

A high-magnification microscopic image of Mantle Cell Lymphoma (MCL) cells. The field is densely populated with small, round lymphocytes. These cells have a characteristic appearance with a thin rim of blue-stained cytoplasm surrounding a large, dark, eccentric nucleus. The overall texture is granular and uniform in color, typical of a hematoxylin and eosin (H&E) stained tissue section.

**L'Eficiència d'un fàrmac
en cèl·lules de Limfoma del Mantell**

AGRAÏMENTS

Durant la realització del Treball de Recerca moltes persones ens han ofert la seva col·laboració i ajut. Les següents línies serveixen per expressar el nostre agraïment a totes elles.

Primer de tot agrair a la tutora d'aquest treball Imma Andreu per tots els seus consells i per la bona orientació que ens ha ajudat a mantenir un ritme òptim durant tot el treball.

A la unitat d'hematologia de l'Hospital Clínic de Barcelona, especialment a la Doctora Dolors Colomer, ja que sense ella no hagués estat possible realitzar el treball.

A la Mònica López, biòloga de l'Hospital Clínic de Barcelona, per transmetre'ns tots els seus coneixements i per la gran ajuda que ens va proporcionar al realitzar la pràctica al laboratori.

I ja per acabar, ens cal donar les gràcies a les nostres famílies pel seu suport, la seva paciència i la comprensió que han demostrat en tot moment.

Moltes gràcies a tots!

ÍNDEX

1.Introducció	6
2.Càncer	8
2.1 Definició de Càncer	8
2.2 Com es desenvolupa el càncer dins l'organisme?	8
2.3 Per què maten les cèl·lules canceroses?	9
2.4 Causes	10
2.4.1 La importància de l'ambient.....	11
2.4.1.1 Dieta	11
2.4.1.2 Tabac	11
2.4.1.3 Agents químics industrials.....	12
2.4.1.4 Radiacions solars.....	12
2.4.1.5 Virus	13
2.5 Prevenció	13
2.6 Diagnòstic i tractament	15
2.6.1 Biòpsia.....	15
2.6.2 Cirurgia.....	15
2.6.3 Quimioteràpia.....	15
2.6.4 Radioteràpia.....	16
2.4 Epidemiologia.....	16
3. El Sistema Immunitari	16
3.1 Limfòcits, òrgans i vasos limfàtics	18
4. Limfoma	21
4.1 El sistema Limfàtic	21
4.2 Definició de Limfoma	21
4.3 Classificació dels Limfomes	22

5. Limfoma del Mantell	24
5.1 Desenvolupament del LCM dins l'organisme	24
5.2 Pronòstic	25
5.3 Tractament	25
5.3.1 Quimioteràpia	25
5.3.2 Inhibidor de proteosoma (farmacoteràpia)	25
5.3.3 Trasplantament de cèl·lules mare	26
6. Coneixements previs a la pràctica	27
6.1 Assaig MTT	27
6.2 Fàrmacs	27
6.2.1 Fludarabina	27
6.2.1.1 Mecanisme d'acció	28
6.2.1.2 Indicacions terapèutiques	28
6.2.1.3 Posologia	28
6.2.1.4 Reaccions adverses	29
6.2.2 Bortezomib	30
6.2.2.1 Mecanisme d'acció	30
6.2.2.2 Indicacions terapèutiques	30
6.2.2.3 Posologia	31
6.2.2.4 Reaccions adverses	31
6.2.3 Sorafenib	32
6.2.3.1 Mecanisme d'acció	32
6.2.3.2 Indicacions terapèutiques	33
6.2.3.3 Posologia	33
6.2.3.4 Reaccions adverses	33
6.2.4 Aspirina	34
6.2.4.1 Mecanisme d'acció	34
6.2.4.2 Història	34
6.2.4.3 Posologia	35
6.2.4.4 Reaccions adverses	35

7. Experiència pràctica	36
7.1 Objectius	36
7.2 Hipòtesi	36
7.3 Variable independent i dependent.....	36
7.4 Material.....	36
7.5 Procediment	43
7.6 Resultats.....	54
7.7 Interpretació dels resultats.....	62
7.7.1 Bortezomib.....	62
7.7.2 Fludarabina	62
7.7.3 Sorafenib	62
7.7.4. Aspirina.....	63
8. Conclusions	64
9. Fonts d'informació.....	66
9.1 Bibliografia	66
9.2 Recursos electrònics	66
10. Annex.....	67
10.1 Glossari	67
10.2 Il·lustracions i taules	71

1. INTRODUCCIÓ

El nostre Treball de Recerca l'hem anomenat: "L'eficiència d'un fàrmac en cèl·lules del Limfoma del Mantell". Tracta sobre les diferents respostes que donen les cèl·lules tumorals exposant-les a diferents medicaments.

L'objectiu d'aquest treball és conèixer l'efecte que produeixen quatre fàrmacs anomenats: Sorafenib, Bortezomib, Fludarabina i Aspirina, sobre unes cèl·lules canceroses d'un malalt de Limfoma del Mantell.

Va ser proposat des de l'Hospital Clínic de Barcelona per la unitat d'hematopatologia. Aquest grup d'investigació està coordinat per la Dra. Dolors Colomer i essencialment treballen l'anàlisi de l'apoptosi⁴ induïda per drogues en cèl·lules de leucèmia limfàtica crònica i Limfomes del Mantell.

Al veure l'existència d'aquest tema ens va semblar que seria una gran oportunitat i una experiència molt motivadora al treballar amb professionals de la matèria i poder utilitzar tecnologies molt avançades. Actualment la investigació és molt important perquè s'encarrega d'avançar en el coneixement biomèdic per tal de millorar el diagnòstic i aconseguir tractaments cada cop més eficaços i específics.

Tot i ser de dos batxillerats diferents vam escollir aquest treball que ens interessava a totes dues i vam pensar que no seria cap dificultat ja que és un treball d'investigació i recerca.

El treball està estructurat en dues parts clarament diferenciades:

En la primera part hem presentat el càncer i més específicament ens hem centrat en el Limfoma del Mantell. Però primer hem explicat el sistema immunitari i seguidament el sistema limfàtic ja que són dos sistemes importants que es veuen afectats per aquest tipus de càncer.

La segona part és la pràctica, l'hem realitzat a l'Hospital Clínic de Barcelona en un laboratori especialitzat en la investigació de l'apoptosi de les cèl·lules. Vam realitzar la pràctica amb l'ajuda de la Mònica López, doctorada en biologia i actualment becària de la Generalitat de Catalunya, que va ser qui ens va dirigir durant els tres dies que va durar. Gràcies a la seva ajuda ens va ser molt més fàcil comprendre els nous conceptes i poder realitzar gràfiques, taules i càlculs que ens van permetre entendre més fàcilment els resultats obtinguts.

2. CÀNCER

2.1 Definició de Càncer

El càncer és una malaltia neoplàsica¹⁹ que la seva evolució natural és mortal. Les cèl·lules canceroses, a diferència de les cèl·lules dels tumors benignes, mostren les propietats d'invasió i metàstasi¹⁷ i també són molt anaplàstiques¹ (fig. 1). El càncer engloba les dos grans categories de carcinoma⁶ i sarcoma²³, tot i que en el seu ús normal amb freqüència és utilitzat com a sinònim de carcinoma. (¹)

El càncer és una neoplàsia maligne. És un tipus de malaltia en què un grup de cèl·lules desenvolupen un creixement descontrolat, és a dir, es divideixen més enllà dels límits normals. També tenen la capacitat d'invasió que és la destrucció dels teixits adjacents i a vegades fa metàstasi, per tant, s'estén a altres punts del cos a través de la limfa o la sang. (fig. 2)

La majoria de càncers formen un tumor, però alguns, com per exemple la leucèmia, no ho fan.

La branca de la medicina que s'ocupa de l'estudi, el diagnòstic, el tractament i la prevenció del càncer és l'oncologia. L'oncologia és l'especialitat mèdica que estudia els tumors benignes i malignes, però amb atenció especial als malignes, o dit d'altre manera, el càncer.

2.2 Com es desenvolupa el càncer dins l'organisme?

Tots els càncers són provocats per anormalitats en el material genètic. Un mutagen es un agent físic o químic que altera la informació genètica d'un organisme i això incrementa el número de mutacions per sobre del nivell normal. Quan nombroses mutacions causen càncer son anomenades

(¹) *Dorland Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina*, 2005

carcinògenes. Normalment aquestes mutacions són provocades pel fum del tabac, radiacions, substàncies químiques i agents infecciosos.

Des de la primera mutació en una cèl·lula als primers símptomes del pacient passen normalment dècades, ja que és un procés molt lent. Comença amb una sola cèl·lula mutada que creix més del compte, després evoluciona cap a una massa de cèl·lules, un tumor benigne. Tot seguit aquest tumor creix progressivament fins que una nova mutació més converteix les cèl·lules d'aquest tumor en maligne. I és aquest el que té capacitat d'envair els teixits del seu voltant i també fer metàstasi, això provoca l'aparició de colònies canceroses a diferents punts del cos que en un 90% dels casos acaba matant el pacient.

Les mutacions que provoquen càncer poden ser de dos tipus en funció de si el risc del càncer es produeix per un excés d'activitat o bé per una pèrdua de funció: (*fig. 3*)

- Quan les mutacions són als *proto-oncogenes* (gens encarregats de la regulació del creixement cel·lular) passen a ser oncogenes i causen un creixement descontrolat.
- Quan les mutacions són als gens supressors tumorals (gens encarregats de l'apoptosi) provoquen la protecció contra l'apoptosi.

Algunes mutacions en el gen p53 permeten a les cèl·lules tumorals sobreviure i proliferar encara que tinguin alguna alteració al seu ADN. Aquest gen és el més important en el càncer humà i s'ha trobat mutat en més de la meitat de tumors humans. La seva funció és controlar la divisió cel·lular, l'apoptosi i el manteniment de l'estabilitat genètica. Tots aquests aspectes protegeixen l'organisme davant dels danys i dels desordres cel·lulars. Hi ha una malaltia genètica infreqüent anomenada *Síndrome de Li-fraumeni*, en la qual els afectats tenen una mutació hereditària al gen de la p53 que fa que apareguin diferents tipus de càncer abans dels quaranta anys.

En els tumors també s'han trobat mutacions a la proteïna pRb que és l'encarregada d'inhibir l'entrada en el cicle de divisió cel·lular (mitosi), de manera que la cèl·lula no entra en divisió fins que no està preparada i no hi hagi les condicions adequades, per tant impedeix la proliferació cel·lular.

En resum, una cèl·lula pot causar un càncer perquè a mesura que va evolucionant i tenint més mutacions va adquirint una gran quantitat de propietat anormals:

1. Ignoren els senyals internes i externes que regulen la proliferació cel·lular
2. Eviten el suïcidi per apoptosi.
3. Eviten la diferenciació
4. Genèticament són molt inestables
5. Tenen capacitat invasiva
6. Sobreviure i proliferar en entorns aliens.

2.3 Per què maten les cèl·lules canceroses?

La resposta a aquesta pregunta sol ser senzilla. El teixit cancerós competeix amb els teixits normals per aconseguir els nutrients. Com que les cèl·lules canceroses continuen proliferant indefinidament, el seu número es multiplica dia a dia i de seguida requereixen de tota la nutrició disponible per l'organisme. En conseqüència, els teixits normals pateixen una mort nutritiva gradual.

2.4 Causes

Tots alguna vegada a la vida ens hem preguntat què és el que realment causa l'aparició d'un càncer. Els gens o l'ambient?

La lògica ens fa pensar que és una barreja dels dos factors.

S'han fet molts estudis en els quals s'ha pogut observar que el factor ambiental té un paper molt important en l'aparició del càncer. Per exemple, les poblacions d'emigrants tendeixen a adquirir el patró d'incidència de càncer típic del país d'adopció. En canvi la genètica té un paper menys important ja que es calcula que menys del 20% dels càncers són provocats per causes heretades.

2.4.1 La importància de l'ambient

Es calcula que aquesta és la causa d'un 80% dels càncers. La relació causa/efecte més demostrat és el fum del tabac, tant sigui inhalat de forma activa o passiva; és el causant d'un 40% de morts de càncer. Els factors alimentaris són els responsables d'un 40%; l'obesitat, l'alt contingut de greixos i l'alcohol actuen com a promotors del càncer. Altres factors que influeixen són: el sol, els agents contaminants, agents industrials, fàrmacs, virus i altres. (*fig. 4*)

2.4.1.1 Dieta

Es pot considerar que la dieta és el primer factor responsable de l'aparició de càncer. Els factors alimentaris poden ser responsables del 40%, però la relació entre la dieta i el càncer no està establerta i no se'n coneixen amb exactitud els contribuents que són responsables del càncer. L'obesitat és un factor de risc per alguns càncers com: el càncer de mama, de colon, d'úter i de pròstata. L'alt contingut de greixos i el poc contingut de fibra a la dieta s'associen a una alta incidència de càncer de colon. Igualment passa amb l'alcohol, els greixos i l'obesitat que actuen com a promotors.

2.4.1.2 Tabac

El consum de tabac encara que s'associï amb el càncer de pulmó també pot desenvolupar casos de càncer tal com el de boca, faringe, laringe, esòfag, coll uterí, pàncrees i ronyó. Aquesta varietat de patologies és explicable tenint en compte que un cigarret conté moltes substàncies canceroses, com l'amoniac (utilitzat en productes químics), el benzopirè (que el petroli en conté), l'arsènic (mata-rates), butà (gas), cianur (utilitzat en cambres de gas), formaldehid (conservant), cadmi (que es troba a les bateries) i monòxid de carboni.

Tot i que els components del tabac no són molt perillosos, el problema es troba en les reaccions que passen dins del nostre organisme, ja que aquestes

substàncies tenen una gran capacitat d'adjuntar-se amb proteïnes, ADN i ARN. I això facilita les mutacions en la informació genètica, causant un càncer.

2.4.1.3 Agents químics industrials

Els agents químics poden actuar com a iniciadors o com a promotors. Els iniciadors són els que produeixen alteracions irreversibles a l'ADN, en canvi els promotors incrementen aquestes alteracions. Aquests agents només causen efecte quan un iniciador ha actuat prèviament i de forma repetida.

El fum del tabac és un exemple de producte químic que conté agents iniciadors i agents promotors; l'actuació dels agents promotors és tant forta que si s'elimina l'hàbit de fumar, el risc de càncer de pulmó disminueix ràpidament.

L'alcohol seria un altre important promotor, ja que si es consumeix de forma abusiva augmenta el risc de càncers que són induïts per altres gens.

Finalment els carcinògens químics també poden produir mutacions o translocacions²⁶ en els cromosomes.

2.4.1.4 Radiacions solars

No tots els agents carcinògens tenen naturalesa química. Les radiacions poden provocar canvis en l'estructura de l'ADN i induir creixement cel·lular tumoral. Es sap que l'exposició al sol és un factor de risc, donat que la llum ultravioleta té la suficient energia com per penetrar a les cèl·lules de la pell i provocar canvis genètics. La freqüència de l'aparició de tumors també pot ser deguda al grau de pigmentació de l'individu, és a dir persones amb la pell més clara tenen més probabilitats de patir mutacions. Els raigs ultravioleta no tenen suficient energia com per traspasar la pell, és a dir, no provoquen tumors a òrgans més profunds. En canvi, els raigs X que tenen molta més energia, sí que poden traspasar la pell i provocar alteracions genètiques a qualsevol òrgan.

2.4.1.5 Virus

Recentment s'han associat determinades patologies tumorals amb agents biològics, com les infeccions víriques.

Els virus són capaços d'introduir part del seu material genètic dins del material genètic de les cèl·lules de l'individu afectat, fet que s'anomena recombinació genètica. A partir d'aquest moment la informació genètica que conté els gens del virus és expressada a l'individu afectat, donant l'aparició de noves proteïnes capaces d'alterar el ritme de divisió cel·lular de les cèl·lules infectades.

2.5 Prevenció

Tot i que la investigació estigui molt avançada, encara no es sap amb exactitud les causes de molts tipus de càncer, així que l'estratègia més eficaç per controlar-lo és allunyar-se dels factors de risc, ja que d'aquesta manera podríem evitar un gran nombre de tumors malignes.

El tabac és responsable d'un 40% de tots els càncers, perquè entre un 50% i un 70% dels fumadors l'acaben desenvolupant. Aquestes dades fan pensar com pot ser que els fumadors segueixin amb aquest hàbit. Un estudi fet als Estats Units va anunciar que si tots els fumadors ho deixessin, es podrien evitar gairebé un de cada tres càncers del món, molt més del què el millor dels fàrmacs pot arribar a prometre.

Com hem dit anteriorment, un altre factor de risc important és l'exposició del sol. Protecció i moderació del sol, són la clau per evitar un gran nombre de casos de càncer sobretot en individus de pell més clara, com hem citat anteriorment. Les revisions dermatològiques periòdiques ajuden a detectar càncers a la pell.

Es creu que un de cada quatre càncers apareix per culpa dels hàbits sedentaris i l'obesitat. Molts d'aquests càncers es podrien evitar si controléssim aquests factors dietètics i si mantinguéssim un pes corporal dins dels paràmetres de la normalitat. L'exercici incrementa l'activitat del sistema immune contribuint a frenar l'aparició de tumors. Un informe fet per el WCRF (World Cancer Research Fund) i l'AICR (American Institute for Cancer Research) diu que cal menjar fruites i vegetals i reduir la ingesta de carn i greixos, de la mateixa manera reduir el consum d'alcohol.

RECOMANACIONS DE WCRF/AICR (2008)

1. Intentar mantenir el mínim greix corporal possible, dins del rang «normal» de pes corporal.
2. Incorporar l'activitat física a la rutina diària.
3. Limitar el consum d'aliments molt rics en calories i begudes ensucrades.
4. Menjar dietes basades sobretot en vegetals.
5. Limitar el consum de carn vermella i carns processades.
6. Limitar al màxim el consum d'alcohol.
7. Limitar el consum de sal.
8. No confiar en suplementes per cobrir les deficiències de la nostra dieta.

En la primera recomenació ens esmenta el terme rang <<normal>> de pes corporal. El pes corporal es calcula dividint la massa en kg entre l'altura² en metres. Aquesta operació ha de donar 18.5 - 24,99 per tal de ser considerada normal.

2.6 Diagnòstic i Tractament

2.6.1 Biòpsia

Una biòpsia és un procediment diagnòstic que consisteix en l'extirpació i examen d'una mostra de teixit del cos viu, per tal d'examinar-la al microscopi i poder-ne definir un diagnòstic precís.

2.6.2 Cirurgia

La cirurgia és una pràctica terapèutica que implica manipulació de l'interior de l'organisme a través de perforació o incisió a la pell.

És el tractament inicial per quasi tots els càncers. Consisteix en extreure qualsevol resta de càncer que queda després d'una biòpsia, juntament amb una quantitat petita de pell al voltant del tumor, generalment menys 1 cm.

2.6.3 Quimioteràpia

La quimioteràpia es basa en el tractament d'una malaltia mitjançant composts químics (fàrmacs citotòxics). L'acció principal dels agents quimioterapèutics és evitar o reduir la divisió de cèl·lules malignes.

Aquestes substàncies químiques afecten de manera desfavorable a l'organisme degut a una gran limitació que té la quimioteràpia, la seva escassa especificitat, és a dir, el fàrmac afecta també a altres cèl·lules i a teixits normals de l'organisme, sobretot si es troben en divisió activa. El mecanisme d'acció és provocar una alteració cel·lular ja sigui en la síntesi d'àcids nucleics, la divisió cel·lular o la síntesi de proteïnes.

2.6.4 Radioteràpia

La radioteràpia és un tipus de tractament oncològic que utilitza les radiacions ionitzants per a eliminar les cèl·lules tumorals. La radioteràpia actua sobre el tumor, destruint les cèl·lules malignes i impedit que creixin i es reproduïxin, ja que aquests tumors no es poden tractar de cap altra manera.

Aquesta acció també pot exercir-se sobre els teixits normals; no obstant això, els teixits tumorals són més sensibles a la radiació i no poden reparar el dany produït de forma tan eficient com ho fa el teixit normal, de manera que són destruïts bloquejant el cicle cel·lular.

2.7 Epidemiologia

Actualment a Espanya es diagnostiquen uns 162.000 casos de càncer a l'any, dels quals 25.600 corresponen a càncer de còlon, que és el tumor més freqüent. El següent tumor més reiterat és el càncer de pulmó amb un 18.800 casos nous, seguit del càncer de mama en dones amb 15.979 casos. Quan es compara la incidència de càncer a Espanya amb la d'altres països europeus, en els homes presenta una taxa superior a la mitjana de la UE, ocupant el 5è lloc. No obstant això, en dones, Espanya mostra la taxa d'incidència més baixa junt amb Grècia. Pel que fa el càncer de bufeta urinària en homes, Espanya ocupa el 1r lloc, amb taxes bastant superiors a les de la resta de països. És important constatar el creixement que està patint el càncer a Espanya. (*fig. 5 i 6*)

3. EL SISTEMA IMMUNITARI

El conjunt de cèl·lules, teixits i molècules implicades en els processos d'immunització forma l'anomenat sistema immunitari. La característica més important d'aquest sistema és la capacitat de reconèixer molècules estranyes a l'organisme, la qual cosa provoca el desencadenament d'una sèrie de processos cel·lulars i moleculars que condueixen a neutralitzar i destruir aquestes molècules estranyes.

Qualsevol molècula aliena a l'organisme és reconeguda pel sistema immunitari que té una gran importància en la defensa de l'organisme davant d'infeccions de microorganismes i davant els desordres cel·lulars com ara els tumors. Gran part d'aquesta immunitat és l'anomenada **immunitat adquirida** que no apareix fins que el cos és atacat per primera vegada per un microorganisme. Una part addicional de la immunitat es deu a processos generals en lloc de processos dirigits a microorganismes específics, aquesta s'anomena **immunitat innata**.

La immunitat adquirida és activada pels antígens³ i aquests generen una resposta que pot ser de dos tipus:

- **Immunitat cel·lular**

La immunitat cel·lular és una resposta immunitària que no implica els anticossos, sinó l'activació de macròfags¹⁸, cèl·lules NK⁽²⁾, limfòcits T citotòxics i posteriorment l'alliberament de diverses citocines¹⁰ en resposta a un antigen. Actua com a mecanisme d'atac contra els microorganismes, com els virus i alguns bacteris, capaços de sobreviure i proliferar a l'interior de les cèl·lules hoste on els anticossos no hi poden accedir. La defensa contra aquest tipus d'infecció depèn de la immunitat cel·lular que indueix la destrucció dels microorganismes residents en les cèl·lules infectades.

⁽²⁾ Les cèl·lules NK són les cèl·lules assassines naturals. Esmentades més específicament a la pàgina 20.

- **Immunitat humoral:** respostes produïdes per molècules anomenades anticossos².

La primera fase de la immunitat humoral és el reconeixement d'antígens estranys dins de l'organisme per cèl·lules B a través del seu receptor de membrana. No obstant això, malgrat la interacció amb l'antigen, la cèl·lula B no s'activa fins a ser estimulada per una línia de limfòcits T anomenats limfòcits T cooperadors.

Aquesta unió, cèl·lula B-linfòcit cooperador, estimula l'expansió clonal i la diferenciació dels limfòcits B, els quals segreguen anticossos.

3.1 Limfòcits, òrgans i vasos limfàtics.

Els dos tipus de resposta estan relacionats amb les cèl·lules sanguínies anomenades limfòcits.

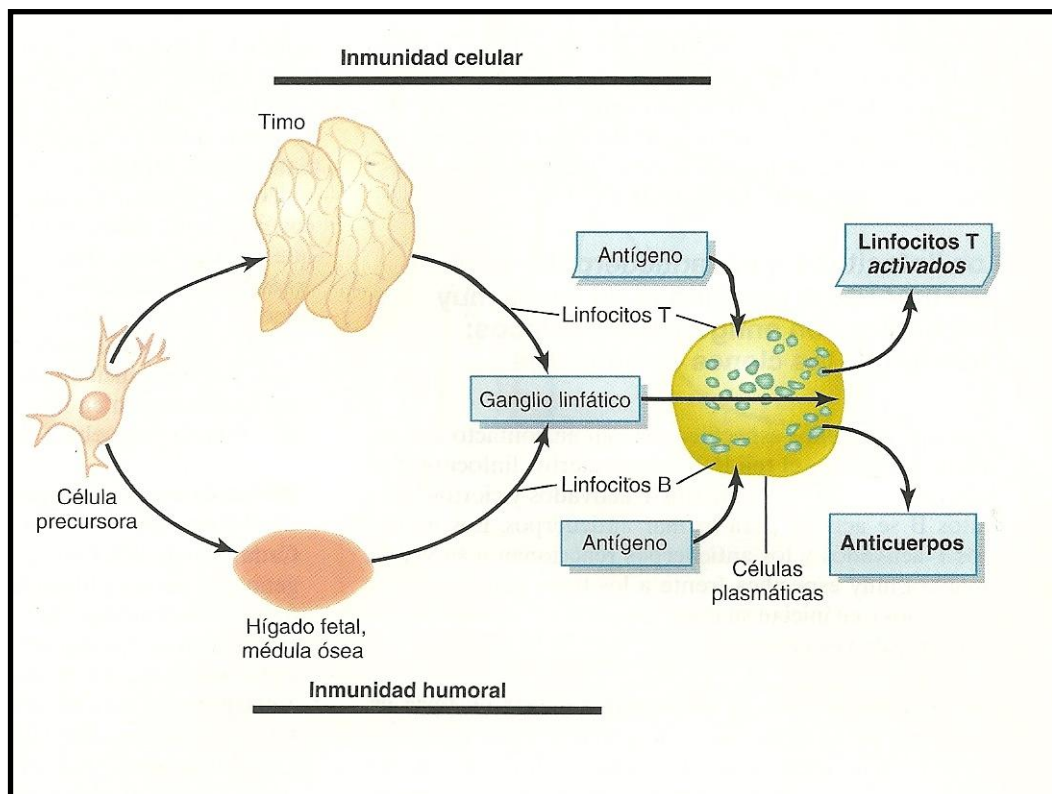
Els limfòcits (20-40% del total dels glòbuls blancs), són cèl·lules que es troben a la sang i a la limfa¹⁵. S'anomenen cèl·lules immunocompetents perquè són la base dels dos tipus d'immunitat citades anteriorment.

Procedeixen de cèl·lules mare⁷ pluripotents, ja que donen origen als eritròcits, als diferents tipus de leucòcits i a les plaquetes. Aquestes cèl·lules mare es troben a la medul·la òssia vermella dels ossos. Els limfòcits produïts per aquestes cèl·lules mare maduren en el tim o a la mateixa medul·la òssia. Hi ha dos tipus de limfòcits: (*fig.7*)

1. **Limfòcits B** (o cèl·lules B): es formen a la medul·la òssia. Són els responsables de l'anomenada immunitat humoral. Aquests limfòcits tenen anticossos a la superfície externa de la membrana plasmàtica que són capaços de reaccionar amb els antígens específics de microorganismes. S'activen a partir del contacte amb un antigen i de la unió amb limfòcits T cooperadors i es converteixen en cèl·lules plasmàtiques (més grans i amb un retícle endoplasmàtic rugós²² més desenvolupat) que s'encarreguen de produir els anticossos específics per aquell antigen.

2. Limfòcits T (o cèl·lules T): maduren al Tim²⁵ i no són capaços de produir anticossos, no obstant això, disposen de receptors capaços de reconèixer antígens de la superfície externa de les cèl·lules presentadores d'antígens⁸. Aquests receptors són macromolècules que poden reconèixer petits fragments d'antigen que estan units a proteïnes de membrana de cèl·lules normals. Un cop el limfòcit T nota la presència d'un antigen s'activa en dos formes diferents:

- ❖ Limfòcits T citotòxic: destrueixen les cèl·lules infectades per virus i bacteris amb l'alliberació de citotoxines que indueixen l'aparició de porus a la membrana plasmàtica de la cèl·lula infectada i així destrueixen els microorganismes atacants.
- ❖ Limfòcits T cooperadors: s'encarreguen d'activar els limfòcits B i d'iniciar la proliferació dels limfòcits T citotòxics per mitjà de la secreció d'unes substàncies anomenades interleucines.



Formació d'anticossos i limfòcits T activats en un gangli limfàtic en resposta a un antigen. També s'observa l'origen dels limfòcits T al Tim i dels B a la medula òssia.

Un tipus particular de cèl·lules de tipus limfòcitic són les cèl·lules assassines naturals (NK – Natural Killer). Aquestes cèl·lules es troben normalment a la sang i s'encarreguen de destruir algun tipus de cèl·lula cancerosa o infectada per virus, ho fan de manera similar les cèl·lules citotòxiques, però sempre de manera molt poc específica, ja que no tenen receptors d'antígens a la membrana.

Actualment, es desconeix com aquestes cèl·lules discriminen entre les cèl·lules normals i anormals de l'organisme i indueixen la mort (apoptosis) d'aquestes últimes.

4. LIMFOMA

4.1 El sistema Limfàtic

El sistema limfàtic inclou una xarxa de tubs que es ramifiquen a través del cos. Aquests vasos limfàtics transporten limfa, un líquid que conté els limfòcits. Al llarg d'aquesta xarxa de vasos hi ha petits òrgans anomenats ganglis limfàtics situats a les axil·les, coll, engonals, pit i abdomen. (*fig. 8 i 9*)

Els ganglis limfàtics són importants pel sistema immunitari. La limfa entra als ganglis a través d'uns vasos anomenat aferents, seguidament aquesta limfa és buidada i filtrada dins el gangli i és allà on es forma la resposta immunitària que pot ser humoral o cel·lular, és a dir, els limfòcits T s'activen i els limfòcits B segreguen anticossos. Tots aquests surten pel vas limfàtic eferent i són transportats fins a la part del cos que hi ha presència d'antígens per tal de combatre'ls. (*fig. 10*)

Els ganglis limfàtics tenen un part exterior anomenada escorça, que conté fol·licles¹³ limfoides on s'elaboren limfòcits B. Aquests fol·licles tenen una zona exterior anomenada zona del mantell on es troben aquests limfòcits B. Entre els fol·licles hi ha uns espais que són rics en limfòcits T.

L'interior del gangli s'anomena medul·la, la qual conté limfòcits B i T disposats a sortir del gangli per introduir-se als vasos limfàtics.

4.2 Definició de Limfoma

El limfoma és el terme genèric de les neoplàsies malignes dels teixits limfàtics. Són tumors sòlids i situats principalment als ganglis limfàtics, però també en regions extraganglionars.

El limfoma benigne és poc reconegut, per la qual cosa el mot limfoma és associat a limfoma maligne.

La primera manifestació clínica d'un limfoma de qualsevol tipus és l'augment no dolorós d'un gangli limfàtic, sense afectació de l'estat general ni alteracions

hemàtiques, per la qual cosa la biòpsia és l'únic mitjà per diagnosticar càncer del limfoma.

La malaltia es difon per múltiples teixits i es manifesta clínicament per febre, suor, pèrdua de pes, augment del volum del fetge i de la melsa i l'augment generalitzat dels ganglis limfàtics.

4.3 Classificació dels Limfomes

Els limfomes es poden classificar segons el seu origen cel·lular, evolució, tractament i pronòstic:

- Limfoma de Hodgkin:

La cèlula neoplàsica característica és l'anomenada cèl·lula de Sternberg-Reed. Les cèl·lules Sternberg-Reed són cèl·lules gegants malignes trobades en biòpsies de ganglis limfàtics. S'originen dels limfòcits B.

Constitueix només un 1% de totes les neoplàsies i és més freqüent en homes. Generalment hi ha una major incidència entre els 20 i els 30 anys i també a partir dels 60 anys.

És una malaltia poc coneguda, tant per la societat com pels experts.

- Limfoma no-Hodgkin:

Són neoplàsies de limfòcits B i ocasionalment de limfòcits T, excepte en la infància on els limfomes T són més freqüents.

Constitueixen del 2% al 3% de les neoplàsies, essent 4 vegades més freqüents que els limfomes de Hodgkin.

Predomina en homes de mitjana edat.

Existeixen alteracions genètiques característiques d'alguns limfomes No Hodgkins: translocació (8;14) afecta a l'onogen c-myc donant lloc a limfoma de Burkitt¹⁶, mentre que la translocació (11;14) pròpia del Limfoma del Mantell

que altera l'oncogen bcl-1, i la t(18;14) característica del Limfoma fol·licular afecta a l'oncogen bcl-2.

Es pot observar que el limfoma no-Hodgkin inclou moltes formes diferents de limfoma, cada una amb unes característiques individuals.

La incidència de limfomes no-Hodgkin s'ha incrementat considerablement en les dues últimes dècades. Aquesta malaltia ha passat de ser relativament rara a ser el cinquè càncer més freqüent als Estats Units.

5. LIMFOMA DEL MANTELL

El Limfoma de cèl·lules del Mantell és un dels càncers més rars, amb prop de 6% dels casos de no-Hodgkins, actualment amb uns 15.000 pacients al món. Predomina en homes d'avançada edat (edat mitjana 60 anys). Això és a causa de que la malaltia és difícil de tractar, amb poques possibilitats de cura ja que no va ser identificada fins els 1990s.

La investigació per trobar millors tractaments es porta a terme activament per tot el món.

La supervivència mitjana dels pacients era d'uns 3 anys, però ara s'estima que és d'uns 6 anys.

5.1 Desenvolupament del LCM dins l'organisme

El Limfoma de cèl·lules del Mantell, és el resultat d'una mutació en un limfòcit B situat a la zona del mantell d'un fol·licle.

Aquest limfòcit B pateix una translocació recíproca $t(11;14)(q13,q32)$, on es situa al proto-oncogen *CCND1*, que codifica la ciclina D1⁹ (*fig. 11*). LCM implica un trencament anormal i un desplaçament que causa que les cèl·lules es divideixin primerencament, abans d'arribar a ser capaç d'ajudar a combatre malalties. A més, aquestes cèl·lules no moren i per tant s'acumulen en el sistema limfàtic.

La causa és desconeguda i no és genètica.

El Limfoma de cèl·lules de Mantell és una neoplàsia limfoide caracteritzada per la proliferació d'una població de limfòcits B. La població cancerosa té tendència a distribuir-se per tot l'organisme i a infiltrar-se en els teixits limfoides, medul·la òssia, sang perifèrica i zones extraganglionars.

Els malalts del Limfoma del Mantell també poden tenir problemes d'hemorràgia o perforació digestiva.

5.2 Pronòstic

El Limfoma del Mantell, és un limfoma de mal pronòstic i de supervivència curta, tot i que hi ha malalts que viuen molts anys.

La gran quantitat de blasts⁵ i la hiperexpressió de la proteïna p53 és un factor desfavorable ja que provoca que el pacient tingui un pitjor pronòstic.

5.3 Tractament

5.3.1 Quimioteràpia

El tractament depèn, principalment, de l'edat. Encara que s'individualitza en cada cas. Un pacient jove és tractat amb quimioteràpia d'alta intensitat, tot i que li produeix molts efectes secundaris al ser jove ho podrà tolerar millor.

La quimioteràpia CHOP (Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina i Prednisolone) és la més utilitzada per tots els limfomes, però només aconsegueix al voltant d'un 50% de respostes.

En aquesta quimioteràpia se li afegeix Rituximab, que és un fàrmac que elimina el CD20 (ciclina D1). Afegint el Rituximab s'observa una millora en els resultats. Aquesta quimioteràpia es fa mitjançant infusió contínua (durant dies o setmanes amb una bomba portàtil)

5.3.2 Inhibidor de proteosoma (farmacoteràpia)¹²

El Bortezomib és un inhibidor de proteosoma⁽³⁾ per el tractament de pacients que han recaigut de càncer del Limfoma del Mantell o han estat resistents a altres tractaments. Els inhibidors de proteosoma afecten les rutes cel·lulars, bloquejant l'activitat de les proteïnes necessàries per el creixement i la supervivència de les cèl·lules. El Bortezomib té una alta activitat anticancerígena com agent individual, i actualment s'està estudiant en assaigs clínics en combinació amb altres fàrmacs.

⁽³⁾ Explicat a la pàgina 30 a l'apartat 6.2.2.1 Mecanisme d'acció del Bortezomib.

5.3.3 Trasplantament de cèl·lules mare

Un al·lotrasplantament és la transferència de cèl·lules mare d'una persona a una altra després d'una quimioteràpia d'altres dosis. Aquest trasplantament s'utilitza en pacients menors de 60 anys.

També existeix l'autotrasplantament de cèl·lules mare, que consisteix en un procediment que implica el cultiu de cèl·lules mare del propi pacient, amb la congelació d'aquestes i posteriorment la seva infusió. Aquest autotrasplantament es fa una vegada el pacient és sotmès a una farmacoteràpia intensiva.

- Hi ha hagut un progrés notable en el tractament del Limfoma del Mantell durant aquestes últimes tres dècades, ja que s'ha duplicat la supervivència tot i que les recaigudes segueixen essent freqüents.

La majoria dels pacients responen bé a la quimioteràpia inicial (amb o sense trasplantament de cèl·lules mare). No obstant, en la majoria dels pacients, la malaltia amb el temps progressa o regresa .

Es pot desenvolupar una resistència al tractament, la qual significa que els pacients poden respondre menys a la quimioteràpia.

La mitjana de supervivència general és d'uns quatre anys. Però els investigadors continuen buscant teràpies que allarguin la supervivència dels pacients de Limfoma del Mantell.

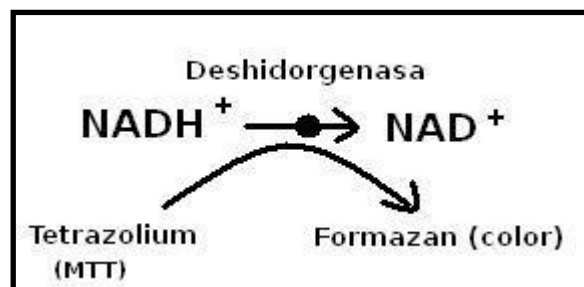
6. CONEIXEMENTS PREVIS A LA PRÀCTICA

6.1 Assaig MTT

El propòsit d'aquest mètode és el de determinar el possible efecte citotòxic d'un agent sobre línies cel·lulars tumorals.

Aquest assaig es basa en la reducció metabòlica del bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realitzat per un enzim deshidrogenasa i que finalment esdevé formazán que és de color lila.

Aquest mètode és molt utilitzat per mesurar la supervivència i la proliferació cel·lular. La quantitat de cèl·lules vives és proporcional a la quantitat de formazán produït.

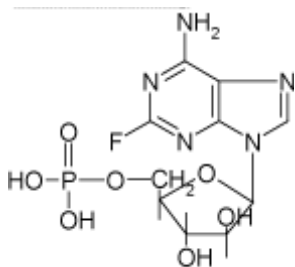


6.2 Fàrmacs

6.2.1 Fludarabina

Nom Genèric: Fludarabina

Nom Comercial: Fludara®



Estructura de la Fludarabina

6.2.1.1 Mecanisme d'acció

La Fludarabina és un agent genotòxic¹⁴ el qual afecta sobretot les cèl·lules tumorals ja que són les que més es divideixen. Aquest agent nociu el crea mitjançant l'antimetabolisme, és a dir fa malbé l'ADN i l'ARN, els quals indiquen a la cèl·lula com realitzar una còpia de si mateixa durant la divisió cel·lular. Aquest fàrmac actua sobre les cèl·lules que la seva divisió cel·lular és més ràpida, d'aquesta manera destruirà les cèl·lules tumorals i reduirà la mida del tumor. A més a més, provoca el suïcidi cel·lular també anomenat apoptosi.

6.2.1.2 Indicacions terapèutiques

És un tractament usual en pacients de leucèmia limfàtica crònica (LLC), però també és utilitzat en teràpies de rescat²⁴ per el limfoma no-Hodgkin (Limfoma del mantell) i leucèmies agudes.

6.2.1.3 Posologia

La Fludarabina s'administra per via intravenosa i la quantitat que s'ha d'administrar en el pacient depèn de molts factors com: l'altura, el pes, l'estat general de salut, altres problemes de salut i el tipus de càncer o malaltia que pateix.

També es pot administrar per via oral, que la dosi recomanada és de 40mg/m² /dia, durant 5 dies consecutius cada 28 dies. S'ha d'ingerir en dejú o amb aliments. La dosi s'ajusta individualment segons la toxicitat hematològica.

6.2.1.4 Reaccions adverses

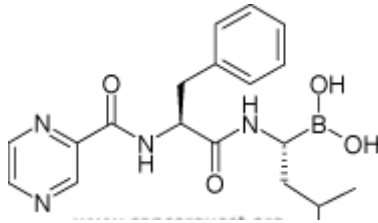
És un fàrmac que s'utilitza en quimioteràpia i provoca efectes secundaris en el pacient. Els principals són:

1. Forta disminució de la medul·la òssia.
2. Febre i calfreds.
3. Fatiga.
4. Infeccions (com l'herpes, infecció micòtica o fongs) degut a la supressió de la medul·la òssia no permet la producció de glòbuls blancs, glòbuls vermells i plaquetes, així doncs afecta el funcionament del sistema immunitari. Normalment s'administren antibiòtics per prevenir aquestes infeccions.
5. Nàusees i vòmits.
6. Debilitat.
7. Pot afectar la fertilitat i en el cas d'estar embarassada durant el tractament pot afectar el fetus.
8. Quan es destrueixen grans quantitats de cèl·lules canceroses ràpidament degut al tractament, aquestes alliberen àcid úric, potassi i fòsfor en els vasos sanguinis que pot produir insuficiència renal. Aquest síndrome s'anomena *Síndrome de lisis tumoral*.

6.2.2 Bortezomib

Nom Genèric: Bortezomib

Nom Comercial: Valcade TM



Estructura del Bortezomib

6.2.2.1 Mecanisme d'acció

El Bortezomib és un medicament utilitzat en tractament de mieloma múltiple i Limfoma del Mantell.

Destruïx la cèl·lula tumoral inhibint el sistema del proteosoma 26S. Aquest sistema és el que s'encarrega de degradar les proteïnes danyades o innecessàries. La degradació protosòmica és essencial en el cicle cel·lular i la regulació de l'expressió gènica, per tant a curt termini el Bortezomib provoca apoptosi a les cèl·lules tumorals.

6.2.2.2 Indicacions terapèutiques

Aquest fàrmac pot ser utilitzat en pacients que pateixen mieloma múltiple i no se'ls ha pogut realitzar un trasplantament de medul·la, o bé en pacients que han estat sotmesos a dues teràpies prèvies i hi ha hagut una evolució.

6.2.2.3 Posologia

El Bortezomib s'administra per via intravenosa. La dosi inicial és de 1,3 mg/m² de 3-5 segons a través d'un catèter central (vena jugular o femoral) o perifèric (extremitats superiors) durant dues setmanes (dies 1,4,8 i 11) amb un descans de 10 dies (dies 12-21).

6.2.2.4 Reaccions adverses

Aquest fàrmac s'utilitza en la quimioteràpia dirigida²⁰ i causa els efectes secundaris habituals de la quimioteràpia com fatiga, febre i calfreds, nàusees i vòmits, debilitat, diarrea,...

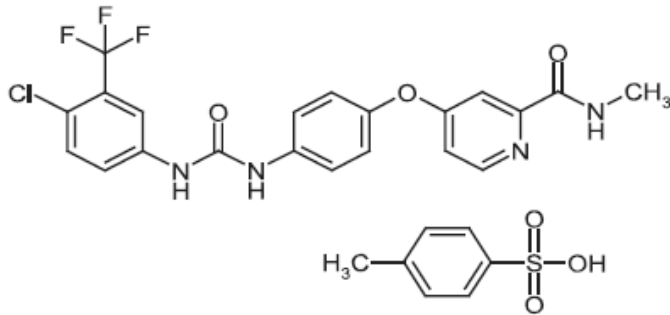
Però hi ha efectes secundaris més específics, ja que aquest fàrmac interromp la divisió cel·lular de les cèl·lules que es divideixen més ràpid, aquest és el cas de les cèl·lules sanguínies (els eritròcits, els leucòcits i les plaquetes). Els símptomes que provoca aquest descens de cèl·lules sanguínies són:

1. **Mielosupressió:** Disminució de la producció de cèl·lules sanguínies i descens d'aquestes cèl·lules.
2. **Anèmia:** Disminució del nombre de glòbuls vermells.
3. **Trombocitopènia:** Disminució del nombre de plaquetes
4. **Leucopènia:** Disminució del nombre de glòbuls blancs.

6.2.3 Sorafenib

Nom Genèric: Sorafenib

Nom comercial: Nexavar ®



Estructura del Sorafenib

6.2.3.1. Mecanisme d'acció

Una de les característiques de les cèl·lules tumorals és la de dividir-se sense que hi hagi un agent extern com els factors de creixement¹¹. Normalment aquests factors són emesos per altres cèl·lules i s'uneixen als receptors situats a la superfície cel·lular i així provoquen que la cèl·lula es divideixi. La divisió de les cèl·lules canceroses amb absència de factors de creixement és deguda a una mutació del gen d'una quinasa²¹. Un clar exemple es pot trobar en la leucèmia crònica mieloide, on hi ha una translocació dels cromosomes 9 i 22 que s'anomena cromosoma Philadelphia, aquesta translocació crea una nova quinasa que es troba sempre activa i això permet una proliferació constant. El Sorafenib inhibeix aquestes quinases i així redueix la proliferació tumoral.

6.2.3.2 Indicacions terapèutiques

S'utilitza en tumors sòlids com és el cas del càncer de fetge i de ronyó, però actualment s'està provant també en leucèmies i limfomes.

6.2.3.3 Posologia

El Sorafenib coincidint amb al Bortezomib és un fàrmac que es dona en teràpia dirigida ja que també redueix la proliferació cel·lular.

Aquest medicament s'administra en forma de pastilla per via oral en dosis de 400mg i s'ha de prendre entre 1 o 2 hores abans o després dels àpats. Continuar el tractament mentre s'observi un benefici clínic o fins que es produeixi toxicitat inacceptable.

6.3.2.4 Reaccions adverses

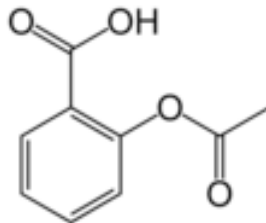
Els efectes secundaris més freqüents que produeix aquest fàrmac són els següents:

1. Irritació i inflamació de la pell
2. Síndrome de peus i mans que consisteix en erupcions, inflamació, envermelliment, dolor i caiguda de la pell dels palmells de les mans o de les plantes dels peus
3. Diarrea
4. Fatiga
5. Caiguda del cabell

6.2.4 Aspirina

Nom genèric: àcid 2-(acetiloxi)benzoic

Nom comercial: Aspirina®



Estructura de l'Aspirina

6.2.4.1 Mecanisme d'acció

L'Aspirina és un analgèsic, antipirètic i antiinflamatori a curt termini, és a dir que calma el dolor, redueix la febre i la inflamació.

El nostre organisme, que està format per cèl·lules, al rebre un estímul (un cop, una postura incorrecta o un excés d'estrès) desencadena una reacció a les cèl·lules del nostre cos. Aquesta reacció a vegades desemboca la formació de prostaglandines, substàncies que potencien el dolor i també la febre. Per reduir aquests símptomes l'aspirina actua impedit la formació de prostaglandines a través de l'àcid acetilsalicílic.

6.2.4.2 Història

L'any 400 aC Hipòcrates utilitzava l'escorça de l'arbre anomenat salze blanc per alleugerir el dolor, que conté la salicina que té propietats antitèrmiques, analgèsiques i antireumàtiques.

El segle XIX el químic francès Charles-Frédéric Gerhardt va descobrir les propietats de l'àcid acetilsalicílic quan estava treballant en la modificació de l'estructura de les plantes. Finalment va aconseguir crear la fórmula original del fàrmac, tot i que ell mai va està interessat en les virtuts terapèutiques del seu descobriment.

Els seu principal component és l'àcid acetilsalicílic que va ser sintetitzat per Fèlix Hoffman l'any 1897. Ho va aconseguir tractant l'àcid salicílic amb anhídrid acètic, amb presència d'una mica d'àcid sulfúric que actua com a catalitzador.

6.2.4.3 Posologia

La dosi en adults és de 500mg cada 4 a 6 hores. S'administra quan apareixen els símptomes de dolor o febre en el pacient, i cal suspendre'ls quan aquests desapareixen.

Si el dolor es manté durant més de 5 dies, la febre en dura més de 3 o si els símptomes empitjoren o n'apareixen d'altres, cal interrompre el tractament i consultar el metge.

6.2.4.4 Reaccions adverses

L'Aspirina com qualsevol altre medicament pot causar efectes secundaris. Que són els següents:

- Dolor estomacal o abdominal
- Nàusees i vòmits
- Diarrea
- Pèrdua d'oïda i vertigens
- Reacció al·lèrgica amb pacients amb urticària crònica o asma.
- Disminució del flux renal
- Reaccions dermatològiques

7. EXPERIÈNCIA PRÀCTICA

7.1 Objectiu

A partir de quatre fàrmacs diferents (Fludarabina, Bortezomib, Sorafenib i Aspirina), observar quins d'ells tenen un efecte citotòxic més elevat en cèl·lules d'un malalt de Limfoma del Mantell i que per tant, provoquin l'apoptosi o bé que les cèl·lules cancerígenes deixin de proliferar.

7.2 Hipòtesi

Els fàrmacs Fludarabina, Bortezomib i Sorafenib tindran un efecte citotòxic sobre les cèl·lules d'un malalt de Limfoma del Mantell.

L'Aspirina en canvi, no tindrà cap efecte sobre aquestes cèl·lules.

7.3 Variables independent i dependent

Variable independent: diferents quantitats de cada fàrmac

Variable dependent: quantitat de cèl·lules vives després d'aplicar-li els diferents fàrmacs.

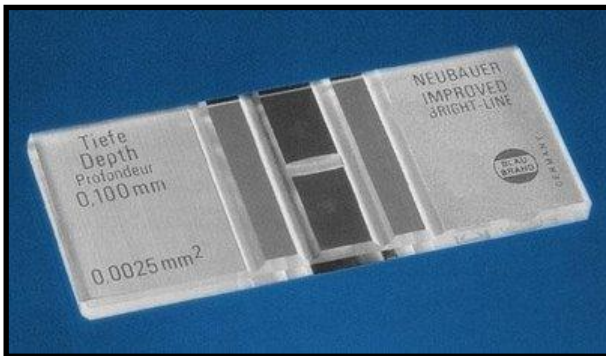
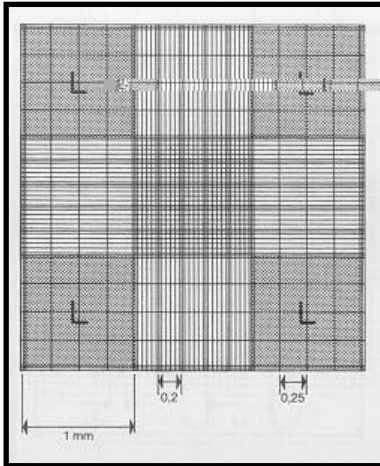
7.4 Material

- **Cambra de Neubauer**

La cambra de Neubauer, s'utilitza com a tècnica de comptatge de cèl·lules. Es tracta d'un portaobjectes amb una depressió al centre, en la qual hi ha una quadricula marcada. És un quadrat de 3 x 3mm, amb una separació entre les línies de 0.25mm. L'àrea marcada correspon a 1 mm². Aquesta part de portaobjectes està enfonsada 0.1mm, de forma que al posar un cobreobjectes el volum comprès és de 0.1mm³ (0.1µl).

Pel seu ús només cal col·locar una mostra de cèl·lules, tapar-ho amb un cobreobjectes i ja es pot procedir al comptatge amb l'ajuda d'un microscopi.

Només cal comptar el número de cèl·lules en aquest quadrat i aquest serà el número de cèl·lules en 1mm^3 .



- **Campana de flux laminar**

La campana de flux laminar és una cavitat mantinguda en condicions estèrils gràcies a l'establiment d'una pressió d'aire net cap a l'exterior de manera que les manipulacions que es fan al seu interior són del tot estèrils, això s'aconsegueix gràcies a que l'aire es fa passar prèviament per un filtre de $0,5\ \mu\text{m}$ de diàmetre de porus.



- **Centrífuga**

És una màquina destinada a fer centrifugacions. Té un o més recipients cilíndrics, que gira sobre un eix vertical o horitzontal. Gràcies a la força de centrifugació s'accelera la sedimentació, separant la part més densa en el fons, de la menys densa.

A l'hora d'usar-la s'ha d'equilibrar, és a dir que s'han de posar les mostres simètricament i amb el mateix volum.



- **Cultiu cel·lular**

Un cultiu o línia cel·lular és un mètode mitjançant el qual les cèl·lules poden viure i desenvolupar-se fora de l'organisme sense perdre les característiques bioquímiques, fisiològiques i genètiques. Aquest es troba en un medi de cultiu apropiat, el qual generalment està constituït per glúcids simples com la glucosa, proteïnes i sals minerals inorgàniques que aporten sofre, fòsfor, magnesi, clor, sodi, potassi i calci. Així doncs, les cèl·lules s'han adaptat per créixer contínuament en laboratoris i s'utilitzen en la investigació.

En el nostre treball hem utilitzat dues línies cel·lulars diferents de cèl·lules de Limfoma del Mantell que presenten translocació t(11;14) anomenades: **Z138** i **JEKO**. Pel que fa a les diferències entre aquestes línies, tot i ser les dues derivades de malalts de Limfoma del Mantell, cada una té les seves particularitats genètiques. El gen p53, que juga un paper molt important en molts càncers, en el JEKO està mutat i en canvi en el Z138 no.

- **Eppendorfs**

Els eppendorfs també anomenats tubs de microcentrífuga són uns tubs petits cilíndrics de plàstic amb un fons acabat en forma de con que són coberts per un tap. S'utilitzen per l'emmagatzematge de substàncies químiques.



- **Espectrofotòmetre**

L'espectrofotòmetre és un instrument que té la capacitat de projectar un feix de llum monocromàtica a través d'una mostra i mesurar la quantitat de llum que és absorbida per aquesta mostra. Això li permet a l'operador realitzar dues funcions:

1. Donar informació sobre la naturalesa de la substància de la mostra.
2. Indicar indirectament quina quantitat de la substància que ens interessa està present en la mostra.



- **Flascons de cultiu**

Són unes ampolles de coll estret, fetes de plàstic, vidre, metall o porcellana. Aquest flascó ajuda al creixement de cèl·lules gràcies a uns foradets situats al tap que permeten la respiració d'aquestes.



- **Incubador**

Aparell que permet mantenir les cèl·lules en unes condicions òptimes (atmosfera humida, temperatura de 37°C i 5% de CO₂) per el seu desenvolupament.

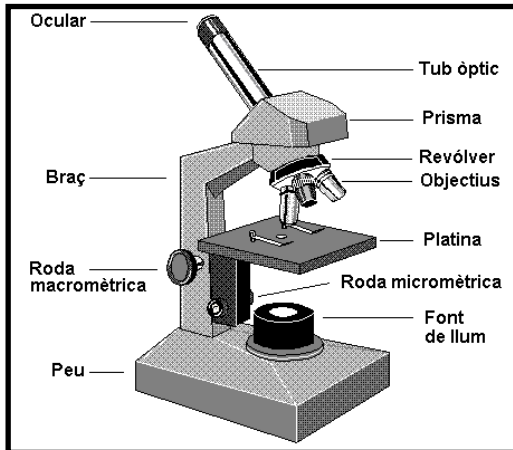


- **Medi**

Les cèl·lules necessiten nutrients específics per créixer in vitro. Aquests nutrients son aportats pel medi de cultiu. El medi conté aminoàcids, vitamines, ions i aigua. Les cèl·lules necessiten sèrum per multiplicar-se així doncs el medi també conte un 5% de sèrum fetal boví. En el medi també se li afegeix L-glutamina i antibiòtics com la penicil·lina.

• Microscopi

El microscopi és un instrument òptic que està dotat per una o més lents, oculars i objectius gràcies a les quals s'augmenta la grandària de la imatge d'un objecte i el fa visible o bé observable en detall.



• Pipetes

Una pipeta és un tub calibrat per a mesurar volums fixes o variables.

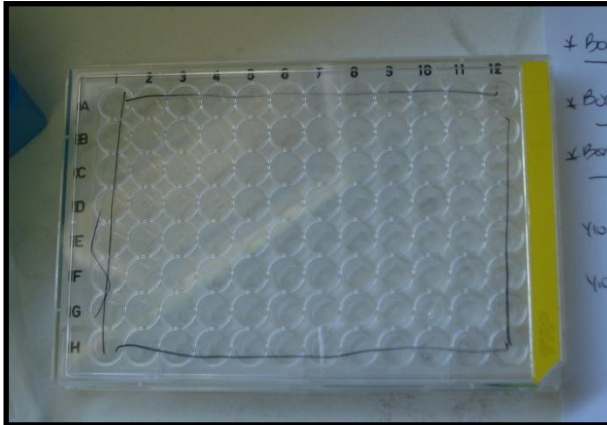
En el nostre treball farem servir una pipeta molt precisa ja que mesurem volums molt petits.

Per usar-la només has d'indicar la mesura desitjada amb una rodeta que hi ha a la part superior, seguidament s'hi ha de posar una punta cònica on s'hi emmagatzemarà la substància. Tot seguit, s'ha de prémer la rodeta que és l'encarregada de pipar el líquid i finalment dipositar-ho a la cavitat desitjada.



- **Placa**

És un recipient que conté 96 pouets, utilitzats per desenvolupar experiments. Per formular l'experiment s'ha d'introduir a cada pouet una determinada quantitat de cèl·lules i seguidament aplicar-hi també diferents quantitats de cada fàrmac.



7.5 Procediment

Primerament s'agafa de l'incubador (el qual està en unes condicions òptimes per les cèl·lules que són: 37 °C i 5% de CO₂) dos flascons de cultiu. Cada una d'elles conté una línia cel·lular diferent de cèl·lules extretes d'un pacient malalt de Limfoma del Mantell, anomenades Z-138 i JEKO.

Seguidament es dissenya la placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

La placa conté 96 pouets. S'agafa una mostra de 0.5µl de cèl·lules de cada un dels cultius i s'introdueixen a la cambra de Neubauer per fer un comptatge del nombre de cèl·lules que hi ha per 0.1µl. Per poder fer el recompte es posa la cambra en un microscopi òptic a 100x.

Primer es compten les cèl·lules del Z-138 en tres de les quatre àrees de comptatge i el resultat és:

- ❖ Comptatge àrea 1 → 68 cèl·lules
- ❖ Comptatge àrea 2 → 80 cèl·lules
- ❖ Comptatge àrea 3 → 95 cèl·lules

Per tant la mitjana dona:

$$\frac{68 + 80 + 95}{3} = 81 \text{ cèl·lules}$$

$$\frac{81 \text{ cèl·lules}}{0.1 \mu\text{l}} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} = 0.81 \times 10^6 \text{ cèl·lules / ml}$$

$$81 \text{ cèl·lules} / 0.1 \mu\text{l} \rightarrow \boxed{0.81 \times 10^6 \text{ cèl·lules/ml}}$$

Després també es compten les del JEKO i donen:

$$\text{❖ Comptatge àrea 1} \rightarrow \boxed{51 \text{ cèl·lules}}$$

$$\text{❖ Comptatge àrea 2} \rightarrow \boxed{61 \text{ cèl·lules}}$$

$$\text{❖ Comptatge àrea 3} \rightarrow \boxed{44 \text{ cèl·lules}}$$

El resultat al fer la mitjana és de:

$$\frac{51 + 61 + 44}{3} = 52 \text{ cèl·lules}$$

$$\frac{52 \text{ cèl·lules}}{0.1 \mu\text{l}} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} = 0.52 \times 10^6 \text{ cèl·lules / ml}$$

$$52 \text{ cèl·lules} / 0.1 \mu\text{l} \rightarrow \boxed{0.52 \times 10^6 \text{ cèl·lules/ml}}$$

En total s'utilitzen 54 pouets i com que hi ha d'haver 50000 cèl·lules/pouet es necessiten:

$$\text{Total} = 54 \text{ pouets} \times \frac{50000 \text{ cèl·lules}}{1 \text{ pouet}} = \boxed{2.7 \text{ milions de cèl·lules}}$$

Però per qualsevol imprevist s'agafen 4 milions de cèl·lules.

Posteriorment s'ha de calcular la quantitat de solució de cèl·lules que cal agafar per tal de tenir-ne 4 milions:

$$- 4 \times 10^6 \text{ cèl·lules} \times \frac{1 \text{ ml}}{0.81 \times 10^6 \text{ cèl·lules}} = 5 \text{ ml}$$

$$\text{Com que tenim } \boxed{0.81 \times 10^6 \text{ cèl·lules/ml}} \rightarrow 5 \text{ ml (Z-138)}$$

$$- 4 \times 10^6 \text{ cèl·lules} \times \frac{1 \text{ ml}}{0.52 \times 10^6 \text{ cèl·lules}} = 7.7 \text{ ml}$$

$$\text{I com que tenim } \boxed{0.52 \times 10^6 \text{ cèl·lules/ml}} \rightarrow 7.7 \text{ ml (JEKO)}$$

Per poder introduir a la centrífuga cal equilibrar les dues dissolucions, en la de 5ml s'han d'afegir 2.7 ml de medi per equilibra-ho fins a 7.7ml, d'aquesta manera les cèl·lules precipitaran i tot seguit només caldrà decantar-les.

S'agafen les cèl·lules decantades i es posa cada línia cel·lular a un eppendorf diferent.

Per tenir un nombre estimat de la dosi letal 50 (LD50 - concentració de medicament que mata el 50% de cèl·lules) s'agafa per cada fàrmac un rang de dosi fisiològic, equiparable a les concentracions que es donen al tractar els malalts.

Per buscar el volum inicial que s'ha d'agafar de l'stock de medicament per tal d'aconseguir un volum final desitjat (en el nostre cas 100 μ l) s'utilitza la següent formula:

$$\text{Volum inicial} \times \text{concentració inicial} = \text{Volum final} \times \text{concentració final}$$

Per tant, a l'hora de calcular el volum inicial que cal agafar per tal de tenir la concentració desitjada, s'ha de fer l'operació següent:

$$volum_i = \frac{volum_f \times concentració_f}{concentració_i}$$

Fludarabina:

Per aquest fàrmac s'agafen dosis de 1 - 2.5 - 5 - 10 $\mu\text{g/ml}$

La fludarabina està en stock amb una concentració de: 25mg/ml

Volum final = 100 μl

La concentració inicial és de 25mg/ml i cal canviar les unitats a $\mu\text{g/ml}$:

$$\frac{25\text{mg}}{\text{ml}} \times \frac{1000\mu\text{g}}{1\text{mg}} = 25000\mu\text{g/ml}$$

- Fludarabina 1 $\mu\text{g/ml}$: $v_i = \frac{100\mu\text{l} \times 1\mu\text{g/ml}}{25000\mu\text{g/ml}} = 0.004\mu\text{l}$
→ dilució de 4 μl 1/1000
- Fludarabina 2.5 $\mu\text{g/ml}$: $v_i = \frac{100\mu\text{l} \times 2.5\mu\text{g/ml}}{25000\mu\text{g/ml}} = 0.01\mu\text{l}$
→ dilució de 1 μl 1/100
- Fludarabina 5 $\mu\text{g/ml}$: $v_i = \frac{100 \times 5}{25000} = 0.02\mu\text{l}$
→ dilució de 2 μl 1/100
- Fludarabina 10 $\mu\text{g/ml}$: $v_i = \frac{100 \times 10}{25000} = 0.1\mu\text{l}$
→ dilució de 1 μl 1/10

El procés de dilució d'aquest fàrmac és el següent:

- 1/10: 10 μl de fludarabina + 90 μl de medi
- 1/100: 1 μl de fludarabina + 99 μl de medi
- 1/1000: 10 μl de dilució 1/100 + 90 μl de medi

Bortezomib:

Per aquest fàrmac s'agafen dosis de 5 - 10 - 15 - 20 nM

El bortezomib està en stock amb una concentració de: 1mM

Volum final = 100 μ l

La concentració inicial és de 1mM i cal canviar les unitats a nM:

$$1mM \times \frac{10^6 nM}{1mM} = 10^6 nM$$

- Bortezomib 5nM: $v_i = \frac{100\mu l \times 5nM}{1000000nM} = 0.0005\mu l$
→ dilució de 5 μ l 1/10000
- Bortezomib 10nM: $v_i = \frac{100\mu l \times 10nM}{1000000nM} = 0.001 \mu l$
→ dilució de 1 μ l 1/1000
- Bortezomib 15nM: $v_i = \frac{100 \times 15}{1000000} = 0.0015 \mu l$
→ dilució de 1.5 μ l 1/1000
- Bortezomib 20nM: $v_i = \frac{100 \times 20}{1000000} = 0.002 \mu l$
→ dilució de 2 μ l 1/1000

El procés de dilució d'aquest fàrmac és el següent:

- 1/100: 1 μ l de bortezomib + 99 μ l de medi
- 1/1000: 10 μ l de dilució 1/100 + 90 μ l de medi
- 1/10000: 10 μ l de dilució 1/1000 + 90 μ l de medi

Sorafenib:

Per aquest fàrmac s'agafen dosis de 2.5 - 5 - 7.5 - 10 μM

El sorafenib està en stock amb una concentració de: 10mM

Volum final = 100 μl

La concentració inicial és de 10mM i cal canviar les unitats a μM

$$10\text{mM} \times \frac{1000\mu\text{M}}{1\text{mM}} = 10000\mu\text{M}$$

- Sorafenib 2.5 μM : $v_i = \frac{100\mu\text{l} \times 2.5\mu\text{M}}{10000\mu\text{M}} = 0.025 \mu\text{l}$

→ dilució de 2.5 μl 1/100

- Sorafenib 5 μM : $v_i = \frac{100\mu\text{l} \times 5\mu\text{M}}{10000\mu\text{M}} = 0.05 \mu\text{l}$

→ dilució de 5 μl 1/100

- Sorafenib 7.5 μM : $v_i = \frac{100 \times 7.5}{10000} = 0.075 \mu\text{l}$

→ dilució de 7.5 μl 1/100

- Sorafenib 10 μM : $v_i = \frac{100 \times 10}{10000} = 0.1 \mu\text{l}$

→ dilució de 1 μl 1/10

El procés de dilució del sorafenib és el següent:

- 1/10: 10 μl de sorafenib + 99 μl de medi
- 1/100: 1 μl de sorafenib + 99 μl medi

Aspirina:

L'aspirina efervescent es fabrica en un stock de 400mg que es dissol en 40ml, és a dir, 10mg/ml. S'agafen dosis de 1, 2.5,5 i 10µg/ml.

Volum final = 100 µl

La concentració inicial és de 10mg/ml i cal canviar les unitats a µg/ml

$$\frac{10mg}{ml} \times \frac{1000\mu g}{1mg} = 10000\mu g / ml$$

- Aspirina 1 µg/ml: $v_i = \frac{100\mu l \times 1\mu g / ml}{10000\mu g / ml} = 0.01 \mu l$

→ dilució de 1 µl 1/100

- Aspirina 2.5 µg/ml: $v_i = \frac{100\mu l \times 2.5\mu g / ml}{10000\mu g / ml} = 0.025 \mu l$

→ dilució de 2.5 µl 1/100

- Aspirina 5 µg/ml: $v_i = \frac{100 \times 5}{10000} = 0.05 \mu l$

→ dilució de 5 µl 1/100

- Aspirina 10 µg/ml: $v_i = \frac{100 \times 10}{10000} = 0.1 \mu l$

→ dilució de 10 µl 1/100

El procés de dilució de l'aspirina és el següent:

- 1/100: 1µl d'aspirina + 99 µl d'aigua destil·lada

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	BL	CT	FLU 1	FLU 2.5	FLU 5	FLU 10	BTZ 5	BTZ 10	BTZ 15	BTZ 20		
C	BL	CT	FLU 1	FLU 2.5	FLU 5	FLU 10	BTZ 5	BTZ 10	BTZ 15	BTZ 20		
D	BL	CT	FLU 1	FLU 2.5	FLU 5	FLU 10	BTZ 5	BTZ 10	BTZ 15	BTZ 20		
E			SF 2.5	SF 5	SF 7.5	SF 10	ASP 1	ASP 2.5	ASP 5	ASP 10		
F			SF 2.5	SF 5	SF 7.5	SF 10	ASP 1	ASP 2.5	ASP 5	ASP 10		
G			SF 2.5	SF 5	SF 7.5	SF 10	ASP 1	ASP 2.5	ASP 5	ASP 10		
H												

Tots els processos següents es realitzen dins la campana de flux laminar per tal de mantenir unes condicions estèrils.

A tots els pouets on hi aplicarem medicament se'ls hi ha de posar 100µl de cèl·lules de les que hem preparat anteriorment, ho farem utilitzant una pipeta de 100µl. També se n'hi ha de posar en els pouets de control (CT) per veure el desenvolupament que farien sense medicament i poder comparar-les. En els pouets de les bandes hi anirà medi per homogenitzar les condicions de tots els pouets.

Un cop tenim totes les cèl·lules a tots als pouets s'hi aplica la quantitat desitjada de medicament utilitzant una pipeta, a cada pouet s'haurà d'anar canviant de punta perquè es podrien barrejar els medicaments.

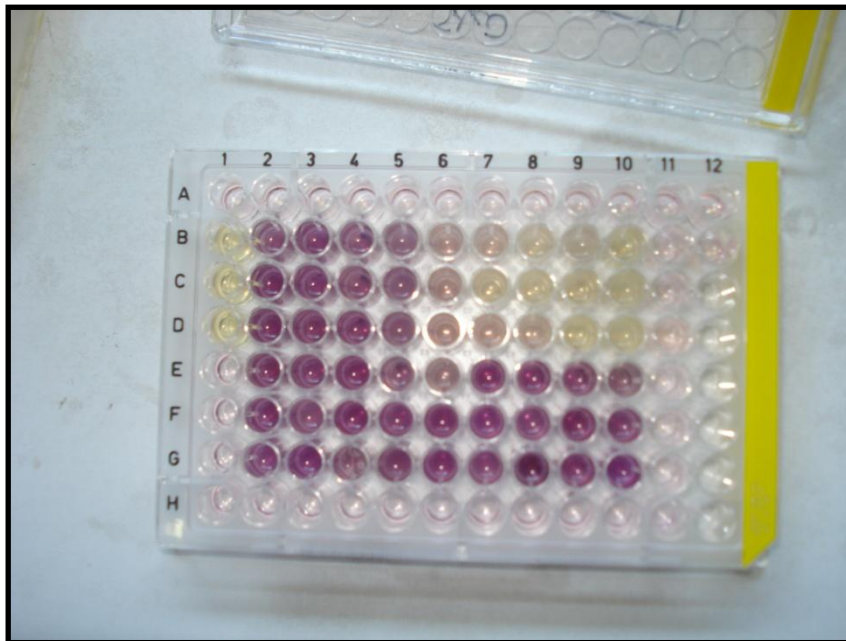
Un cop plens tots els pouets es tapa la placa i es guarda a l'incubador durant un dia.

Al següent dia, s'agafen les plaques de l'incubador i s'observen amb el microscopi. A l'observar ens adonem que hi ha pouets on les cèl·lules brillaven, aquests pouets van resultar ser els de l'aspirina, ja que el fàrmac no havia matat cèl·lules, i també els dels pouets control sense fàrmac

Seguidament es comença l'assaig de proliferació MTT.

El propòsit d'utilitzar aquest mètode és determinar el possible efecte citotòxic d'un agent sobre línies cel·lulars tumorals.

En stock tenim 5mg/ml de reactiu MTT, per un bon funcionament de l'assaig es fica 10 μ l de MTT per pouet i també igual que abans es canvia la punta de la pipeta cada vegada perquè no es barregin els medicaments. En acabat es posen les cèl·lules a l'incubador, unes tres hores, fins que es puguin veure cristalls de color lila.



A la placa es pot observar que els pouets amb més color lila són els que contenen cèl·lules més vives, és a dir els que els fàrmacs han tingut menys efecte citotòxic.

Tres hores després es solubilitzen i es llisten les plaques amb 100 μ l d'una dissolució d'Isopropanol 24 : Hcl (1M) 1 per pouet.

Finalment amb l'espectrofotòmetre es llegeixen les plaques per poder donar el valor del LD50 (dosi letal del 50% de cèl·lules).

Tot seguit adjuntem les taules de l'espectrofotòmetre.

Resultats JEKO**Resultats espectrofotòmetre JEKO**

Model 680 Microplate Reader S/N 21196

Raw data report

15/07/2010 13:15:56

Lab. Name: APOPTOSIS

Kit name: MTT

Reading mode: Dual

Measurement Filter: 570nm(5)

Reference Filter: 655(4)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.089	0.082	0.08	0.077	0.076	0.073	0.067	0.065	0.061	0.063	0.053	0.063
B	0.097	0.648	0.773	0.641	0.592	0.293	0.229	0.173	0.282	0.114	0.054	0.056
C	0.107	0.896	0.745	0.645	0.598	0.288	0.163	0.157	0.143	0.17	0.055	0
D	0.098	0.877	0.754	0.731	0.598	0.307	0.277	0.199	0.135	0.223	0.093	-0.002
E	0.091	0.815	0.683	0.823	0.235	0.15	0.881	0.758	0.705	0.336	0.047	-0.003
F	0.089	0.84	1.66	0.856	0.779	0.881	0.745	0.598	0.834	0.753	0.052	-0.002
G	0.095	0.719	0.866	0.163	0.514	0.816	0.666	0.478	0.746	0.857	0.057	0
H	0.081	0.076	0.076	0.071	0.07	0.06	0.066	0.069	0.06	0.06	0.049	0.001

Resultats Z-138

Resultats espectrofotòmetre Z-138

Model 680 Microplate Reader S/N 21196

Raw data report

15/07/2010 13:16:31

Lab. Name: APOPTOSIS

Kit name: MTT

Reading mode: Dual

Measurement Filter: 570nm(5)

Reference Filter: 655(4)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1	0,09	0,09	0,085	0,045	0,014	0,05	0,187	0,043	0,036	0,003	-0,013
B	0,082	0,329	0,46	0,421	0,278	0,296	0,223	0,06	0,049	0,039	0,057	-0,005
C	0,111	0,451	0,438	0,303	0,196	0,239	0,31	0,335	0,159	0,081	0,049	-0,003
D	0,103	0,157	0,254	0,333	0,264	0,247	0,343	0,288	0,147	0,112	0,049	-0,007
E	0,107	0,432	0,486	0,302	0,359	0,311	0,489	0,199	0,202	0,429	0,037	-0,011
F	0,098	0,713	0,185	0,161	0,382	0,084	-0,022	0,325	0,47	0,367	0,039	-0,012
G	0,104	0,505	0,562	0,378	0,156	0,323	0,382	0,283	0,351	0,452	0,041	-0,01
H	0,074	0,074	0,073	0,07	0,066	0,065	0,058	0,065	0,058	0,056	0,052	-0,001

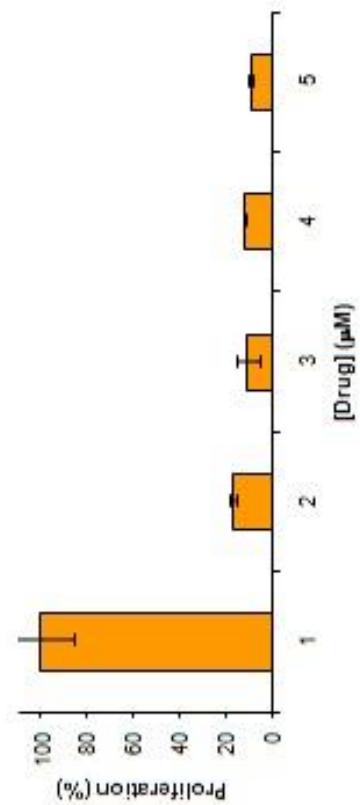
7.6 Resultats

Bortezomib JEKO

JEKO BORTEZOMIB									
% proliferation									
[Drug] (nM)	Control	5	10	15	20				
Blanc	0,097	0,648	0,229	0,173	0,282	0,114			
	0,107	0,896	0,163	0,157	0,143	0,170			
	0,098	0,877	0,277	0,199	0,135	0,223			
MITJANA	0,101	0,807	0,223	0,176	0,187	0,169	#DIV/0!	#DIV/0!	
SD*100	0,551	13,803	5,724	2,120	8,266	5,451	#DIV/0!	#DIV/0!	

[Drug] (nM)	log10 [Drug]	% proliferation	% prolif respecte ct
0	#NUM!	0,706	100
5	0,698870004	0,122	17,32
10	1	0,076	10,71
15	1,176091259	0,086	12,18
20	1,301029996	0,068	9,67
	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!
	#NUM!	#REF!	#REF!

% prolif respecte ct



A	24,49
B	-11,51
R2	0,78

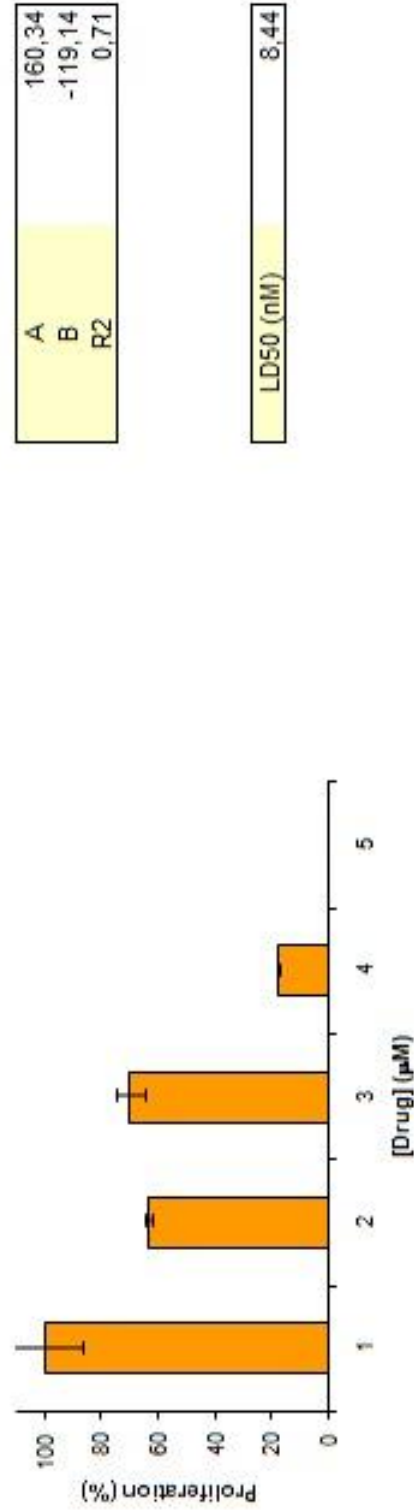
IC50 (nM)	0,01
-----------	------

Bortezomib Z-138

Z138 BORTEZOMIB

% proliferation		[Drug] (nM)				
	Blanc	Control	5	10	15	20
	0,082	0,329	0,223			0,039
	0,111	0,451	0,310	0,335	0,159	0,081
	0,103	0,432	0,343	0,288	0,147	0,112
MITJANA	0,099	0,404	0,292	0,312	0,153	0,077
SD*100	1,498	6,564	6,199	3,323	0,849	3,664

[Drug] (nM)	log10 [Drug]	% proliferation	% prolif respecte ct
0	#NUM!	0,305	100
5	0,6988970004	0,193	63,32
10	1	0,213	69,71
15	1,176091259	0,054	17,79
20	1,301029986	-0,021	-6,99
	#NUM!	#REF!	#REF!
	#NUM!	#REF!	#REF!

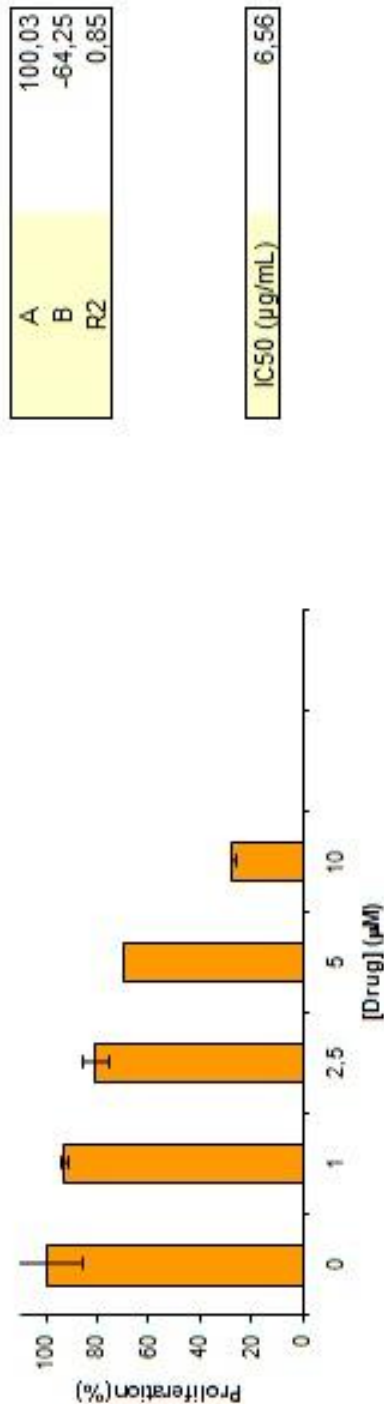


Fludarabina JEKO

JEKO FLUDARABINA

% proliferation		% proliferation				
[Drug] (µg/ml)	Control	1	2,5	5	10	
Blanc						
	0,097	0,648	0,773	0,641	0,293	
	0,107	0,896	0,745	0,598	0,288	
	0,098	0,877	0,754	0,598	0,307	
MITJANA	0,101	0,807	0,757	0,596	0,296	
SD*100	0,551	13,803	1,429	0,346	0,985	
					#DIV/0!	
					#DIV/0!	

[Drug] (µg/ml)	log10 [Drug]	% proliferation	% prolif respecte ct
0		#NUM!	0,706
1		0	0,657
2,5	0,397940009	0,572	80,93
5	0,698970004	0,495	70,13
10		1	0,195
		#NUM!	#DIV/0!
		#NUM!	#REF!
			#REF!

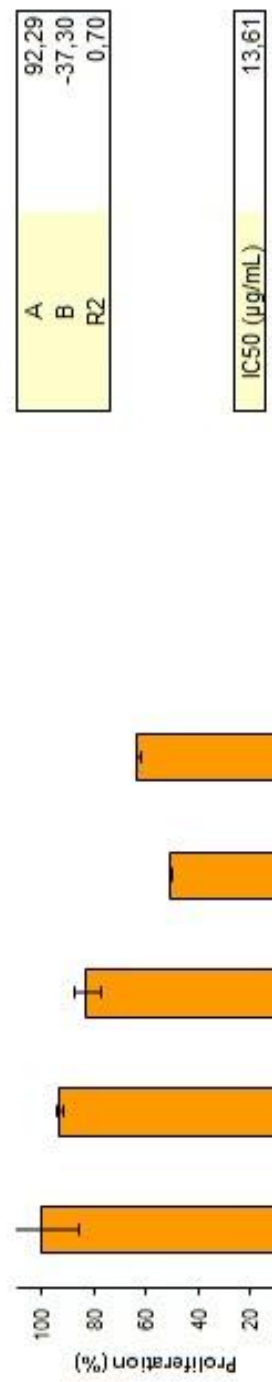


Fludarabina Z-138

Z138 FLUDARABINA

% proliferation						
[Drug] (µg/ml)	Control	1	2,5	5	10	
Blanc						
	0,082	0,329	0,460	0,421	0,278	0,223
	0,111	0,451	0,438	0,303	0,239	0,310
	0,103	0,432	0,254	0,333	0,247	0,343
MITJANA	0,099	0,404	0,384	0,352	0,255	0,292
SD*100	1,498	6,564	11,312	6,133	2,060	6,199
						#DIV/0!
						#DIV/0!

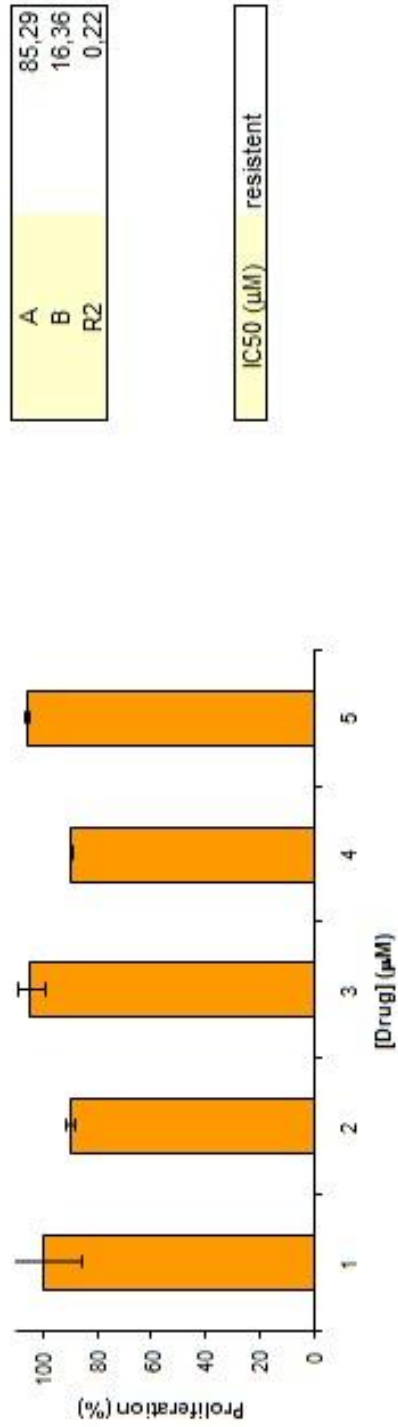
[Drug] (µg/ml)	log10 [Drug]	#NUM!	% proliferation	% prolif respecte ct	#DIV/0!	#REF!
0			0,305	100		
1		0	0,285	93,45		
2,5		0,397940009	0,254	83,08		
5		0,698970004	0,156	51,09		
10		1	0,193	63,32	#DIV/0!	#REF!
		#NUM!	#DIV/0!		#DIV/0!	#REF!
		#NUM!	#REF!		#REF!	#REF!



Sorafenib JEKO

JEKO sorafenib		% proliferation					
[Drug] (µM)	Control	2,5	5	7,5	10		
Blanc							
	0,097	0,648	0,683	0,823	0,568		
	0,107	0,896	0,660	0,856	0,779	0,881	
	0,098	0,877	0,866		0,847	0,816	
MITJANA	0,101	0,807	0,736	0,840	0,731	0,849	
SD*100	0,551	13,803	11,288	2,333	14,548	4,596	
						#DIV/0!	
						#DIV/0!	

[Drug] (µM)	log10 [Drug]	% proliferation	% prolif respecte ct
0	#NUM!	0,706	100
2,5	0,397940009	0,636	90,00
5	0,698970004	0,739	104,60
7,5	0,875061263	0,631	89,29
10	1	0,748	105,88
	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!
	#NUM!	#REF!	#REF!

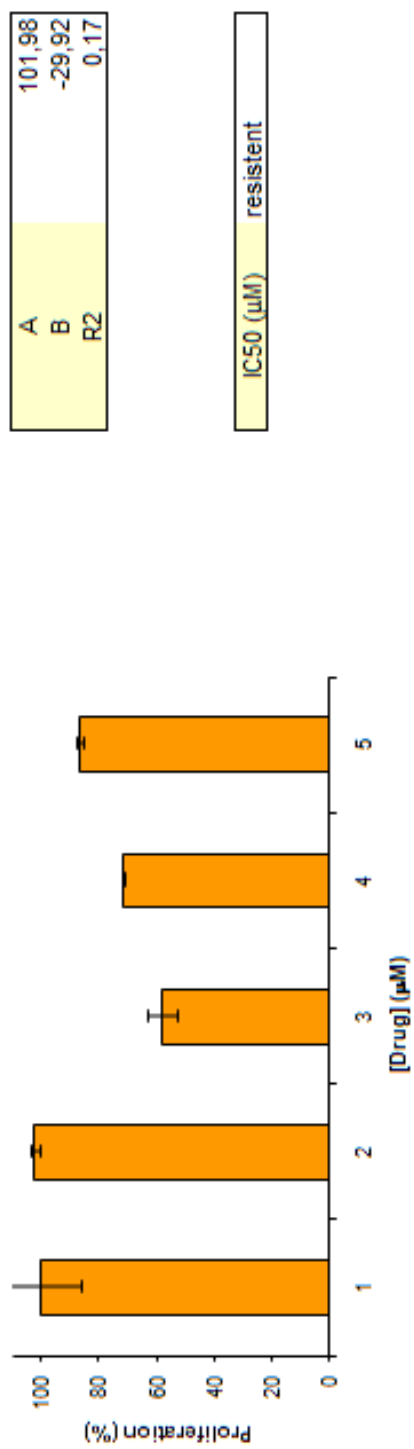


Sorafenib Z-138

Z138sorafenib

% proliferation						
[Drug] (µM)	Control	2,5	5	7,5	10	
Blanc	0,082	0,329	0,486	0,302	0,311	0,489
	0,111	0,451	0,185	0,161		0,220
	0,103	0,432	0,562	0,368	0,323	0,382
MITJANA	0,099	0,404	0,411	0,277	0,317	0,364
SD*100	1,498	6,564	19,938	10,574	0,849	13,543
						#DIV/0!
						#DIV/0!

[Drug] (µM)	log10 [Drug]	% proliferation	% prolif respecte ct
0	#NUM!	0,305	100
2,5	0,397940009	0,312	102,29
5	0,698970004	0,178	58,41
7,5	0,875061263	0,218	71,51
10	1	0,265	86,79
	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!
	#NUM!	#REF!	#REF!



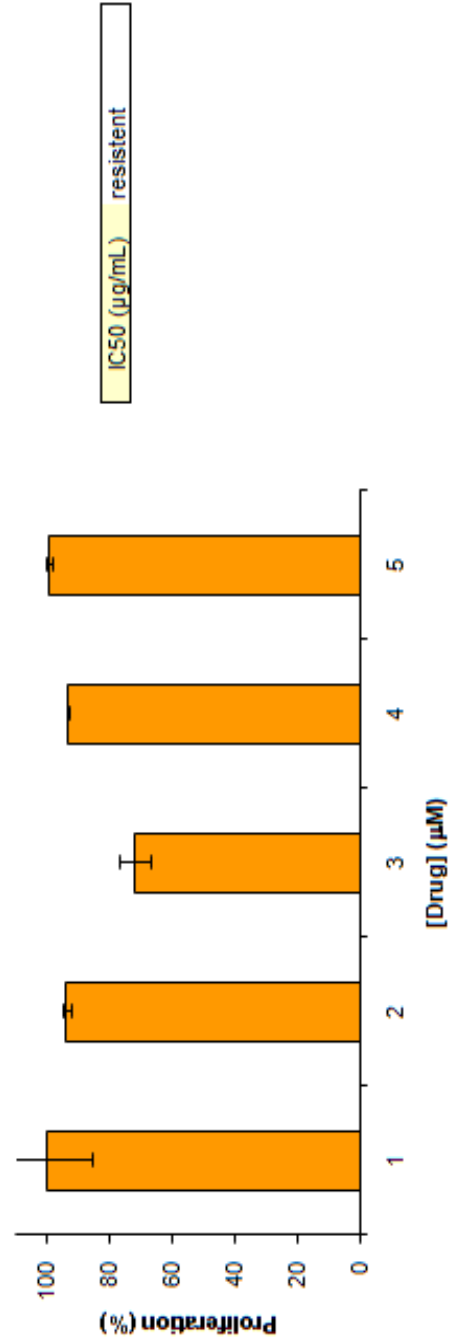
Aspirina JEKO

JEKO aspirina

		% proliferation				
[Drug] (µg/ml)	Control	1	2,5	5	10	
Blanc						
	0,097	0,648	0,881	0,758	0,705	
	0,107	0,896	0,745	0,598	0,834	
	0,098	0,877	0,666	0,478	0,746	
MITJANA	0,101	0,807	0,764	0,611	0,762	
SD*100	0,551	13,803	10,875	14,048	6,591	
					0,805	
					7,354	
					#DIV/0!	
					#DIV/0!	

[Drug] (µg/ml)	log10 [Drug]	#NUM!	% proliferation	% prolif respecte ct
0			0,706	100
1		0	0,663	93,91
2,5	0,397940009		0,511	72,30
5	0,698970004		0,661	93,58
10		1	0,704	99,72
		#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!
		#NUM!	#REF!	#REF!

A	84,68
B	9,92
R2	0,12



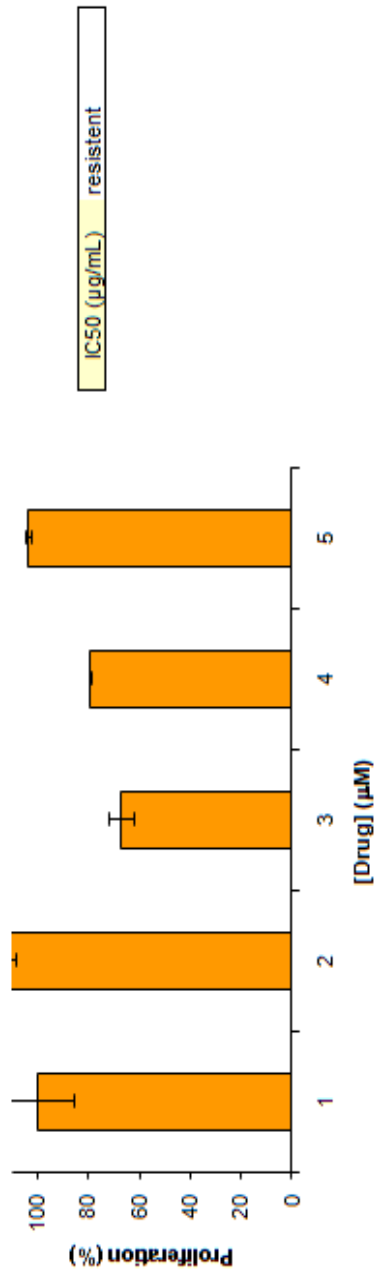
Aspirina Z-138

Z138 aspirina

% proliferation		Control		2,5		5		10	
[Drug] (µg/ml)	Blanc	1	0,489	0,329	0,451	0,325	0,470	0,367	0,429
	0,082	0,103	0,382	0,432	0,283	0,351	0,452		
MITJANA	0,099	0,404	0,436	0,304	0,304	0,341	0,416		#DIV/0!
SD*100	1,498	6,564	7,566	2,970	13,428	4,397			#DIV/0!

[Drug] (µg/ml)	log10 [Drug]	% proliferation	% prolif respecte ct
0	#NUM!	0,305	100
1	0	0,337	110,32
2,5	0,397940009	0,205	67,25
5	0,698870004	0,242	79,37
10	1	0,317	103,93
	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!
	#NUM!	#REF!	#REF!

A	93,09
B	-5,49
R2	0,01



7.7 Interpretació dels resultats

7.7.1 Bortezomib

En les gràfiques del Bortezomib podem observar, que tan en el Z-138 com el JEKO el bortezomib té una citotoxicitat alta.

La concentració expressada en nM del IC50 és molt baix, tant en el cas del JEKO (0.01nM) com en el de Z-138 (8.44 nM).

Per tant, podem concloure que el Bortezomib és el més citotòxic dels quatre fàrmacs treballats, és a dir, per a un pacient de Limfoma del Mantell el Bortezomib és la millor solució per tal de tractar-lo.

7.7.2 Fludarabina

En el cas de la Fludarabina podem observar que per obtenir una toxicitat alta calen quantitats més elevades. En JEKO la LD50 (dosi letal 50%) és de 6.56 µg/mL i en Z-138 és de 13.61 µg/mL.

Aquest fàrmac no seria la nostra a primera opció a l'hora de ser utilitzat en un malalt de Limfoma de Mantell, ja que no dóna uns resultats tan òptims com els del Bortezomib. Tot i així, com que sí que inhibeix el cicle cel·lular, l'utilitzaríem conjuntament amb altres fàrmacs. Aquesta combinació de fàrmacs millora considerablement els resultats, però per contra són molt tòxics i per això s'utilitza en pacients sans i joves.

7.7.3 Sorafenib

El Sorafenib ens ha donat que és totalment resistent, per tant, no té cap efecte citotòxic sobre les cèl·lules canceroses. Aquest fàrmac seria una mala opció a l'hora de tractar un pacient malalt.

La unitat d'hematopatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona, actualment està portant la investigació d'aquest fàrmac i els resultats en pacients amb Limfoma del Mantell són esperançadors.

Per això es pot dir que en aquest cas l'experiment dut a terme amb el Sorafenib no ha tingut els resultats desitjats, possiblement perquè el fàrmac utilitzat era massa vell i havia perdut el seu efecte citotòxic sobre les cèl·lules infectades.⁽⁴⁾

7.7.4 Aspirina

La nostra hipòtesi sobre l'efecte de l'aspirina ha set certa, ja que el resultat de IC50 ha sortit que les cèl·lules són totalment resistents a aquest fàrmac.

El resultat era d'esperar ja que l'aspirina és un fàrmac analgèsic, antipirètic i antiinflamatori. Podem observar doncs, que l'aspirina no té cap efecte a l'hora d'inhibir el cicle cel·lular ni de provocar l'apoptosi, per tant, no és un fàrmac que puguem utilitzar en la teràpia de Limfoma del Mantell.

⁽⁴⁾ Els resultats actuals del Sorafenib obtinguts en investigacions per l'Hospital Clínic de Barcelona es troben a l'annex pàg. 76

8. CONCLUSIONS

Tothom sap que el càncer és la primera causa de mort en tot el món, per tant avui en dia aquest terme causa certa basarda en la nostre societat, ja que el càncer és una malaltia molt freqüent i amb una supervivència limitada.

És aquí on va començar el nostre interès per porta a terme un treball de recerca sobre el càncer, cercant què és exactament, per què i com es desenvolupa al nostre cos, les seves causes ambientals, com podem actuar per tal de prevenir-lo i les teràpies utilitzades actualment. Tenir coneixement sobre tots aquests aspectes fa que la paraula càncer ens sigui més propera i per tant al conèixer realment què és, ens ha fet adonar que aquesta por ha de disminuir, ja que en molts casos no és incurable i actualment els científics es troben en constant estudi pel seu tractament definitiu.

Nosaltres, dues estudiants de batxillerat amb ganes de intervenir en la recerca de la cura del càncer, hem intentat trobar el fàrmac més eficaç per el càncer de Limfoma del Mantell.

Aquest càncer és molt infreqüent, per aquesta raó abans de començar la nostra investigació ens vam voler informar i saber on s'origina de l'organisme i quins sistemes queden afectats, que són el sistema immunitari i el limfàtic.

Un cop informades varem començar el nostre experiment de l'eficiència d'un fàrmac en cèl·lules del Limfoma del Mantell, realitzat a l'Hospital Clínic de Barcelona. La nostra hipòtesi inicial era que els fàrmacs més eficaços i per tant més citotòxics eren la Fludarabina, el Bortezomib i el Sorafenib, i per altra banda l'Aspirina teníem clar que no produiria cap efecte sobre les cèl·lules. Per tant una vegada fet l'experiment podem verificar que la nostra hipòtesi ha estat certa en la majoria dels aspectes. Aquest és el cas de la fludarabina, el bortezomib i l'aspirina tots ells complint amb les expectatives esperades. En canvi amb el sorafenib els resultats no han estat els desitjats, ja que al mateix Hospital Clínic es van adonar, després de veure els resultats, que el fàrmac era vell i que no havia reaccionat correctament sobre les cèl·lules infectades. Per tant no vam poder complir la hipòtesi per qüestions externes a nosaltres i no controlables.

Com hem citat a la introducció som dues alumnes de dos batxillerats diferents i això ens ha fet tenir dos punts de vista personals envers el treball.

A mi, Meritxell Tañà, estudiant del Batxillerat econòmic, el desenvolupament d'aquest treball m'ha suposat un grau més elevat d'esforç que a la meva companya que fa el Batxillerat científic, ja que ella disposava de més coneixements de base i tenia més formació sobre el tema.

De totes maneres, a mida que he anat fent el treball, m'he anat posant al dia, he anat adquirint nous coneixements i me n'he sortit bé. Quan vaig decidir fer aquest treball ja era conscient de que això em passaria però tenia ganes de realitzar un treball d'aquesta temàtica ja que sempre he trobat que el món de la medicina és interessant i encara més un tema tan important com el càncer.

Tot i que el meu futur el vull encaminar cap a un altre sector, fer aquest treball m'ha agradat molt, m'ha enriquit a tots nivells, he pogut conèixer directament els treball precis i meticulós que es porta a terme als laboratoris, les tècniques que utilitzen i m'he pogut adonar de la importància que té la feina que fan.

Penso que he après molt i que fer aquest treball m'haurà servit de molt faci el que faci en un futur.

A mi, Sílvia Martínez, estudiant del Batxillerat científic i d'optativa biologia, l'elaboració d'aquest treball m'ha estat molt gratificant, sobretot la part de l'experiència pràctica duta a terme a l'Hospital Clínic de Barcelona. La investigació és un camp que actualment té molta força, molts científics estan estudiant sobre amplis temes que tenen una gran importància pel futur. El tema que m'interessa més a mi és la biomedicina i crec que no podia fer un treball de recerca millor que no fos aquest, ja que he pogut veure com és la feina en un laboratori, el material que utilitzen, com treballen i els mètodes que fan servir per tal d'investigar sobre malalties i en el nostre cas sobre el càncer, que és una malaltia molt important.

En un futur m'agradaria treballar en un laboratori i crec que aquest treball m'ha endinsat més en aquest món i m'ha donat més ganes per seguir amb aquesta idea i no rendir-me.

9. FONTS D'INFORMACIÓ

9.1 Bibliografia

ALBERTS, Bruce – JOHNSON, Alexander – LEWIS, Julian – RAFF, Martin – ROBERTS, Keith – WALTER, Peter. *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Ediciones Omega S.A, 2004

GUYTON, Arthur C. – HALL, John E. *Tratado de Fisiología Médica*. Madrid: Elsevier España S.A, 2006

MACIP, Salvador. *Immortals, sans i perfectes*. Barcelona: Edicions 62, 2008

Manual d'Hematología CTO de Medicina y Cirugía. Madrid: Cañizares Artes Gráficas, 2007

VARELA, A.Senra. *El Càncer: Epidemiología, etiología, diagnóstico i prevenció*n. Madrid: Ediciones Harcourt S.A, 2002

YOUNG, Barbara – HEATH, John W. *Wheater's Functional Histology*. London: Elsevier Limited, 2000

Dorland Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina. Madrid: Elsevier España S.A, 2005

Apunts MIC I, Dr. Andrés López

9.2 Recursos electrònics

- Chemotherapy Drugs and Side Effects Information

www.chemocare.com

- Diccionari Enciclopèdic de Medicina

<http://www.medic.cat/>

- Practical Studies for Medicinal Chemistry (MTT test)

http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf

- Información de Medicamentos y Principios Activos

<http://www.vademecum.es/>

10. ANNEX

10.1 Glossari

1. Anaplàsia : Regressió de les cèl·lules a una forma més primitiva i indiferenciada.

2. Anticòs: Molècula d'inmonoglobulina que té una seqüència específica d'aminoàcids i que gràcies a aquesta interactua únicament amb un determinat antigen.

3. Antigen: Substància reconeguda com a estranya per l'organisme, capaç d'induir en aquest una resposta immunitària i reaccionar amb els productes d'aquesta: anticossos.

4. Apoptosi: En els organismes pluricel·lulars, les cèl·lules que no són necessàries o que representen una amenaça per l'organisme es destrueixen mitjançant un mecanisme suïcida anomenat mort cel·lular programada o apoptosi.

5. Blast: Cèl·lula sanguínia immadura.

6. Carcinoma: És una forma de càncer amb origen a les cèl·lules de tipus epitelial, és a dir el teixit que recobreix la superfície i les cavitats dels òrgans del cos.

7. Cèl·lula mare: Cèl·lula primordial no diferenciada que té l'habilitat de diferenciar-se en altres tipus cel·lulars.

8. Cèl·lules presentadores d'antígens: són un grup divers de cèl·lules del sistema immunitari la funció de les quals és captar, processar i presentar antígens a les seves membranes per tal que siguin reconegudes, particularment pels limfòcits T.

9. Ciclin D1: És una proteïna que pertany a una família de ciclins, encarregades de la regulació del cicle cel·lular exactament en la fase G1 a S (moment el qual la cèl·lula replica el seu ADN).

10. Citocines: Les citocines són un tipus de molècules senyalitzadores que, com les hormones i els neurotransmissors, són utilitzades àmpliament en la comunicació cel·lular (creixement, diferenciació i/o activació en elles mateixes o en altres cèl·lules).

11. Factors de creixement: Són unes substàncies que exerceixen una funció important en la comunicació intercel·lular. La funció principal és la del control extern del cicle cel·lular, entre el moment G0 i G1, moment al qual comença la proliferació.

12. Farmacoteràpia: Tractament de les malalties amb medicaments.

13. Fol·licle: Petita acumulació de limfòcits que es troben a l'escorça d'un gangli limfàtic.

14. Genotòxic: Substància que té unes repercussions negatives sobre el material genètic.

15. Limfa: Líquid incolor, procedent de la sang que circula pels vasos limfàtics. Transporta els limfòcits a través d'aquests vasos.

16. Limfoma de Burkitt: Tumor limfàtic inclòs en els limfomes indiferenciats, que predomina sobretot a l'Àfrica Central. L'agent etiològic és el virus d'Epstein-Barr. Afecta sobretot als infants de 4 a 8 anys i les manifestacions clíniques són sovint extraganglionars; les localitzacions més freqüents són la mandibular i l'abdominal.

17. Metàstasi: L'extensió d'una malaltia d'un òrgan o part a un altre òrgan o part no adjacent. Només els tumors malignes i les infeccions tenen la capacitat de metastatitzar.

18. Macròfags: Cèl·lula immunològica, capaç d'activar un limfòcit T en presentar antígens units a la seva membrana.

19. Neoplàsia: Tumor maligne.

20. Quimioteràpia dirigida: Actualment, el tractament del càncer s'ha centrat principalment en destruir les cèl·lules que es divideixen més ràpidament, al ser una característica de les cèl·lules canceroses. Desafortunadament, algunes cèl·lules normals també es divideixen ràpidament, pel que es produeixen diverses efectes secundaris. La teràpia dirigida es basa en la identificació d'altres característiques específiques de les cèl·lules canceroses de manera que produeixen menys efectes secundaris.

21. Quinasa: És un enzim que té un paper important en la transmissió de senyals i control de processos complexos de dins la cèl·lula.

22. Reticle endoplasmàtic rugós: Orgànul cel·lular que intervé en la síntesi de les cadenes proteiques.

23. Sarcoma: És una neoplàsia maligne que s'origina en un teixit conjuntiu, com poden ser els ossos, cartílags, teixit adipós, múscul i vasos sanguinis.

24. Teràpia de rescat: ús de mètodes terapèutics experimentals o agressius en pacients amb mal pronòstic després del fracàs d'altres tractaments.

25. Tim: És un òrgan del sistema limfàtic que consta de dos lòbuls i es localitza darrera del tòrax. La principal funció del tim és oferir un espai per a la maduració de les cèl·lules T, i és vital en la protecció contra la autoimmunitat.

26. Translocació: Anomalia cromosòmica estructural que es caracteritza per la transferència d'un fragment de cromosoma a un altre cromosoma no homòleg o, més habitualment, per l'intercanvi de fragments entre cromosomes no homòlegs.

10.2 Il·lustracions i taules

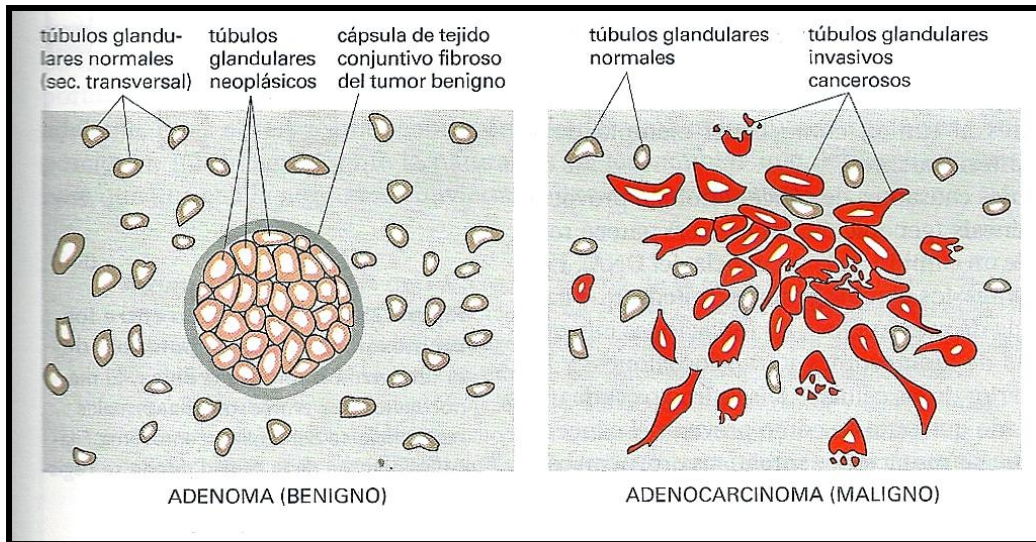


Fig. 1 – Tumors benignes i tumors malignes. Un tumor benigne i un de maligne són estructuralment diferents. Podem veure a la il·lustració que el tumor benigne té una càpsula de teixit conjuntiu que impedeix la invasió als altres teixits.

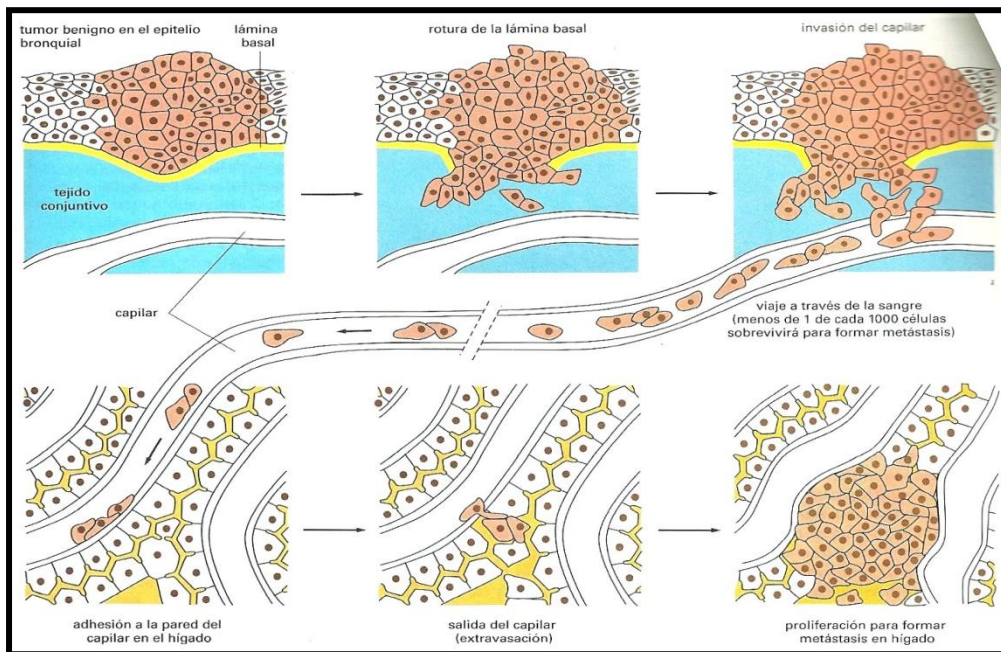


Fig. 2 - Etapes en el procés de metàstasi. Aquesta imatge il·lustra l'expansió d'un tumor d'un òrgan com el pulmó o la bufeta urinària al fetge. Les cèl·lules tumorals passen al torrent circulatori travessant la paret d'un vas sanguini o d'un vas limfàtic. Sovint les cèl·lules canceroses que entren als vasos limfàtics queden atrapades i fan metàstasi als ganglis limfàtics.

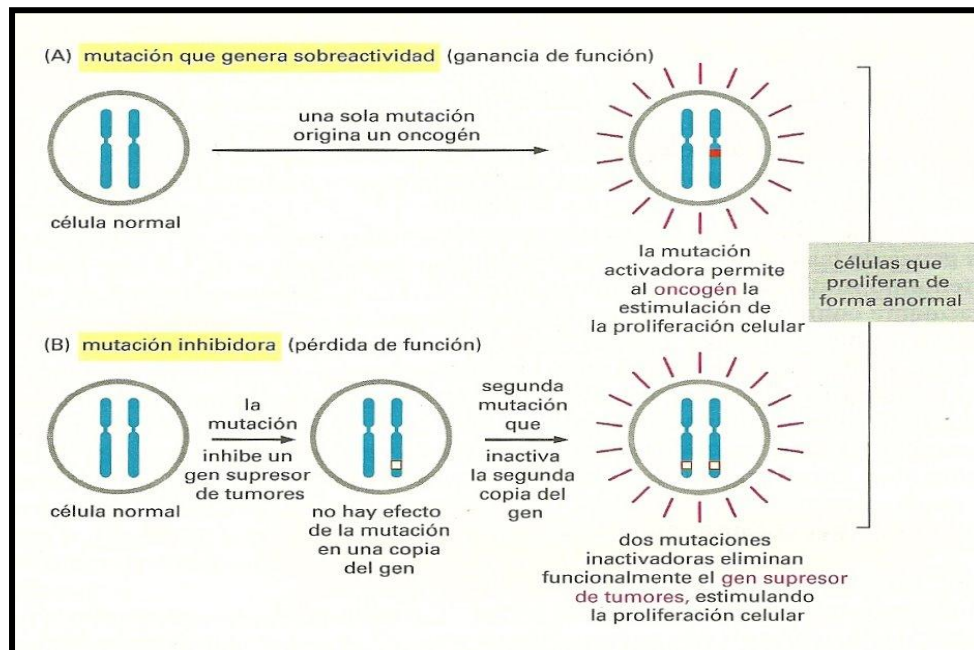


Fig. 3 – La classificació dels gens que provoquen càncer. L'apartat A hi veiem el primer tipus: un oncogen que provoca un increment de funció i per tant hi ha un excés d'activitat.

El B és del segon tipus ja que l'oncogen el que fa és perdre la seva funció. Podem veure que l'A actua de forma dominant i amb una sola mutació s'estimula la sobreactivitat. En canvi al B afecte en un gen recessiu, per tant cal la mutació als dos gens homòlegs per tal que s'inactivin les funcions.

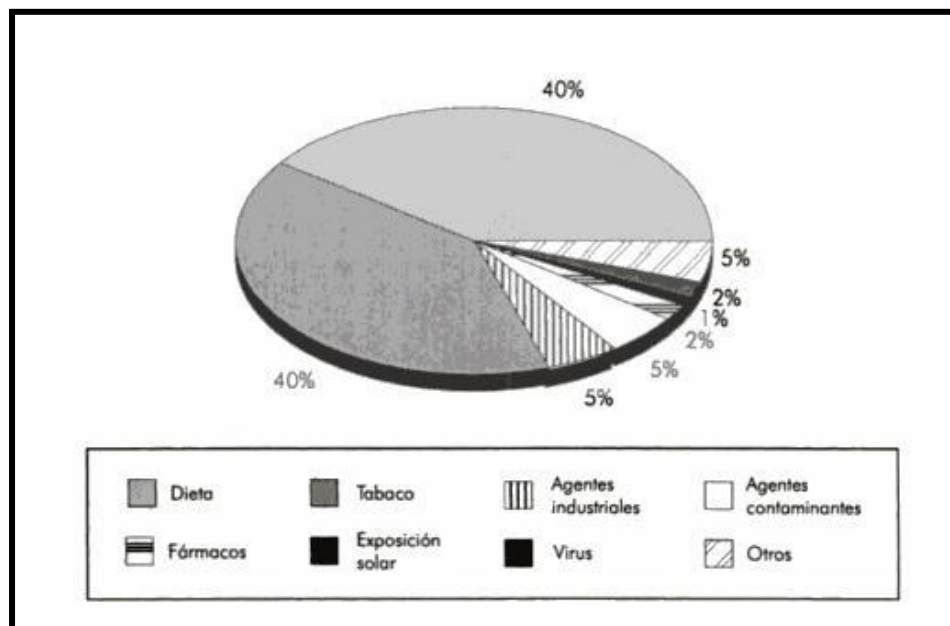


Fig. 4 - Principals causes del càncer. En aquesta gràfica circular podem observar que les dues causes majoritàries del càncer són el tabac i la dieta, sumant un 80% del total.

Todas las edades		De 1 a 19 años		De 20 a 39 años		De 40 a 59 años		De 60 a 79 años		De 80 y más años		
1º	Pulmón	16859	Leucemias	88	Encéfalo	99	Pulmón	3425	Pulmón	10213	Pulmón	3128
2º	Colorrectal	7585	Encéfalo	30	Pulmón	91	Colorrectal	920	Colorrectal	4209	Próstata	2944
3º	Próstata	5409	Huesos	21	Leucemias	79	C. Bucal y faringe	646	Próstata	2339	Colorrectal	2413
4º	Vejiga	3732	LNH	12	Tum. mal definidos	55	Tum. mal definidos	566	Vejiga	1989	Vejiga	1423
5º	Estomago	3533	T. Conjuntivo	11	Huesos	46	Estomago	541	Estomago	1945	Estomago	1002
6º	Tum. mal definidos	3386	Tum. mal definidos	7	LNH	45	Páncreas	522	Tum. mal definidos	1760	Tum. mal definidos	977
7º	Páncreas	2535	Pulmón	2	Estomago	45	Encéfalo	411	Páncreas	1452	Páncreas	539
8º	Hígado primario	1796	Vejiga	2	Colorrectal	43	Esófago	402	Hígado primario	1089	Leucemias	523
9º	Leucemias	1782	Riñón	2	Melanoma	29	Laringe	377	Leucemias	893	Riñón	339
10º	C. Bucal y faringe	1730	Otros s. Nerv. C.	2	C. Bucal y faringe	24	Hígado primario	354	Esófago	854	Hígado primario	331
11º	Esófago	1494	Testículo	2	Páncreas	22	Vejiga	312	Laringe	848	LNH	283
12º	Laringe	1479	Hodgkin	1	T. Conjuntivo	21	Riñón	229	C. Bucal y faringe	843	Laringe	248
13º	Encéfalo	1387	Laringe	1	Hígado primario	21	LNH	224	Encéfalo	694	Esófago	230
14º	Riñón	1282	Mama	0	Testículo	18	Leucemias	216	Riñón	683	Mieloma	228
15º	LNH	1210	Colorrectal	0	Hodgkin	17	Próstata	126	LNH	646	C. Bucal y faringe	217

Fig. 5 - Taula de mortalitat per càncer en homes l'any 2009. En aquesta taula s'observa que el primer càncer causant d'una gran quantitat de defuncions en homes és el de pulmó amb 16859 casos, seguit des de la llunyania per el càncer de còlon amb 7585.

Todas las edades		De 1 a 19 años		De 20 a 39 años		De 40 a 59 años		De 60 a 79 años		De 80 y más años		
1º	Mama	5939	Leucemias	35	Mama	200	Mama	1504	Mama	2478	Colorrectal	2568
2º	Colorrectal	5490	Encéfalo	19	Encéfalo	73	Pulmón	794	Colorrectal	2329	Mama	1757
3º	Tum. mal definidos	2721	Huesos	14	Leucemias	59	Colorrectal	541	Páncreas	1205	Tum. mal definidos	1252
4º	Pulmón	2624	LNH	7	Útero	55	Ovario	439	Pulmón	1172	Estomago	996
5º	Páncreas	2315	T. Conjuntivo	3	Colorrectal	52	Útero	374	Tum. mal definidos	1153	Páncreas	845
6º	Estomago	2170	Ovario	3	Pulmón	42	Tum. mal definidos	273	Ovario	944	Pulmón	616
7º	Útero	1931	Tum. mal definidos	2	Estomago	42	Páncreas	252	Útero	924	Útero	578
8º	Ovario	1908	Hodgkin	2	Tum. mal definidos	41	Estomago	245	Estomago	886	Leucemias	549
9º	Leucemias	1353	Melanoma	2	Ovario	39	Encéfalo	238	Leucemias	597	Ovario	483
10º	Encéfalo	1120	Estomago	1	Melanoma	29	LNH	113	Encéfalo	578	Vejiga	460
11º	LNH	1092	C. Bucal y faringe	1	LNH	26	Leucemias	112	LNH	543	LNH	403
12º	Vesícula	805	Fosas nasales	1	Huesos	21	Melanoma	104	Mieloma	404	Vesícula	385
13º	Vejiga	781	Pulmón	0	Hodgkin	16	Riñón	90	Vesícula	390	Mieloma	307
14º	Mieloma	762	Vejiga	0	T. Conjuntivo	15	C. Bucal y faringe	88	Hígado primario	367	Riñón	267
15º	Riñón	711	Riñón	0	Páncreas	13	Esófago	56	Riñón	345	Hígado primario	226

Fig. 6 - Taula de mortalitat per càncer en dones l'any 2009. Pel que fa a la mortalitat en dones el principal càncer responsable d'una gran quantitat de morts és el càncer de mama amb 5939 casos seguit del càncer de còlon amb 5490.

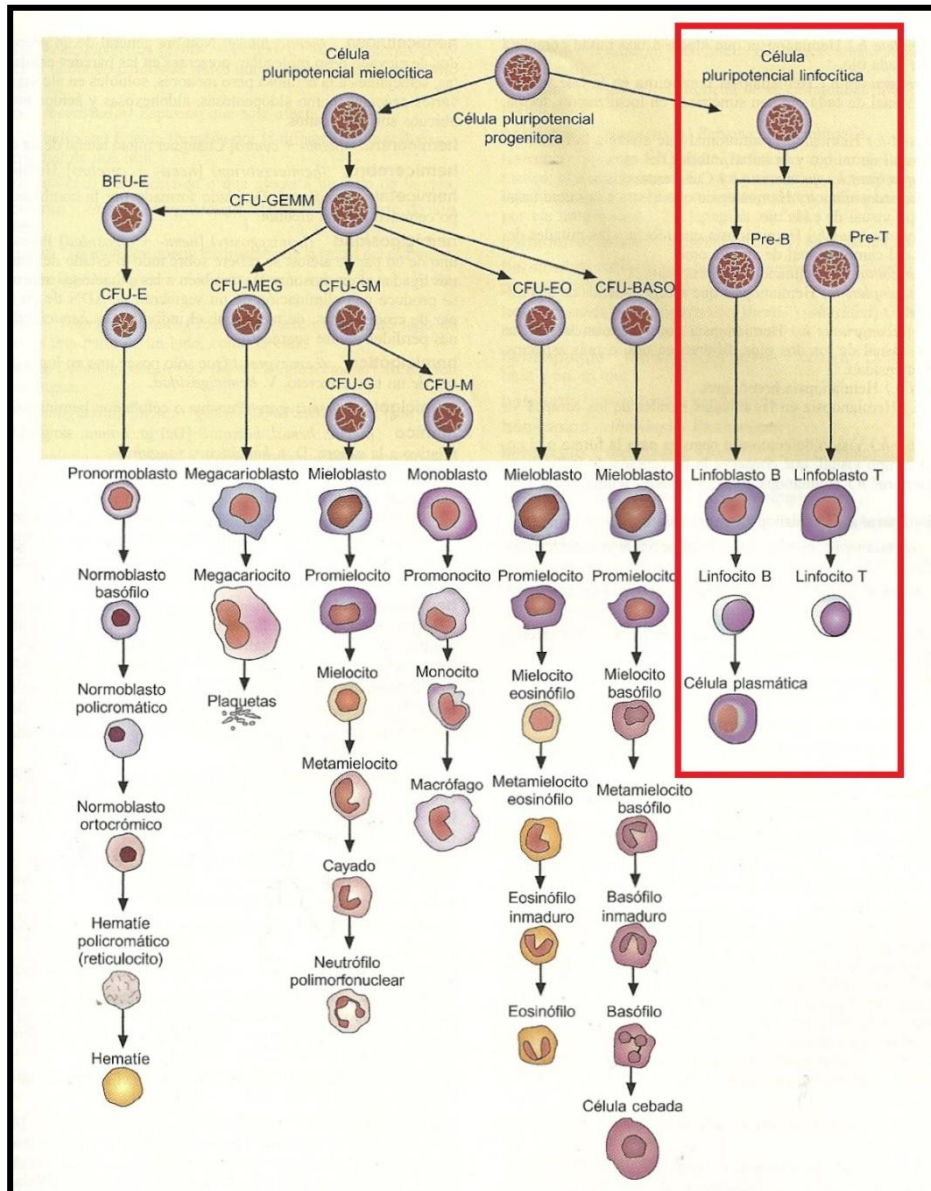


Fig. 7 – Hematopoesi. La hematopoesi és la formació i desenvolupament de les cèl·lules sanguínies.

Al requadre vermell s'hi observa la linfoipoiesi, és a dir, el procés mitjançant el qual es formen els limfòcits.

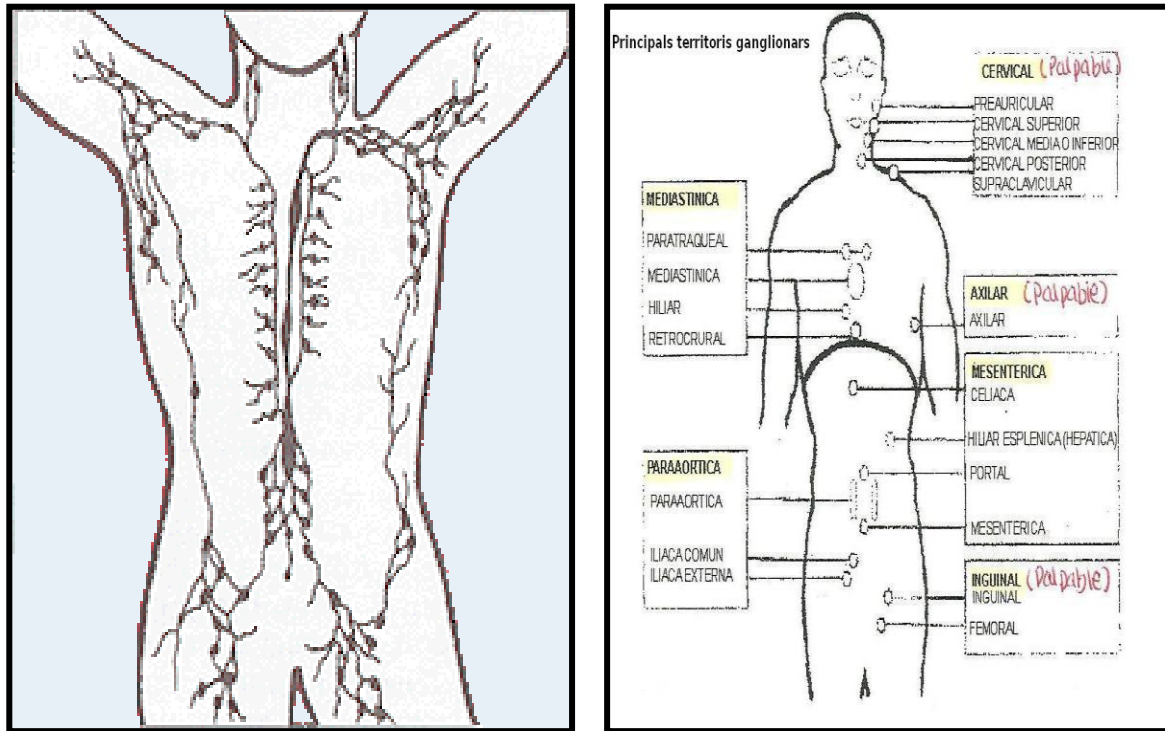


Fig. 8 i 9 - Il·lustració del sistema limfàtic i localització dels principals territoris ganglionars. En la primera imatge veiem dibuixats els vasos limfàtics els quals van per tot el cos transportant la limfa, com podem veure són cecs, és a dir no tenen sortida, per això el que fan és absorbir per a les seves parets els líquids i conduir-los als vasos sanguinis. En la segona imatge es pot veure els principals territoris ganglionars destacant el cervical, l'axil·lar i l'inguinal que són palpables.

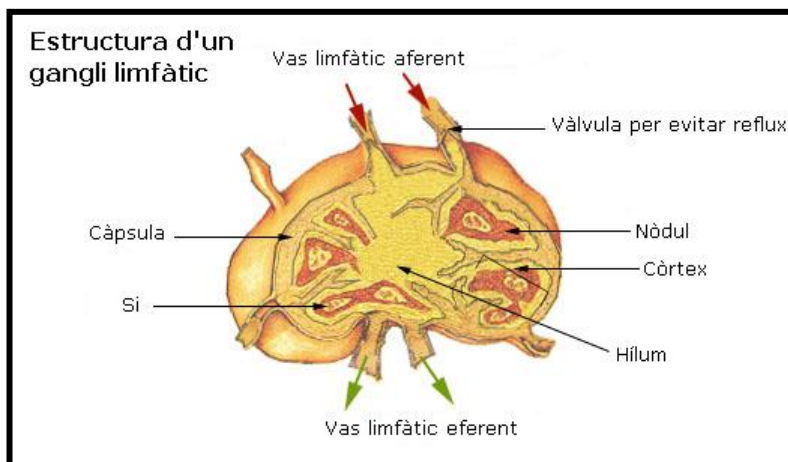


Fig. 10 - Estructura d'un gangli limfàtic. A la part superior observem els vasos aferents que són l'entrada de la limfa al gangli i a la part inferior veiem dos dels dos vasos eferents que és per on surten les substàncies.

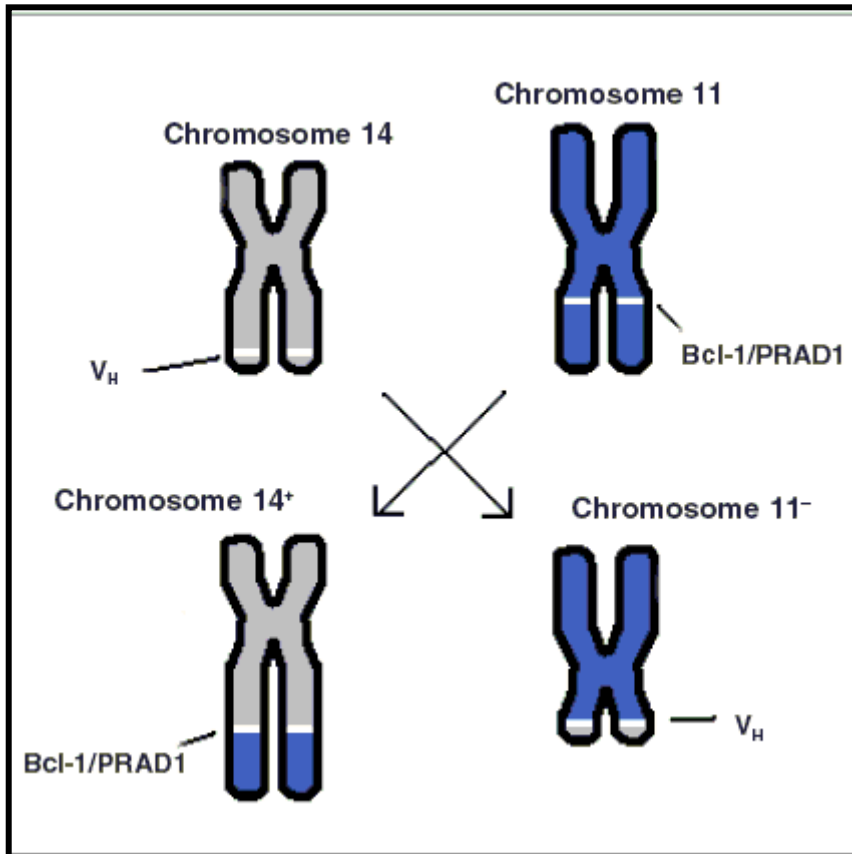


Fig. 11 - Translocació t(11;14)(q13,q32). Aquesta imatge ens il·lustra perfectament la translocació recíproca t(11;14)(q13,q32). Els dos cromosomes no homòlegs 14 i 11 s'intercanvien un fragment cromosòmic de mides diferent cadascun.

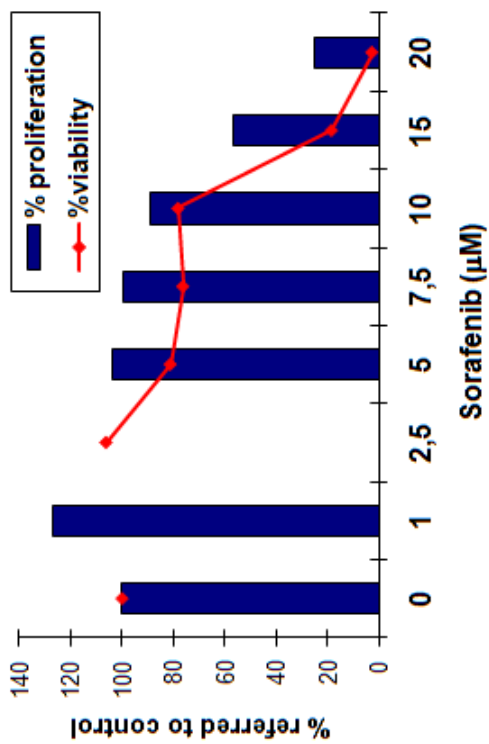
Resultats del Sorafenib obtinguts a l'Hospital Clínic de Barcelona

Les dues gràfiques adjuntades a les pàgines 76 i 77 ens donen els resultats vertaders els quals responen a la nostra hipòtesi esmentada a la pràctica, la qual afirmem que el Sorafenib té un efecte citotòxic sobre les cèl·lules del mantell.

A les gràfiques següents podem veure clarament com l'índex de proliferació disminueix a mesura que augmentem la concentració de Sorafenib. I també observem que la seva viabilitat, que és la probabilitat que té un organisme de prosperar o de sobreviure, disminueix també a l'aplicar-li quantitats més altes de Sorafenib.

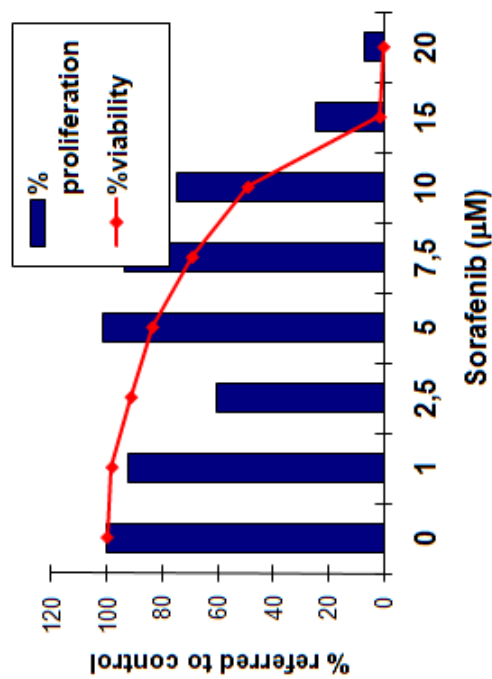
24 hours JEKO

[BAY 43] (µM)	% proliferati	%viability
0	100	100,00
1	126,74	216
2,5	104,00	69,32
5	99,30	35,28
7,5	89,11	14,83
10	56,96	8,41
15	24,65	15,79
20		2,41



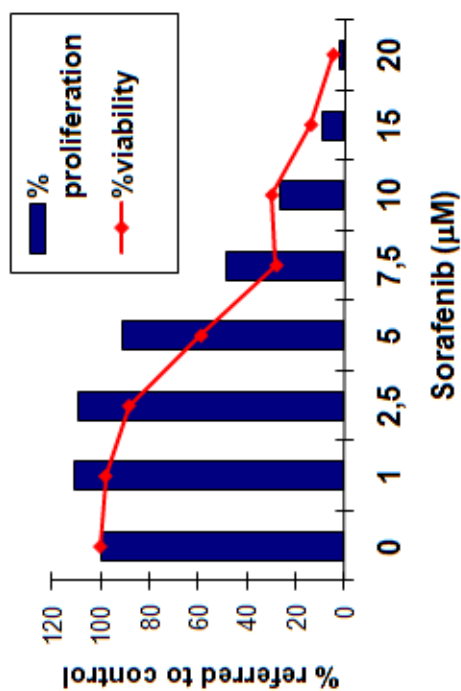
48 hours JEKO

[BAY 43] (µM)	% proliferati	% viab respecte ct
0	100	100,00
1	92,04	34,783
2,5	60,60	86,957
5	101,65	21,74
7,5	93,69	56,522
10	74,73	91,304
15	24,60	86,957
20	6,60	86,565



24 hours Z138

[BAY 43] (µM)	% proliferati	%viability
0	100	100,00
1	110,678643	97,88
2,5	109,181637	88,25
5	91,2674651	58,82
7,5	48,2035928	28,05
10	26,1976048	29,94
15	8,78243513	13,92
20	2,19560878	4,87



48 hours Z138

[BAY 43] (µM)	% proliferati	% viab	respecte ct
0	100	100,00	
1	105,831996	96,59	
2,5	96,5757089	85,35	
5	63,1353665	33,76	
7,5	14,8742643	9,42	
10	4,78865704	6,99	
15	0	5,44	
20	0	0,16	

