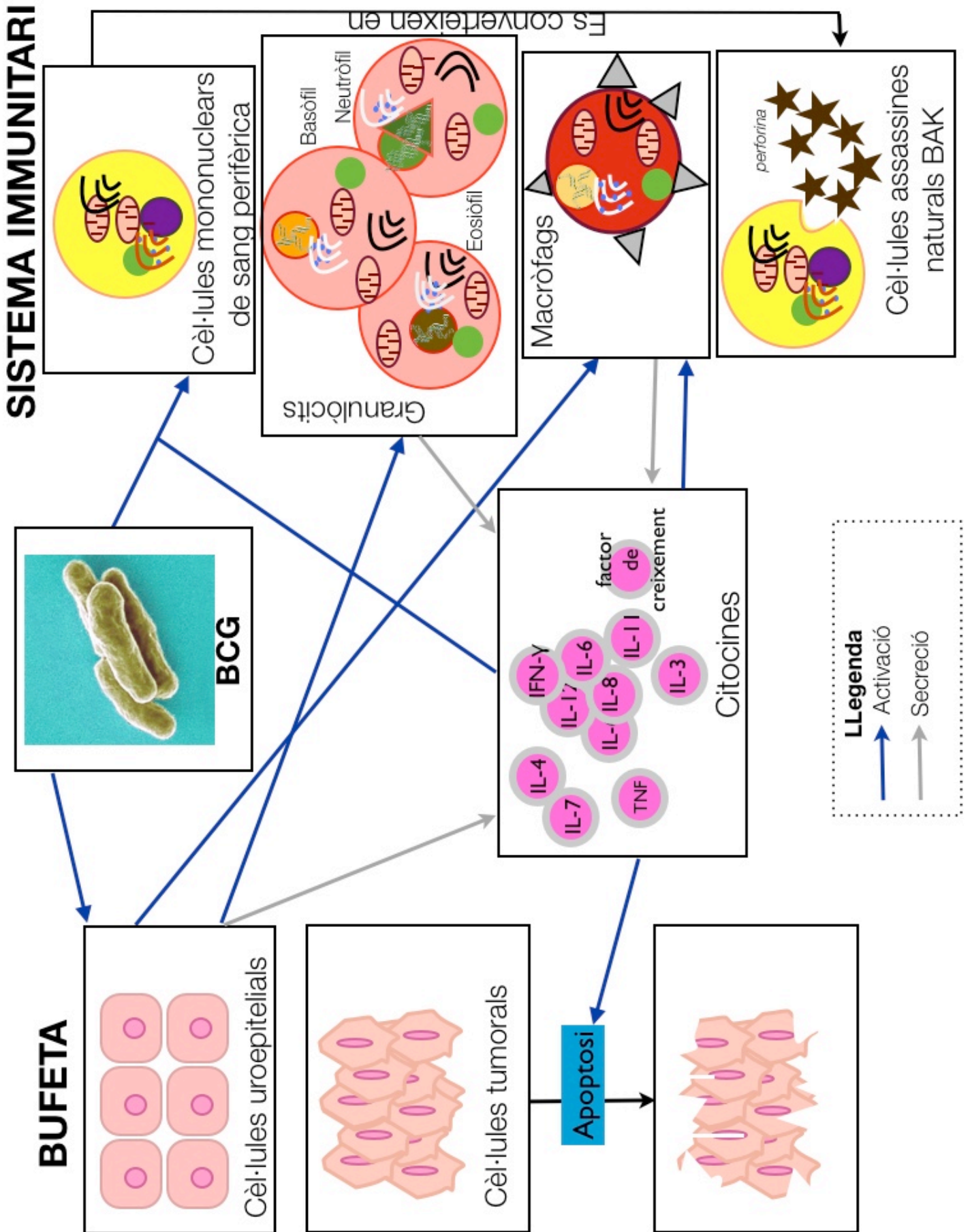
UBM Medica Spain S.A. *Mitomicina* [en línia]. No hi figura l'edició o la versió perquè no s'ha trobat. Disponible des d'Internet a: <http://www.vademecum.es/principios-activos-mitomicina-lo1dc03> [consulta: 04/12/10]

8. BIBLIOGRAFIA

ABBAS K, Abul [et al]. *Inmunología Celular y Molecular*. Quarta edició. Madrid: McGraw Hill, 2002. Un volum. 577 pàgines

ANNEX 1

Cascada immunològica a la bufeta a causa del BCG



ANNEX 2

Anàlisi de varianza de la proliferació

Tractament 1-Tractament 2 (T1-T2)

	T1	T2					
	1.1236	0.3386					
	1.2076	0.3116					
	1.1439	0.3198					
Análisis de varianza de un factor							
RESUMEN							
	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
	Columna 1	3	3.4751	1.1583667	0.0019210		
	Columna 2	3	0.97	0.3233333	0.0001916		
ANÁLISIS DE VARIANZA							
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
	Entre grupos	1.04592100166667	1	1.0459210	990.1851310	0.0000061	7.7086497
	Dentro de los grupos	0.0042251533333333	4	0.0010563			
	Total	1.050146155	5				

Tractament 1-Tractament 3 (T1-T3)

T1	T3				
1.1236	0.9666				
1.2076	0.9993				
1.1439	1.0290				
Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Columna 1	3	3.4751000	1.1583667	0.0019210	
Columna 2	3	2.9949000	0.9983000	0.0009742	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Prueba de varianza de cuadrados libres</i>					
<i>Prueba de varianza de cuadrados libres</i>					
Entre grupos	0.0384320	1	0.0384320	26.549202	0.0067324
Dentro de los grupos	0.0057903	4	0.0014476		
Total	0.0442223	5			
					7.7086497

Tractament 1-Tractament 4 (T1-T4)

T1	T4					
1.1236	0.3001					
1.2076	0.3029					
1.1439	0.3171					
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	3	3.475100	1.158367	0.001921		
Columna 2	3	0.920100	0.306700	0.000083		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones: Suma de cuadrados</i>						
Entre grupos	1.0880042	1	1.088004	1085.80902	0.000005	7.708650
Dentro de los grupos	0.0040081	4	0.001002			
Total	1.0920123	5				

Tractament 1- Tractament 5 (T1-T5)

T1	T5				
1.1236	1.1035				
1.2076	1.2563				
1.1439	1.2147				
Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Columna 1	3	3.4751000	1.1583667	0.0019210	
Columna 2	3	3.5745000	1.1915000	0.0062406	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>					
<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.0016467	1	0.0016467	0.4035302	0.5597939
Dentro de los grupos	0.0163232	4	0.0040808		7.7086497
Total	0.0179699	5			

Tractament 1-Tractament 6 (T1-T6)

T1	T6					
1.1236	0.3143					
1.2076	0.3029					
1.1439	0.3036					
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	3.4751000	1.1583667	0.0019210		
Columna 2	3	0.9208000	0.3069333	0.0000408		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1.0874081	1	1.087408	1108.589532	0.000005	7.708650
Dentro de los grupos	0.0039236	4	0.000981			
Total	1.0913317	5				

Tractament 2-Tractament 3 (T2-T3)

	T2	T3				
	0.3386	0.9666				
	0.3116	0.9993				
	0.3198	1.0290				
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	3	0.9700000	0.3233333	0.0001916		
Columna 2	3	2.9949000	0.9983000	0.0009742		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variacione: Suma de cuadrados</i>						
Entre grupos	0.6833700	1	0.6833700	1172.3589771	0.0000043	7.7086497
Dentro de los grupos	0.0023316	4	0.0005829			
Total	0.6857016	5				

Tractament 2-Tractament 4 (T2-T4)

T2	T4					
0.3386	0.3001					
0.3116	0.3029					
0.3198	0.3171					
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	3	0.9700000	0.3233333	0.0001910		
Columna 2	3	0.9201000	0.3067000	0.000083		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>						
	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.000415	1	0.000415	3.021563	0.157157	7.708650
Dentro de los grupos	0.000549	4	0.000137			
Total	0.000964	5				

Tractament 2-Tractament 5 (T2-T5)

T2	T5				
0.3386	1.1035				
0.3116	1.2563				
0.3198	1.2147				
Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Columna 1	3	0.970000	0.323333	0.000192	
Columna 2	3	3.574500	1.191500	0.006241	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones: Suma de cuadrados					
Entre grupos	1.130570	1	1.1305700	351.5315654	0.0000476
Dentro de los grupos	0.012865	4	0.0032161		
Total	1.143435	5			7.7086497

Tractament 2-Tractament 6 (T2-T6)

	T2	T6				
	0.3386	0.3143				
	0.3116	0.3029				
	0.3198	0.3036				
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
	Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
	Columna 1	3	0.970000	0.323333	0.000192	
	Columna 2	3	0.920800	0.306933	0.000041	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
	Entre grupos	0.000403	1	0.000403	3.471397	0.135901
	Dentro de los grupos	0.000465	4	0.000116		7.708650
	Total	0.000868	5			

Tractament 3-Tractament 4 (T3-T4)

	T3	T4					
	0.9666	0.3001					
	0.9993	0.3029					
	1.0290	0.3171					
Análisis de varianza de un factor							
RESUMEN							
	<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
	Columna 1	3	2.994900	0.998300	0.000974		
	Columna 2	3	0.920100	0.306700	0.000083		
ANÁLISIS DE VARIANZA							
	<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
	Entre grupos	0.7174658	1	0.7174658	1357.2045740	0.0000032	7.7086497
	Dentro de los grupos	0.0021145	4	0.0005286			
	Total	0.7195804	5				

Tractament 3-Tractament 5 (T3-T5)

T3	T5				
0.9666	1.1035				
0.9993	1.2563				
1.0290	1.2147				
Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Columna 1	3	2.994900	0.998300	0.000974	
Columna 2	3	3.574500	1.191500	0.006241	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.055989	1	0.055989	15.520632	0.016965
Dentro de los grupos	0.014430	4	0.003607		7.708650
Total	0.070419	5			

Tractament 3-Tractament 6 (T3-T6)

T3	T6				
0.9666	0.3143				
0.9993	0.3029				
1.0290	0.3036				
Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Columna 1	3	2.994900	0.998300	0.000974	
Columna 2	3	0.920800	0.306933	0.000041	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>					
<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.716982	1	0.71698180	1412.75346465	0.00000299
Dentro de los grupos	0.002030	4	0.00050751		7.70864972
Total	0.719012	5			

Tractament 4-Tractament 5 (T4-T5)

T4	T5						
0.3001	1.1035						
0.3029	1.2563						
0.3171	1.2147						
Análisis de varianza de un factor							
RESUMEN							
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>			
Columna 1	3	0.920100	0.306700	0.000083			
Columna 2	3	3.574500	1.191500	0.006241			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	1.174307	1	1.1743066	371.3973927	0.0000427	7.7086497	
Dentro de los grupos	0.012647	4	0.0031619				
Total	1.186954	5					

Tractament 4-Tractament 6 (T4-T6)

T4	T6					
0.3001	0.3143					
0.3029	0.3029					
0.3171	0.3036					
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	3	0.9201000	0.3067000	0.0000831		
Columna 2	3	0.9208000	0.3069333	0.0000408		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.000000082	1	0.00000008	0.00131823	0.97277688	7.70864972
Dentro de los grupos	0.000247807	4	0.00006195			
Total	0.000247888	5				

Tractament 5-Tractament 6 (T5-T6)

T5	T6					
1.1035	0.3143					
1.2563	0.3029					
1.2147	0.3036					
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	3	3.574500	1.191500	0.006241		
Columna 2	3	0.920800	0.306933	0.000041		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>						
<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	1	1.1736873	373.6986811	0.0000422	7.7086497	
Dentro de los grupos	4	0.0125629	0.0031407			
Total	5	1.1862502				

ANNEX 3

Anàlisi de varianza dels tractaments

Tractament 1-Tractament 2 (T1-T2)

T24 sense infectar T24 + MMC		T1	T2			
1.6873	1.5624	901.349618	761.982729			
1.6221	1.4996	827.109139	696.416425			
1.6645	1.5512	875.01854	750.068373			
1.6728	1.5188	884.55795	716.142051			
1.6542		863.25374				
1.5647		764.441301				
1.64427	1.53300					
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio			
			Varianza			
T1	6	5115.730287	852.621714	2487.13330		
T2	4	2924.609578	731.152394	913.407242		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	35411.5096899486	1	35411.509690	18.667249	0.002544	5.317655
Dentro de los grupos	15175.8882262795	8	1896.986028			
Total	50587.3979162281	9				

Tractament 1- Tractament 3 (T1- T3)

	T24 sense infectar	T24 + <i>Micobacteri 2</i>	T1	T3
	1.6873	1.2275	901.3496181	227391.050525
	1.6221	0.8164	827.1091391	99906.75363744
	1.6645	0.6785	875.01854	68723.690909
	1.6728	1.2327	884.557953	229334.72853556
	1.6542	0.8025	863.253735	96499.924525
	1.5647	0.6466	764.441301	62338.75290384
	1.64427	0.90070		
		18.01400		
Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
T1	6	5115.730287	852.621714	2487.13334
T3	6	784194.901036	130699.150173	594203221
ANÁLISIS DE VARIANZA				
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>
Entre grupos	50580362857.9198	1	50580362857.919800	17.024594
Dentro de los grupos	29710173533.3714	10	2971017353.337140	0.002057
Total	80290536391.2912	11		4.964603

Tractament 1-Tractament 4 (T1-T4)

T24 sense infectar	T24 + <i>Micobacteri</i> 2 + MMC	T1	T4			
1.6873	1.6872	901.34961811	901.2332629			
1.6221	1.5874	827.1091391	788.9233542			
1.6645	1.5806	875.0185402	781.54817703			
1.6728	1.5844	884.5579534	785.6652401			
1.6542	1.5589	863.2537353	758.2491866			
1.5647		764.4413007				
1.64427	1.59970					
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio			
		Suma	Varianza			
T1	6	5115.730287	852.621714			
T4	5	4015.619221	803.123844			
		3152.789778				
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6681.92499509961	1	6681.924995	2.400996	0.155668	5.117355
Dentro de los grupos	25046.8256122217	9	2782.980624			
Total	31728.7506073213	10				

Tractament 1-Tractament 5 (T1-T5)

	T24 sense infectar	T24 + E.coli	T1	T5
	1.6873	1.1564	901.34961811	1271144.866484
	1.6221	0.9032	827.10913907	774193.128296
	1.6645	1.0766	875.0185402	1101293.812349
	1.6728	1.1299	884.55795341	1213390.35686025
	1.6542	0.9341	863.25373531	828273.07948025
	1.5647	1.0325	764.44130068	1012652.46715625
	1.64427	1.03878		
		51.93917		
Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
T1	6	5115.730287	852.621714	2487.1335
T5	6	6200947.710626	1033491.285104	40644877
ANÁLISIS DE VARIANZA				
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>
Entre grupos	3.19903E+12	1	3199027827382.590000	157.41357
Dentro de los grupos	2.03224E+11	10	20322439827.489400	0.000000192
Total	3.40225E+12	11		4.964603

Tractament 1-Tractament 6 (T1-T6)

T24 sense infectar	T24 + E.coli + MMC	T1	T6	
1.6873	1.7808	901.349618	1013.48848	
1.6221		827.109139	929.9689049	
1.6645	1.7552	875.01854	982.1204994	
1.6728	1.7117	884.557953	901.9315091	
1.6542	1.6878	863.253735	914.1953884	
1.5647	1.6983	764.441301		
1.64427	1.72676			
Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	
			Varianza	
T1	6.000000	5115.730287	852.621714	2487.133306
T6	5.000000	4741.704782	948.340956	2260.636571
ANÁLISIS DE VARIANZA				
Origen de las variaciones: Suma de cuadrados				
Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	
Entre grupos	24987.745317	1.000000	24987.745317	10.470597
Dentro de los grupos	21478.212802	9.000000	2386.468089	0.010227
Total	46465.958119	10.000000		5.117355

Tractament 2-Tractament 3 (T2-T3)

	T24 + MMC	T24 + <i>Micobacteri</i> 2	T2	T3
	1.5624	1.2275	24.55	
	1.4996	0.8164	16.328	227391.050525
	1.5512	0.6785	13.57	99906.75363744
	1.5188	1.2327	24.654	68723.690909
		0.8025	16.05	229334.72853556
		0.6466	12.932	96499.924525
	1.53300	0.900700		62338.75290384
		18.01400		
Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
T2	4	2924.609578	731.152394	913.407242
T3	6	784194.901036	130699.150173	5942032219.5
ANÁLISIS DE VARIANZA				
<i>Origen de las variaciones. Suma de cuadrados</i>				
Entre grupos	40540033071.531	1	40540033071.530600	10.916139
Dentro de los grupos	29710163837.9266	8	3713770479.740830	0.010795
Total	70250196909.4572	9		5.317655

Tractament 2-Tractament 4 (T2-T4)

	T24 + MMC	T24 + Micobacteri 2 + MMC	T2	T4
	1.5624	1.6872	761.9827	901.2332629
	1.4996	1.5874	696.4164	788.92335421
	1.5512	1.5806	750.068	781.54817703
	1.5188	1.5844	716.1421	785.6652401
		1.5589		758.2491866
	1.53300	1.59970		
Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
T2	4	2924.609577808	731.152394452	913.4072
T4	5	4015.6192207873	803.12384415746	3152.79
ANÁLISIS DE VARIANZA				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F
Entre grupos	11510.8657171235	1	11510.865717	5.248783
Dentro de los grupos	15351.3808356993	7	2193.054405	
Total	26862.2465528228	8		0.055724
				5.591448

Tractament 2-Tractament 5 (T2-T5)

T24 + MMC	T24 + E.coli	T2	T5			
1.5624	1.1564	57.82				
1.4996	0.9032	45.16	761.9827287616			
1.5512	1.0766	53.83	1271144.866484			
1.5188	1.1299	56.495	696.4164251856			
	0.9341	46.705	750.0683728704			
	1.0325	51.625	716.1420509904			
1.53300	1.03878		828273.07948025			
	51.93916666666667		1012652.46715625			
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio			
T2	4	2924.609578	731.152394			
T5	6	6200947.710626	1033491.285104			
			4064487716			
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.55982E+12	1	2559824380115.630000	100.768393	0.000008	5.317655
Dentro de los grupos	2.03224E+11	8	25403048572.431100			
Total	2.76305E+12	9				

Tractament 2-Tractament 6 (T2-T6)

	T24 + MMC	T24 + E.coli + MMC	T2	T6
	1.5624	1.7808	761.98273	1013.48848042
	1.4996		696.4164	929.9689049
	1.5512	1.7552	750.0684	982.120499366
	1.5188	1.7117	716.14205	901.931509104
		1.6878		914.195388365
	1.53300	1.72676		
Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
T2	4	2924.609578	731.152394	913.40724:
T6	5	4741.704782	948.340956	2260.6365
ANÁLISIS DE VARIANZA				
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>
Entre grupos	104824.158789335	1	104824.158789	62.274765
Dentro de los grupos	11782.768025008	7	1683.252575	0.000099
Total	116606.926814343	8		5.591448

Tractament 3-Tractament 4 (T3-T4)

T24 + <i>Micobacteri</i> 2 + MMC		T24 + <i>Micobacteri</i> 2		T4	T3	
	1.6872	1.2275	24.55	901.2332629	227391.050525	
	1.5874	0.8164	16.328	788.9233542	99906.75363744	
	1.5806	0.6785	13.57	781.54817703	68723.690909	
	1.5844	12.932	258.64	785.6652401	25548390.860936	
	1.5589	0.8025	16.05	758.2491866	96499.924525	
		0.6466			62338.75290384	
		3.29138	65.82760			
			1316.55200			
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
T4	5	4015.619221	803.123844	3152.789778		
T3	6	784194.901036	130699.150173	5942032219.5		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variación:</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	46017211788.8995	1	46017211788.899500	13.939835	0.004671	5.117355
Dentro de los grupos	29710173708.864	9	3301130412.096000			
Total	75727385497.7635	10				

Tractament 3-Tractament 5 (T3-T5)

	T24 + <i>E.coli</i>	T24 + <i>Micobacteri 2</i>	T5	T3
	1.1564	57.82	24.55	1271144.8665
	0.9032	45.16	16.328	774193.1283
	1.0766	53.83	13.57	1101293.8123
	1.1299	56.495	24.654	1213390.3569
	0.9341	46.705	16.05	828273.0795
	1.0325	51.625	12.932	1012652.4672
	1.03878			
	51.93917	18.01400		
Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
T5	6	6200947.710626	1033491.285104	40644877167.1
T3	6	784194.901036	130699.150173	5942032219.5
ANÁLISIS DE VARIANZA				
<i>Origen de las variaciones: Suma de cuadrados</i>				
Entre grupos	2.4451E+12	1	2445100916683.350000	104.969441
Dentro de los grupos	2.32935E+11	10	23293454693.693200	0.000001
Total	2.67804E+12	11		4.964603
			<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>

Tractament 4-Tractament 5 (T4-T5)

T24 + <i>Micobacteri</i> 2 T24 + <i>E.coli</i>		T4	T5			
1.6872	1.1564	901.2332629	1271144.866484			
1.5874	0.9032	788.9233542	774193.128296			
1.5806	1.0766	781.54817703	1101293.812349			
1.5844	1.1299	785.6652401	1213390.3568603			
1.5589	0.9341	758.2491866	828273.07948025			
	1.0325		1012652.46715625			
1.59970	1.03878					
	51.93917					
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Varianza			
T4	5	4015.6192207873	803.12384415746			
T5	6	6200947.710626	1033491.28510429			
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.90849E+12	1	2908485922927.7400000	128.8052690	0.0000012	5.1173550
Dentro de los grupos	2.03224E+11	9	22580488716.7096000			
Total	3.11171E+12	10				

Tractament 4-Tractament 6 (T4-T6)

T24 + <i>Micobacteri</i> 2 T24 + <i>E.coli</i> + MMC		T4	T6
	1.6872	901.2333	1013.48848
	1.5874	788.9234	929.968905
	1.5806	781.5482	982.1204994
	1.5844	785.6652	901.9315091
	1.5589	758.2492	914.1953884
	1.59970		
Análisis de varianza de un factor			
RESUMEN			
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
T4	5	803.12384415746	3152.79
T6	5	948.3409564326	2260.637
ANÁLISIS DE VARIANZA			
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	52720.0242438265	1	52720.024244
Dentro de los grupos	21653.7054109502	8	2706.713176
Total	74373.729654767	9	
			<i>F</i>
			<i>Probabilidad</i>
			<i>Valor crítico para F</i>
			0.002246
			5.317655