

# LA MEDICINA PERSONALITZADA PER AL TRACTAMENT DEL CÀNCER D'ENDOMETRI



*NUNI*

*05/12/2016*

Aquest treball de recerca s'ha fet amb la col·laboració de l'entitat de recerca, VHIR (Vall d'Hebron Research Institute) sota la supervisió de Eva Colàs, en el marc del Programa de formació científica, tecnologia i matemàtiques (CTM) organitzat pel Departament d'Ensenyament. Aquest programa ofereix als centres participants la possibilitat d'acollir-se al Programa de suport a la realització de treballs de recerca d'alumnat de batxillerat en col·laboració amb personal investigador d'entitats de recerca.

## ÍNDEX

Introducció.....	p.1
Objectius.....	p.2
1. La medicina personalitzada.....	p.3
2. Què és el càncer?.....	p.4
2.1. Càncer d'endometri.....	p.6
3. Tractaments.....	p.11
4. Part pràctica.....	p.12
4.1. Mesures de protecció per a l'estabulari.....	p.12
4.2. Experimentació a l'estabulari.....	p.14
4.3. Pase(4/8/16 i 10/8/16).....	p.14
4.3.1. Preparació.....	p.17
4.3.2. Extracció del tumor.....	p.17
4.3.3. Emmagatzematge.....	p.18
4.3.4. Implantació del tumor.....	p.20
4.4. Control del creixement tumoral i canvi d'aigua.....	p.22
4.5. Teràpies.....	p.22
4.5.1. Selecció dels animals.....	p.23
4.5.2. Preparació de teràpies.....	p.24
4.5.3. Aplicació dels tractaments.....	p.24
4.5.4. Resultats estadístics.....	p.26
Conclusions.....	p.28
Bibliografia.....	p.29

## INTRODUCCIÓ

La meva idea del treball, al principi no era gens clara. Sabia perfectament en quin àmbit volia enfocar el meu treball però el tema no el tenia ben clar.

Sempre havia pensat que una cosa com el treball de recerca al qual has de dedicar tantes hores, havia de ser d'alguna cosa que em motivés i que m'agradés treballar de tal manera que no es fes ni avorrit ni pesat. Així doncs vaig decidir relacionar la temàtica d'aquest treball amb el que aleshores era un tema que m'interessava però del qual no estava massa informada: el Càncer.

Tot i els consells dels meus familiars sobre no agafar aquest tema tan dur, vaig decidir que si en un futur jo tenia la intenció de dedicar-me al món de l'oncologia, la millor manera era començar per aquí.

Tenia clar que treballar sobre aquest tema tan complex i des del punt de vista biomèdic, no era possible si no contactava amb alguna entitat de recerca que em pogués ajudar. Per això vaig enviar la carta de sol·licitud al VHIR (Vall d'Hebron Research Institute), però com no era segur 100% que m'acceptessin, vaig haver de pensar una segona opció, com afronten els malalts de càncer i els seus familiars la vida amb aquesta malaltia.

Per sort al final vaig poder treballar amb ells. El primer dia acompanyada amb la meva tutora del treball de recerca, em van ensenyar totes les instal·lacions i el següent dia vaig poder conèixer a la Dra. Eva Colàs, la investigadora que m'ajudaria en aquest treball.

Amb ella vaig acabar de definir en què consistiria el meu treball. Vam establir que començaria amb un marc teòric on explicaria què és la medicina personalitzada en general i després em centraria en el càncer d'endometri, i una part pràctica on explicaria la meva estada al laboratori i el treball amb els models murins derivats de pacients o PDX (Patient-Derived Xenografts) i com aquests s'apliquen a l'àmbit de l'oncologia. Finalment, el meu projecte acabaria amb unes estadístiques per demostrar el funcionament de les teràpies i les conclusions d'aquests resultats.

## OBJECTIUS

Abans de començar vaig plantejar una sèrie d'objectius que pretenia assolir en acabar el treball.

La primera idea que tenia al cap era posar-me al dia sobre el càncer. Per a aconseguir-ho havia de buscar qualsevol font on hi aparegués informació actualitzada sobre aquest tema. Un aspecte important era aprendre a interpretar articles científics i saber extreure la informació necessària.

Un cop realitzada la recerca, em vaig proposar saber estructurar la informació de manera clara i entenedora per tal que el treball estigués ben organitzat.

Respecte a la part experimental, els objectius van ser diferents. En primer lloc, volia aprendre com es treballa al laboratori, amb les seves normes, els seus recursos i la seva organització. Volia aconseguir realitzar un bon seguiment sobre el treball que estava investigant la Dra. Colàs, sabent interpretar la informació que em proporcionaria. Finalment, saber realitzar i interpretar unes bones estadístiques de tal manera que pogués comprovar l'eficàcia de les teràpies.

## 1. LA MEDICINA PERSONALITZADA

Malgrat els avenços que s'han donat en el diagnòstic i el tractament durant els últims 20 anys, el càncer continua sent la segona causa principal de mort. L'atenció personalitzada es considera el futur de l'assistència sanitària del càncer: una medicina que pretén donar als pacients el millor tractament possible en funció dels seus antecedents mèdics personals, el seu estat fisiològic i les característiques moleculars dels tumors.

Tradicionalment tots els pacients diagnosticats rebien el mateix medicament. Això funcionava només en alguns pacients però en canvi en uns altres eren ineficaços. La medicina personalitzada reconeix que cada pacient és únic. Mitjançant la utilització de proves diagnòstiques específiques, els metges ara poden predir com respon un pacient davant d'un tractament d'algunes malalties o condicions mèdiques. Això també permet determinar les dosis adequades i la duració del tractament. Podem dir que la medicina personalitzada consisteix a proporcionar el tractament adequat a cada pacient. Oferir a una persona que pateix una determinada malaltia la possibilitat real de beneficiar-se dels tractaments dirigits és oferir-li l'avantatge de ser tractada amb un medicament considerablement més eficaç i específic per a ella.

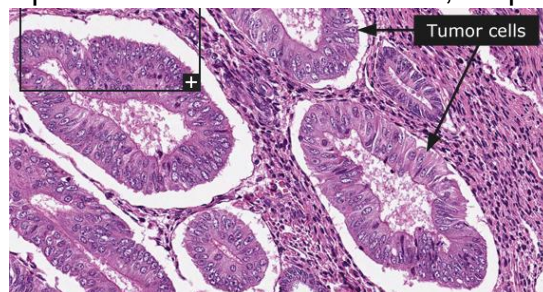
Gràcies a la medicina personalitzada avui en dia s'està treballant per a arribar a adequar el tractament als pacients o per trobar nous tractaments més eficaços. Un dels mètodes per arribar a la medicina personalitzada és l'ús de models PDX.

Els models PDX o també anomenats Avatars de Ratolins, utilitzats per estudiar la malaltia humana, són una sèrie de ratolins immunodeficients els quals se'ls empelta una petita porció del tumor d'un pacient, obtinguda per resecció quirúrgica o biòpsia. Aquest desenvolupament de mostres tumorals de pacients en ratolins s'utilitza per a la posterior utilització en els estudis de l'eficàcia de les drogues. Aquests models PDX permeten que cada pacient tingui el seu propi tumor que creix en un sistema viu, permetent d'aquesta manera la identificació d'un règim terapèutic personalitzat, que potenciï l'efecte terapèutic i minimitzi la toxicitat associada amb la quimioteràpia.

Però per una altra banda aquests models PDX tenen una sèrie de limitacions contrastades pel director de la Unitat d'Investigació Clínica en Tumors Gastrointestinals del Centre Nacional d'Investigacions Oncològiques, Manuel Hidalgo. Aquests models PDX són animals externs que no tenen un sistema immune, l'estroma<sup>1</sup> és murí<sup>2</sup> i no humà, la vascularització a nivell subcutani és diferent i moltes vegades aquests tumors no desenvolupen metàstasi perquè no dóna temps degut a la curta vida mitjana dels ratolins. Tot i així, els models PDX representen avui dia una gran esperança per arribar a la medicina personalitzada per les pacients oncològiques.

## 2. QUÈ ÉS EL CÀNCER?

Les cèl·lules humanes creixen i es divideixen per formar noves cèl·lules quan el cos les necessita. En canvi, en el càncer aquest procés es descontrola. És a dir, les cèl·lules creixen descontroladament sobrepasant les cèl·lules normals, el que dificulta el funcionament que hauria de tenir. A mesura que les cèl·lules es fan més anormals, les cèl·lules velles sobreviuen i es creen cèl·lules noves que no són necessàries. Aquestes últimes es dividiran sense interrupció formant masses anomenades tumors.



Fotografia realitzada per la Dra. Colàs.

Existeixen dos tipus de tumors: els sòlids (són masses de teixits) i els no sòlids (com la leucèmia). Encara que els tumors malignes són els més coneguts, donat que és una de les causes de mort més importants, també existeixen tumors benignes. Els tumors malignes es poden estendre als teixits propers o els poden envair. A més, al créixer aquests tumors, algunes cèl·lules canceroses poden moure's per llocs del cos mitjançant el sistema circulatori o el sistema limfàtic i poden formar nous tumors lluny de l'original. Els tumors benignes en canvi, no s'estenen pels teixits propers ni els envaeixen, però a vegades poden ser bastant grans. En extirpar-se aquests, si és que hi ha la possibilitat, no tornen a créixer

---

<sup>1</sup> *Estroma*: teixit conjuntiu que constitueix la matriu o substància fonamental d'un òrgan i sosté els elements cel·lulars que el formen.

<sup>2</sup> *Murí*: pertany a la família dels ratolins.

mentre que els malignes algunes vegades tornen a créixer. L'únic tumor benigne que pot posar la vida en risc són els que surten en el cervell.

Les cèl·lules canceroses poden influir en les cèl·lules normals, en les molècules i en els vasos sanguinis que envolten i alimenten les cèl·lules d'un tumor. També són capaces d'evadir el sistema immunitari, òrgans, teixits i cèl·lules especialitzades en protegir el cos contra infeccions i altres malalties.

Els tumors poden utilitzar el sistema immunitari per seguir vius i créixer. Per exemple les cèl·lules canceroses poden fer que el sistema immunitari no les elimini a través de l'ajuda d'algunes cèl·lules d'aquest sistema que impedeix una resposta immunitària descontrolada.

El càncer és una malaltia genètica, és a dir, és causat per canvis en els gens que controlen com funcionen les nostres cèl·lules especialment la forma com creixen i es divideixen. Aquests canvis genètics poden heretar-se dels pares o bé poden aparèixer en la vida d'una persona com a resultat d'errors que ocorren en dividir-se les cèl·lules o també, per danys a l'ADN (àcid desoxiribonucleic) causat per exposicions de l'ambient, com els compostos químics en el fum del tabac i la radiació, com els rajos ultraviolats del Sol. Les cèl·lules canceroses han patit més canvis genètics que l'ADN de les cèl·lules normals.

Hi ha més de 100 tipus de càncer. Els tipus reben normalment el nom dels òrgans o teixits on es formen. Per exemple el càncer del pulmó és aquell que comença en les cèl·lules del pulmó. Però els càncers també poden descriure's segons el tipus de cèl·lula que els forma com la cèl·lula epitelial o la cèl·lula escamosa.

El meu treball de recerca se centrarà en el càncer d'endometri i la seva cura amb la medicina personalitzada. He tingut l'oportunitat de treballar amb l'equip d'investigació d'aquest càncer, en el Grup de Recerca Biomèdica en Ginecologia del VHIR, liderat pel Dr. Antonio Gil Moreno. Concretament he treballat amb la Dra. Eva Colàs, una de les investigadores principals del grup, especialitzada en la recerca en aquest càncer.





## 2.1 Càncer d'endometri

L'endometri és el revestiment de l'úter, un òrgan petit buit i muscular amb forma de pera petita invertida de 7 centímetres de llarg situat en la pelvis, per davant del recte i per darrere de la bufeta de l'orina. L'úter està format per tres capes: l'externa composta pel perimetri, la muscular o miometri, i la interna o l'endometri.

El càncer d'endometri pot desenvolupar-se a partir de canvis en les cèl·lules d'aquest. Concretament, nosaltres parlem del càncer d'endometri que s'origina a les cèl·lules epitelials de les glàndules endometrials. Aquest correspon al 90% dels càncers d'endometri.

Més del 90% dels casos de càncer d'endometri ocorren en dones majors de 50 anys d'edat, amb una edat mitjana al diagnòstic de 63 anys. No obstant això, el 4% de les dones amb càncer d'endometri són menors de 40 anys, moltes de les quals encara volen conservar la seva fertilitat.

És el càncer més freqüent entre els tumors genitals femenins. Globalment és el quart més freqüent en la població femenina, darrere el càncer de mama, intestí i pulmó. Acostuma a donar símptomes en les fases inicials, per la qual cosa, en el moment del diagnòstic dels tumors són els estadis I-II el que explica que estigui en la setena posició de mortalitat amb bons resultats de supervivència.

Actualment no està clar per què es produeix el càncer d'endometri. Tot i així alguns dels factors de risc de càncer d'endometri en dones són:

- Envelliment: com més gran, més possibilitats hi ha de patir càncer d'endometri.
- Antecedents familiars amb càncer d'endometri: tenir un familiar (mare, germana, filla) que ha tingut aquest càncer augmenta el risc de tenir-ne.
- Antecedents personals amb càncer de mama o d'ovaris: haver patit càncer de mama o d'ovaris augmenta el risc de càncer d'endometri també, en les dones que han passat càncer de mama i han estat tractades amb 'tamoxifeno', un antiestrogen, tenen un risc elevat perquè té un efecte estimulant en l'endometri que pot ajudar al desenvolupament i creixement

del càncer d'endometri. Tot i això, es segueix utilitzant el tamoxifeno perquè té més benefici per les pacients de càncer de mama o d'ovaris, que risc de patir càncer d'endometri.

- Antecedents personals de certes malalties ginecològiques o Síndrome de l'ovari poliquístic: aquest síndrome produeix nivell d'estrògens més alts i nivells de progesterona<sup>3</sup> més baixos d'habitual, per tant, augmenta el risc en càncer d'endometri o hiperplàsia d'endometri, una proliferació de cèl·lules de l'endometri. La hiperplàsia d'endometri es considera una lesió precursora del càncer d'endometri.
  
- Un augment en els nivells d'estrògens, ja que ajuden a estimular la formació del revestiment de l'úter i això, pot fer que es presenti un creixement excessiu de l'endometri i del càncer. Aquest augment pot donar-se per causes endògenes<sup>4</sup> o exògenes<sup>5</sup>.
  - Desequilibri natural en algunes dones.
  - Ús de la ingesta d'estrògens externs, en forma de teràpies hormonals que només tenen estrògens, després la menopausa.
  - Les dones que mai han estat embarassades tenen major risc. Com més fills es té menor és el risc a patir càncer d'endometri.
  - Tenir més cicles menstruals al llarg de la vida augmenta el risc per motius hormonals. Les píndoles anticonceptives que contenen estrògens i progesterona redueixen el risc.
  
- El sobrepès, la obesitat i la diabetis augmenta el risc ja que modifica el nivell d'estrògens i els seus efectes.
  
- Factors geogràfics: Les dones que viuen a Amèrica del Nord o a Europa tenen major risc.

---

<sup>3</sup> *Progesterona*: Hormona sexual que segrega l'ovari femení i la placenta, i que té la funció de preparar l'úter per a la recepció de l'òvul fecundat.

<sup>4</sup> *Endogen*: Quelcom que s'origina a l'interior.

<sup>5</sup> *Exogen*: Quelcom que s'origina a l'exterior.

Hi ha diversos símptomes que podrien indicar que es tracta de càncer d'endometri. Aquests són:

- Sagnat vaginal anormal, com un canvi en els períodes mensuals o sagnat entre períodes després de la menopausa. Aquest símptoma també pot ocórrer en afeccions no canceroses per això, és important que un doctor ho examini immediatament si es presenta qualsevol sagnat irregular.

La secreció vaginal sense sang també pot ser senyal de càncer d'endometri. Que no hi hagi sang no significa que no hi hagi càncer. En un 10% dels casos relacionats amb el càncer, la secreció no és sanguinolenta.

- Un dolor en la pelvis, dificultat a l'orinar, sentir una massa (tumor), i perdre el pes inesperadament també poden ser símptomes de càncer d'endometri. Aquest símptomes solen ser més comuns en les últimes etapes de la malaltia.

Una vegada la pacient arriba al metge amb el signe del sagnat genital anòmal es realitza a partir d'una ecografia transvaginal que ens permet, descartar patologia orgànica i el mesurament del grossor endometrial en un tall longitudinal.

Davant la sospita clínica i l'ecografia es recomana una biòpsia endometrial. Si la biòpsia es negativa, es recomana realitzar una histeroscòpia<sup>6</sup> diagnòstica i una biòpsia dirigida.

Aquestes proves realitzades, ens ajudaran a decidir si la pacient és candidata al tractament quirúrgic i valorar l'extensió de la malaltia per a adequar la radicalitat de la cirurgia.

---

<sup>6</sup> *Histeroscòpia*: procediment clínic que permet al ginecòleg veure l'interior de l'endometri per mitjà d'una endoscòpia.

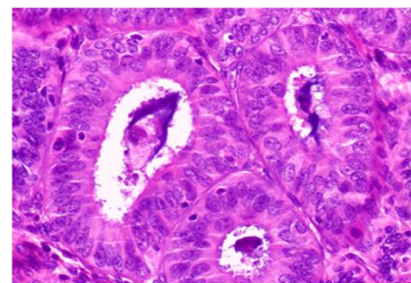
Els estudis que es recomanen prèviament al tractament són:

Tipus d'estudi	Característiques
Anamnesis	Identificació de factors de risc
Exploració	Valoració de l'estat general de la pacient, exploració ginecològica.
Analítica completa	Hemograma bioquímica i estudi de la coagulació
Biòpsia endometrial	Tipus histològic
Ecografia abdominopèlvica	Grandària tumoral, valoració nivell infiltració miometrial, valoració de la infiltració de l'estroma cervical
TC abdominopèlvic	Valoració de la malaltia extrapèlvica.

L'estadificació del càncer endometri es quirúrgica, i s'evalua el tipus histològic, el grau histològic i el estadiatge FIGO que mesura el grau de disseminació del tumor en el cos. En base a l'estadificació es guiarà el tractament adjuvant que rebrà la pacient i que serà de radio i/o quimioteràpia.

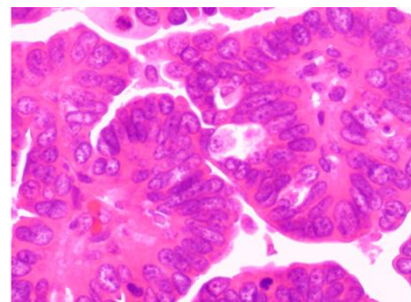
Al parlar del càncer d'endometri s'ha de destacar dos tumors diferents, no només histològicament sinó en la seva biologia, pronòstic i tractament.

-*Tipus 1:* Adenocarcinoma de tipus endometriode, hormodependent. Es relaciona amb la exposició a estrògens. En general tenen bon pronòstic i una lenta evolució. Són els 80-90% dels casos, són mucinosos. A la dreta podem observar una imatge microscòpica.



Fotoarafia realitzada per la Dra. Colàs

-*Tipus 2:* Freqüent en la postmenopausa, no respon a un tractament hormonal. Es tracten de tumors d'alt grau que histològicament corresponen a carcinomes de tipus serós i de cèl·lules clares. Tenen pitjor pronòstic que els de tipus 1, amb una evolució més agressiva. Són el 10-20% dels casos, són serosos. A la dreta podem observar una imatge.



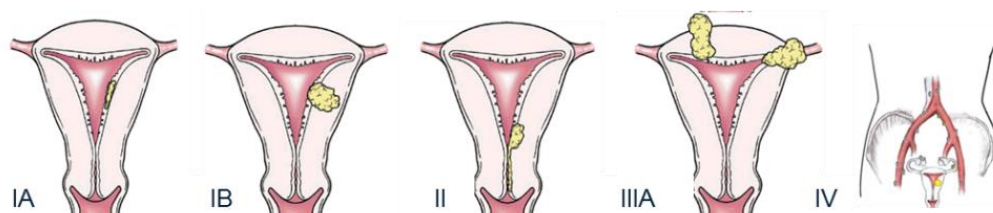
Fotografia realitzada per la Dra. Colàs

*Grau histològic FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia)*

G1	Ben diferenciat	<5%
G2	Moderadament diferenciat	6-50%
G3	Poc diferenciat	>50%

*Estadiatge FIGO*

FIGO 2009	
ESTADI I	Tumor confinat al cos de l'úter
IA	No invasió del miometri o inferior a la meitat
IB	Invasió del miometri igual o superior a la meitat.
ESTADI II	Tumor que envaeix l'estroma cervical sense estendre més enllà de l'úter.
ESTADI III	Extensió local i regional del tumor
IIIA	Tumor que envaeix serosa del cos uterí
IIIB	Afectació vaginal i parametrial
IIIC	Metàstasi en ganglis pèlvics i paraaòrtics
IIIC1	Ganglis pèlvics positius
IIIC2	Ganglis paraaòrtics positius amb o sense ganglis pèlvics positius
ESTADI IV	Tumor que envaeix mucosa bufeta i recte, i metàstasi a distància
IVA	Tumor que envaeix mucosa vesical i rectal
IVB	Metàstasi a distància



*Esquema realitzat per la Dra. Colàs*

### 3. TRACTAMENTS

#### *Tractaments per càncer d'endometri tipus 1*

El tractament quirúrgic segueix els criteris de la FIGO, es recomana una limfadenectomia pèlvica (extracció dels ganglis limfàtics) en estadis avançats de forma sistemàtica, i en estadis inicials com el IA G1-G2, en funció dels factors de risc i de pronòstic.

El tractament radioterapèutic depèn de la profunditat de la invasió miometrial, el grau del tumor i la conveniència quirúrgica. A més de factors com: edat major de 60, i grandària del tumor major que 20 mm, entre d'altres.

El tractament quimioterapèutic després de la radioteràpia, pot considerar-se adequat a estadis d'alt risc com, IB G3, II G3 i IIIA / IIIB. Els estadis IIIC i IV han d'efectuar la radioteràpia amb quimioteràpia després de la cirurgia. La quimioteràpia sol ser aplicada cada 21 dies.

El tractament hormonal, els gestagèns (una de les cinc classes principals d'hormones) són una opció pel tractament primari en una pacient inoperable o quan el tumor està ben diferenciat i expressa receptors hormonals.

#### *Tractaments per càncer d'endometri tipus 2*

En el tractament quirúrgic, es recomana una estadificació completa que inclourà: una omentectomia<sup>7</sup> i una biòpsia peritoneals en tots els estadis de la malaltia.

En el tractament quimioterapèutic, els tumors serosos que demostren una història natural amb risc alt de recidiva local, són sempre candidats a aquest tractament.

El tractament radioterapèutic és recomanable aplicar-ho després de la quimioteràpia en casos específics com és per exemple, l'estadi FIGO IA amb afectació limitada al endometri i sense residual.

---

<sup>7</sup> *Omentectomia*: extracció del epipló major, una capa membranosa de doble de teixit gras que tapa i suporta els intestins i òrgans en l'abdomen inferior.

#### 4.PART PRÀCTICA

Avui dia, la medicina personalitzada no és una realitat en la pràctica assistencial, però sí que és una realitat en contextos molt específics on grups de recerca i clínics treballen molt de la mà, com és el cas del Grup de Recerca Biomèdica en Ginecologia i el Departament de Ginecologia del Hospital Vall Hebron. Així doncs, la medicina personalitzada en aquest cas comença a l'estabulari.

L'estabulari és el lloc on es troben tots els animals en estudi, i es realitzen tots els experiments.

##### 4.1.Mesures de protecció per a l'accés

Per entrar a l'estabulari has de passar una sèrie de controls d'higiene, és el que es diu anar de brut a net. És necessari fer-ho perquè els animals són immunodeficients, és a dir, no tenen sistema immunològic (no tenen defenses contra els microbis).

Només entrar hi ha un primer control on has de posar-te una bata de color verd a sobre de la roba. Tot seguit passes per un passadís fins a arribar a un altre control on et trobes un banc metàl·lic que t'impedeix passar. Aquest banc metàl·lic serveix per posar-te els peücs de la manera següent: primer t'has de seure i posar-te un peüc i automàticament passar aquest peu a l'altre costat del banc, després es fa el mateix procés amb l'altre peu. Un cop passat el banc metàl·lic t'has de tancar el cabell i la boca amb els estris convenients i per últim t'has de



posar els guants. Fet tot això ja pots entrar a la part on hi són tots els animals no immunodeficients.

En la imatge de l'esquerra us mostro com és aquesta primera vestimenta, i també es pot apreciar el banc metàl·lic per darrere.

Un cop hem entrat dintre, hem de passar un altre control per poder accedir on són els animals amb els que hem de treballar.

Primer s'entra a una habitació on hi ha una sèrie de taquilles per poder guardar la roba i tot el que portes fins a quedar-te en roba interior. Tot seguit hem de tornar a fer el mateix procés de canvi de peücs de brut a net i un cop hem passat el banc metàl·lic passem a una altre habitació on ens hem de vestir amb la roba especial per entrar a treballar amb els animals.

Primer ens hem de posar la granota sense que les mànigues toquin a terra, tot seguit ens posem uns crocs als peus, després la mascareta i la caputxa de la granota a sobre d'una reixeta pel cabell i per últim, els guants per sobre les mànigues de la granota. Un cop vestits, posem una mica de desinfectant a les mans a sobre dels guants i ja podem entrar a la part del animals.

A continuació mostro una imatge d'aquesta segona vestimenta però, sense els crocs.



El procés de sortida és el mateix que d'entrada però a l'inrevés, ens hem d'anar traient la roba de la mateixa manera que ens l'hem posada. Tota la roba va a les escombraries.



## 4.2. Experimentació a l'estabulari

A continuació explicaré la part pràctica que he pogut experimentar dintre de l'estabulari amb els investigadors.

La primera part d'aquesta experimentació l'anomenem Pase i consisteix a implantar els tumors en els ratolins. I la segona part són les Teràpies, és a dir, el seguiment de la medicació per curar el tumor.

## 4.3. Pase (4/8/16 i 10/8/16)

Abans de començar la primera part pràctica faré una petita introducció per entendre d'on vénen els tumors i els ratolins amb els quals es treballa.

Quan a la nostre pacient LL001 (per preservar la identitat de les pacients, utilitzarem les inicials del seu lloc de procedència, en aquest cas Lleida, i el número de la caixa dels ratolins d'aquesta) se li va detectar el càncer d'endometri, el primer que se li va fer és la cirurgia i extirpació del tumor, que és el tractament més important que la pacient rebrà. D'aquesta operació el ginecòleg extreu tota la massa tumoral, que és portada a anatomia patològica per tal d'obtenir un diagnòstic definitiu. El patòleg és la persona que facilita una porció d'aquest tumor, la grandària d'aquesta porció depèn de de la grandària del tumor del pacient. Aquesta porció s'implanta en els dos flancs, a sobre de les cuixes, d'un o dos ratolins, que triguen aproximadament 7 mesos en desenvolupar el tumor. Una vegada desenvolupat es va poder implantar el tumor en nous ratolins genèticament iguals entre ells per poder fer l'estudi de les teràpies, creant una cadena de generacions, la qual acaba un cop s'ha arribat a la quantitat de ratolins necessària per fer l'estudi de les teràpies. Un cop arribes a aquest punt ja no cal fer més Pases. Abans, però, de passar a l'estudi de les teràpies s'ha de comprovar que el tumor generat en el ratolí és igual al de la pacient, per tal de tractar a l'avatar de la pacient. Es fan estudis amb H&E (hematoxylin and eosin), de tincions immunohistoquímiques<sup>8</sup> i estudis moleculars comparant el teixit tumoral de ratolí i pacient. Si és igual, es procedeix a fer les generacions i l'estudi de teràpia.

---

<sup>8</sup> *Immunohistoquímiques*: és un procés especial de coloració amb tinta que es realitza a un teixit cancerós fresc o congelat extirpat durant una cirurgia.

Aquests ratolins conviuen en caixes on poden habitar només sis ratolins. Aquestes caixes es troben en una habitació connectades a una màquina que controla l'aire i les hores de llum i de nit, és a dir, a les vuit de la nit totes les llums de l'estabulari s'apaguen fins a les vuit del matí de tal manera que així els ratolins tinguin 12 hores de nit. Per poder diferenciar els ratolins de cada caixa, se'ls fan forats a les orelles, de tal manera que hi hagi sis marques diferents per cada un dels ratolins.
















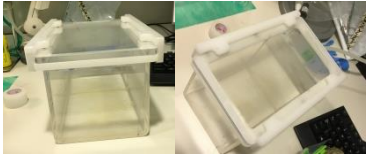


En aquesta imatge es pot apreciar la màquina on es troben connectades les caixes, i com s'emmagatzemen aquestes.



I en aquesta, es pot apreciar una de les caixes per dins.

Detall del material necessari per a fer el Pase

<p>DESINFECTANT</p> 	<p>3 POTS DE NaCl</p> 	<p>2 POTS DE GEL</p> 
<p>PAPER</p> 	<p>PINZES PER COSIR</p> 	<p>CÀPSULES DE PETRI</p> 
<p>GASES</p> 	<p>FIL PER COSIR</p> 	<p>XERINGUES</p> 
<p>TISORES</p> 	<p>CINTA ADHESIVA</p> 	<p>2 MANTES TÈRMiques</p> 
<p>2 PINZES</p> 	<p>ANALGÈSIC</p> 	
<p>TALLES ESTÈRILS</p> 	<p>CAIXA D'ANESTESIA</p> 	

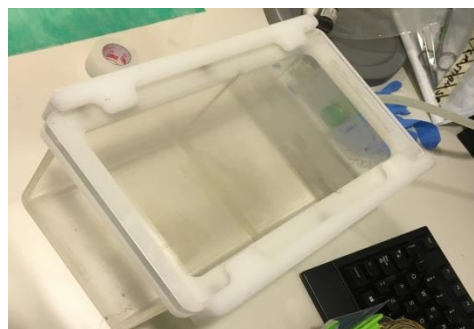
#### 4.3.1. Preparació

Primer de tot s'ha de netejar bé el lloc de treball, amb el desinfectant i el paper. Fet això, es connecten les mantes tèrmiques i a sobre s'enganxen amb cinta adhesiva a les talles estèrils de tal manera que sigui un espai esterilitzat.

Tot seguit es prepara la màquina d'anestèsia i els tubs, dos dels quals aniran enganxats a les talles estèrils, per fixar el punt on hi haurà l'animal i un altre de diferent anirà connectat a la caixa de l'anestèsia per a adormir els ratolins.

En la imatge de l'esquerra es pot veure la màquina d'anestèsia i com se li aplica l'anestèsia, i també es pot veure com s'enganxa el tub a un dels draps de quiròfan.

A la imatge de la dreta es pot veure la connexió del tub a la caixa d'anestèsia.



#### 4.3.2 Extracció del tumor

En acabar les teràpies, els ratolins que sobrepassen la màxima grandària dels tumors ( $3000 \text{ mm}^3$ ) han de ser sacrificats.

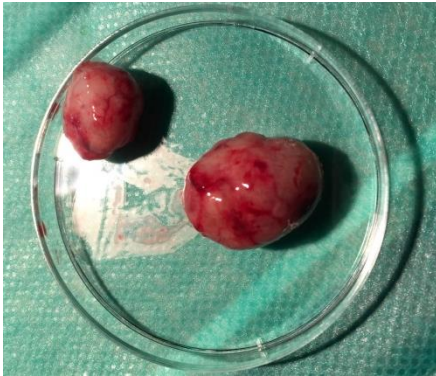
El sacrifici es realitza mitjançant la dislocació cervical. És el mètode més ràpid i menys dolorós per als ratolins.



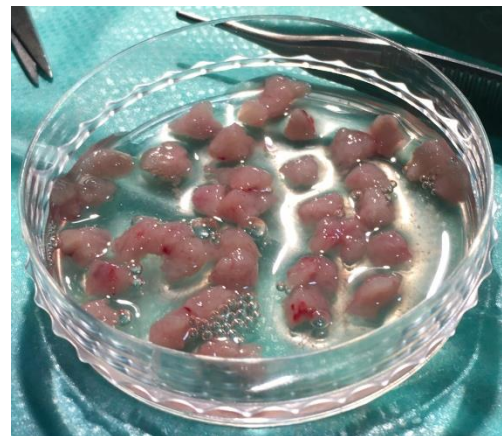
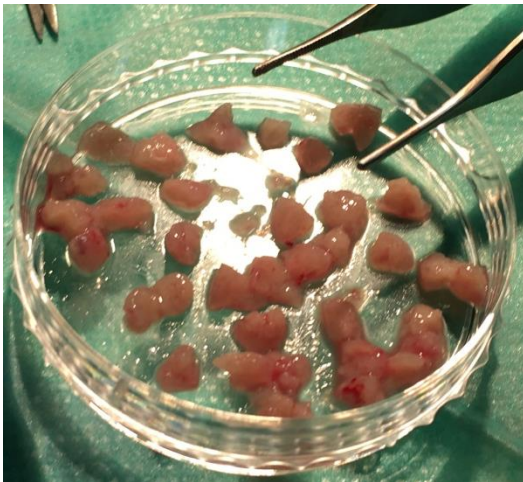
En aquesta imatge podem observar el ratolí ja sacrificat i la grandària dels tumors.

Un cop sacrificat el ratolí s'extreuen els tumors, he de dir que no sempre es desenvolupen els dos tumors. Els ratolins sacrificats, es posen en unes bosses hermètiques i un personal especialitzat s'encarrega d'ells.

Quan ja hem extret el tumor agafem sèrum fisiològic per poder netejar-ho, de tal manera que no quedi pus, sang, etc. Hi ha diferents tipus de tumor, a vegades el tumor creix massa ràpid i no es desenvolupa correctament, és a dir, no ha aconseguit formar els vasos sanguinis corresponents i quan s'extreu és un tumor molt flàccid. En canvi, si ha tingut el temps necessari per crear-se bé es formen uns tumors compactes com en la imatge de l'esquerra.



Una vegada tenim els tumors nets, els fem petits trossets de manera que quedin com a les següents imatges.



#### 4.3.3. Emmagatzematge

A continuació hem de preparar 4 tubs petits, tres per al biobank (és el congelador on es guarden mostres de tumors per a un futur poder-los implantar de nou en animals) i un per disposar de material per a estudis moleculars, i una capsa per immunohistoquímica. La quantitat de tumor que va en cada tub varia segons la quantitat que hagi quedat amb els trossets perquè, hem de tenir en compte que



després els trossets restants els hem d'implantar en els nous ratolins, dos per cada ratolí.

En aquesta imatge es poden veure els tres tubs de biobank i el de teixit.

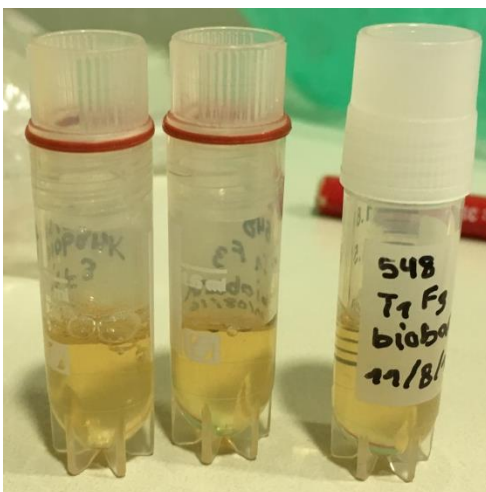
Cada tub s'ha de marcar amb el número del ratolí sacrificat, la generació en la que el tumor s'ha desenvolupat (F), si el tub és per biobank o per congelar directament; i la data del dia en què s'ha extret.



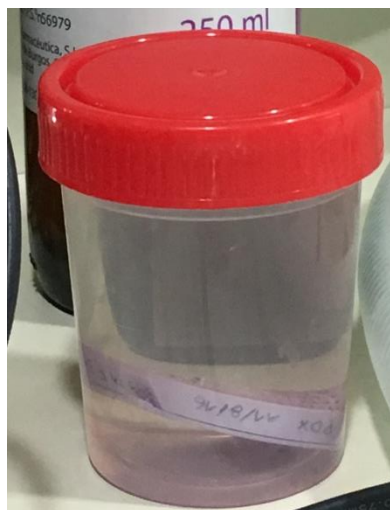
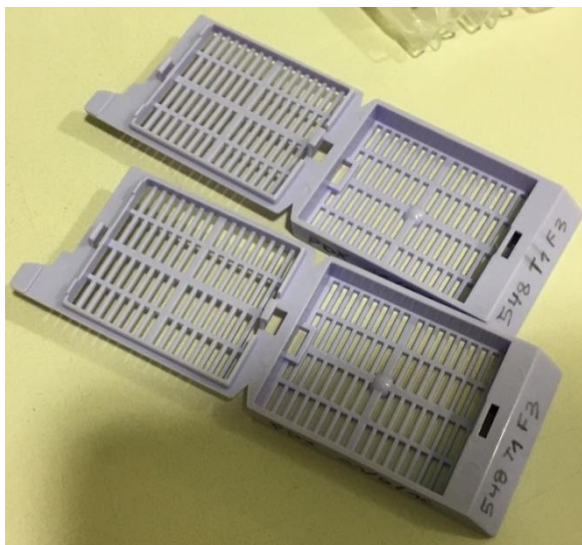
A cada tub de biobank s'ha de posar 900 ml de FBS (Fetal bovine sèrum) per a que la mostra es mantingui en bones condicions i 100 ml de DMSO (Dimetil Sulfòxid) que impedeix la creació de cristalls per a poder congelar-ho i que la mostra sigui viable.

Una vegada hem introduït el teixit desitjat pel seu emmagatzematge, el tub per als estudis moleculars passen directament a un recipient amb nitrogen per després passar al congelador.

En canvi els tubs que van al biobank un cop fets es posen en uns pots amb gel, per tal de que el DMSO penetri dins del teixit. Després al congelador es posen en un regulador de temperatura per tal que la congelació sigui controlada i progressiva.



I per últim la capsa de immunohistoquímica, també s'ha de marcar igual que els tubs però, els tubs es marquen amb permanent i les "reixetes" amb llapis per tal que el formaldehid<sup>9</sup> al 4% del pot on ha d'anar la reixeta no ho esborri.



#### 4.3.4 Implantació del tumor

Quan ja tenim totes les mostres preparades comencem amb les implantacions als nous ratolins.

El que primer hem de fer és posar els trossets de tumor i els estris que necessitarem a mà.

En primer lloc hem d'adormir els ratolins a la caixa. Els adormirem de dos en dos ja que en aquesta ocasió hi ha dues persones que realitzaran les implantacions.



Quan els ratolins ja són totalment adormits, els passem a sobre de les mantes tèrmiques que tenen a sobre els draps de quiròfan i posem la boca dels ratolins als tubs per a que continuïn adormits per a la intervenció (tal com es pot observar en la següent imatge).



<sup>9</sup> Formaldehid: compost químic altament volàtil i inflamable.

Abans de començar s'ha de comprovar que està totalment adormit estrenyent una mica la pota, si hi ha resposta vol dir que encara s'ha d'esperar una mica, si no, ja es pot començar posant iode a la seva esquena per a desinfectar.



Tot seguit se li injecta analgèsic (Metacam®) per a que quan es despertin no sentin tant de dolor.



Fet tot això, ja es poden fer les dues incisions als costats baixos de l'esquena, posar un tros a cada forat i cosir. Enquadrades amb negres es poden veure a la imatge les incisions marcades. Les incisions es fan de la següent manera: s'agafa



la pell amb unes pinces i es fan els talls en diagonal amb les tisores quirúrgiques. Per a fer els forats més amplis, es posen les tisores tancades dins del forat i s'obren de tal manera que el forat es fa més

gran.

Fet això es posen els trossets de tumor a cada forat.

Per últim quan ja hem acabat s'ha de cosir tot bé i esperar a que es despertin una mica per a posar-los un altre cop a la caixa.





#### 4.4. Control del creixement tumoral i canvi d'aigua

Un cop acabem amb tots els nous ratolins i estan tots a les caixes corresponents, se'ls ha de canviar l'aigua. Aquest és un procediment que s'ha de fer dues vegades a la setmana. Els ratolins tenen l'aigua barrejada amb una hormona,  $\beta$ -estradiol, donat que és necessària per al creixement dels tumors hormona-dependents, com en aquest cas el càncer d'endometri. Aquesta hormona és sensible a la llum per això l'aigua es posa en el que anomenen biberons però són totalment negres per a que la llum no passi. En la imatge de la dreta es pot veure un biberó.

Quan ja s'ha canviat l'aigua els ratolins tornen a les caixes i al seu lloc corresponent.

De moment no es marquen els ratolins perquè encara s'ha d'esperar que els tumors creixin (això sol tardar de dos a sis mesos). Només els animals amb tumors crescuts formaran part de l'experiment de teràpia. Hi ha d'haver un control setmanal per controlar si el tumor ha crescut o no.



#### 4.5. Teràpies

Quan en un dels controls setmanals després del Pase es veuen senyals que a alguns ratolins els hi està reaccionant el càncer i els tumors estan creixent, se'ls aparta dels altres i se'ls posen caixes repartint sis a cada caixa que es diferenciaren a partir de forats a l'orella de tal manera que hi hagi una combinació per a cadascun sense repetir cap. En el nostre cas tindrem dues caixes, LL001 i LL002.

En les imatges de sota es pot observar com es marquen les orelles dels ratolins i l'estri que s'utilitza.



#### 4.5.1 Selecció dels animals

Les drogues que utilitzem per a les teràpies són: Bortezomib, Paclitaxel, Carboplatin, cadascuna d'elles dissoltes en una base de NaCl (Clorur de Sodi), per tant també aplicarem la base (NaCl) per a assegurar-nos que no és la única causant d'una bona recuperació si no que són les drogues utilitzades. S'ha establert un protocol estandarditzat consensuat a partir de la pauta que descriu el Bortezomib i diversos articles i informació que s'ha llegit. Generalment es té en compte la toxicitat, el temps que la droga es manté a la sang, la seva estabilitat i absorció pel tumor...

Se segueix el següent ordre alternant les dues caixes. Per tal de poder explicar-ho millor utilitzaré la taula d'Agost que es va utilitzar.

Agost 2016						
Dilluns	Dimarts	Dimecres	Dijous	Divendres	Dissabte	Diumenge
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30					



LL001 rep tot; LL002 Bortezomib.



LL002 rep tot; LL001 Bortezomib

Com bé es pot veure, cada tres dies es farà una aplicació de teràpies, alternant els dies de manera que un dia tota una caixa rebí el tractament complet i l'altre, només el Bortezomib.

#### 4.5.2 Preparació de teràpies

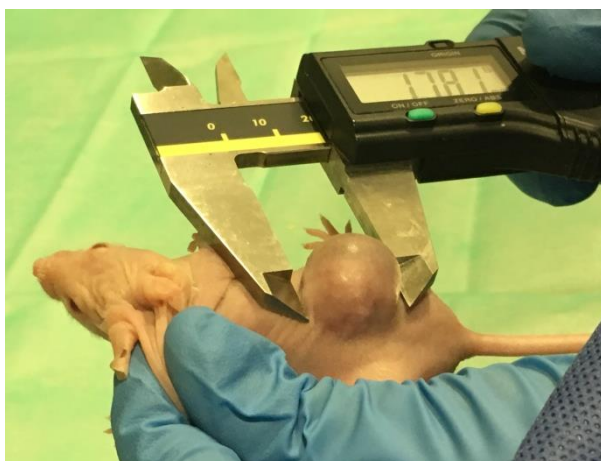
Abans de començar les teràpies hem de deixar la zona de treball estèril. Per tant, primer hem de netejar la taula amb el desinfectant i després enganxar a la taula amb cinta adhesiva les talles quirúrgiques. En la imatge de sota es pot observar la taula quirúrgica amb els estris que utilitzarem.



#### 4.5.3 Aplicació dels tractaments

El material que utilitzarem són: tres parells d'agulles una d'elles diferent d'1 mm amb la punta de 23 g perquè una de les drogues (Paclitaxel) és viscosa, un mesurador per a mesurar els tumors, les drogues, una balança, una llibreta i un bolígraf (per a apuntar el pes dels ratolins i la mesura dels tumors).

El primer que fem és pesar els ratolins i mesurar els tumors. Els tumors s'han de mesurar formant una creu per a apreciar el diàmetre gran i el petit. A les imatges següents es poden observar com es pesen a la balança i com es mesura el tumor.



Hem d'apuntar tots els resultats per a després poder fer les estadístiques necessàries. A la taula de sota es pot observar les dades que es van recollir en una de les teràpies de juliol, només hi ha tres animals en cada una perquè els altres van morir.

LL001	PES	D	d
0	27,7	16,92	15,92
ODI	27,4	16,36	16,49
OI	25,5	8,77	7,94

LL002	PES	D	d
0	28,1	11,72	11,67
OD	27,8	6,68	6,34
OI	26	7,70	6,68

És important pesar-los bé ja que la quantitat de droga que se'ls ha d'injectar varia amb el seu pes. Per exemple, a la caixa LL002 al ratolí OI (forat a l'orella esquerra) se li havia d'injectar Paclitaxel i Carboplatin. Tenint present la graella que hi ha a sota es pot saber quina quantitat s'ha d'injectar.

Peso Raton (g)	Paclitaxel Volumen per administrat ion (ul)	Carboplatin o Volumen per administrat ion (ul)	Bortezomib Volumen per administrat ion (ul)
17	37,78	42,50	14,17
18	40,00	45,00	15,00
19	42,22	47,50	15,83
20	44,44	50,00	16,67
21	46,67	52,50	17,50
22	48,89	55,00	18,33
23	51,11	57,50	19,17
24	53,33	60,00	20,00
25	55,56	62,50	20,83
26	57,78	65,00	21,67
27	60,00	67,50	22,50
28	62,22	70,00	23,33
29	64,44	72,50	24,17
30	66,67	75,00	25,00
31	68,89	77,50	25,83
32	71,11	80,00	26,67
33	73,33	82,50	27,50
34	75,56	85,00	28,33
35	77,78	87,50	29,17

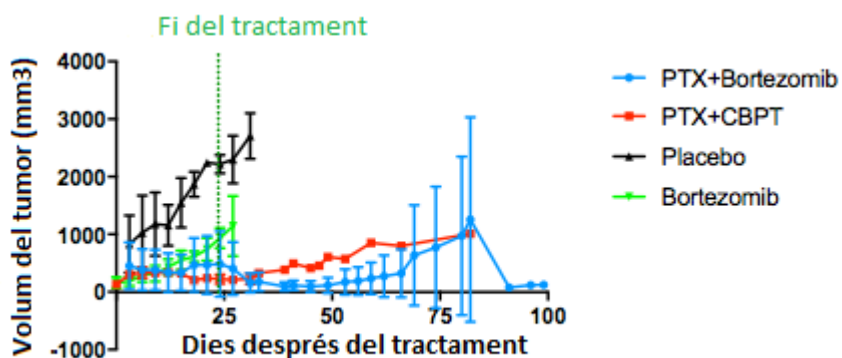
El pes el ratolí OI és de 26g per tant, se li ha d'injectar 57,78 ul de Paclitaxel i 65 ul de Carboplatin. A la imatge següent es pot observar com s'injecten les drogues.



#### 4.5.4 Resultats estadístics

Una vegada aconseguim una sèrie de resultats, els recopilem tots de tal manera que així puguem comprovar com està funcionant exactament el tractament.

En una primera recollida de dades, es va poder comprovar que realment el tractament amb la barreja de Paclitaxel i Bortezomib funcionava bé i que, en acabar el tractament el creixement del tumor era controlat, com bé es mostra en la gràfica 1.



GRÀFICA 1

En aquesta primera gràfica podem observar els diferents resultats de les diferents drogues que es van provar.

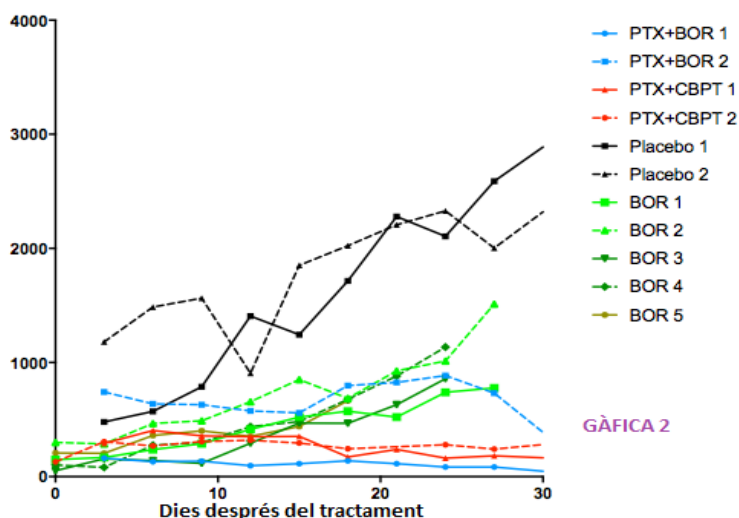
**Placebo (la base, el NaCl)**, en aquesta fase es demostra que si no s'aplica cap mena de tractament a la pacient, el tumor augmenta més ràpid.

**PTX (Paclitaxel) + Bortezomib**, és el tractament que mostra els millors resultats, tant quan s'estan aplicant les drogues, com quan s'acaba el tractament que el creixement no augmenta molt bruscament.

**PTX + CBT (Carboplatin)**, aquest tractament és el que rep actualment la pacient. Es pot observar que els resultats són semblants al PTX + Bortezomib, però l'altre té millors resultats.

**Bortezomib**, una monoteràpia que no té un efecte tan marcat com les teràpies de barreja de dues drogues, però té efecte.

En la gràfica 2, es pot observar un zoom de la primera gràfica on s'observa la diferència real entre el placebo i el bortezomib i demostra que realment funciona.

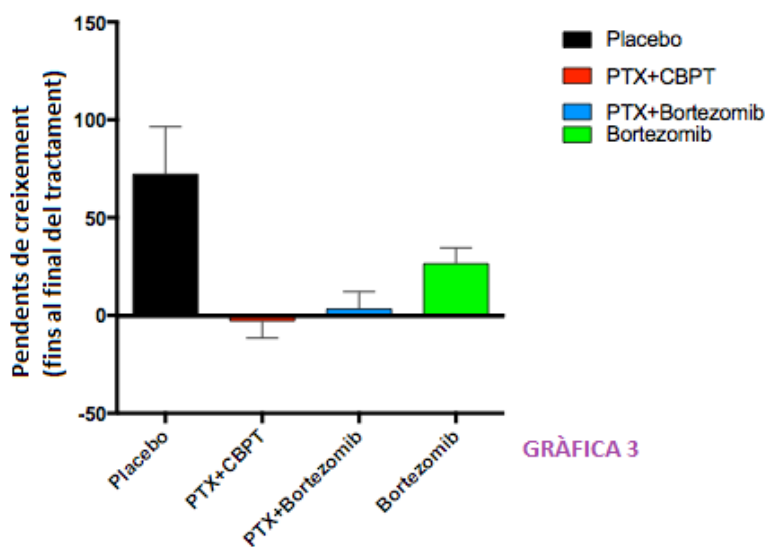


GRÀFICA 2

En una primera decisió, es van comunicar els resultats obtinguts als metges i als altres investigadors però la oncòloga, no va considerar convenient aplicar aquest tractament a la pacient perquè la combinació tenia massa toxicitat per a ella. Un cop van saber això, van decantar-se per la monoteràpia del Bortezomib.

Van pensar que la primera vegada que es va provar el Bortezomib no actuava tant eficaçment perquè estaven utilitzant una concentració de 0'25 mg/kg, de tal manera que van anar augmentant les dosis per veure si hi afectava.

Amb una caixa paral·lela d'animals, van aconseguir arribar a resultats bons amb una concentració de 1 mg/kg, es mostra en la gràfica 3.

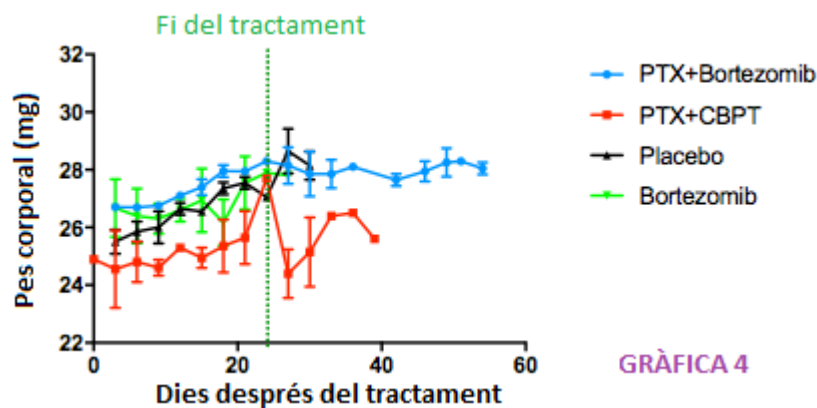


GRÀFICA 3

En aquesta tercera gràfica comparem el promig del pendent de creixement de cada tumor. On es pot observar la gran diferència de pendent entre el placebo i el Bortezomib. Aquests resultats ens demostren que aplicant la

monoteràpia del Bortezomib, el tumor creixerà de manera més lenta.

En la gràfica 4, observem la variació del pes corporal amb el pas dels dies. En el cas en què augmenta més el pes corporal en menys temps, és el placebo. Això és degut a que el tumor s'ha desenvolupat més en comparació amb les teràpies.



GRÀFICA 4

## CONCLUSIONS

He d'admetre que, al principi de tot aquest gran projecte, no les tenia totes amb mi. Al veure la gran importància del tema i tot el treball que havia de fer, vaig patir una angoixa que em va fer dubtar sobre si continuar amb el projecte o no. Gràcies als consells i la persistència de la meva mare, vaig centrar-me i vaig reaccionar favorablement davant aquesta situació.

Una de les coses que aquest treball m'ha aportat, ha estat aprendre a saber moure'm per buscar la informació que necessitava i poder interpretar els articles mèdics que m'eren proporcionats. Gràcies a aquesta informació, els meus coneixements sobre el càncer i totes les seves característiques i factors han augmentat considerablement.

El fet d'haver volgut començar a treballar durant l'estiu, m'ha proporcionat la possibilitat d'invertir molt de temps en visites al VHIR, on vaig poder realitzar tota la part pràctica i també arribar a comprendre la importància de les investigacions per a un avenç en la medicina. Allà, em vaig adonar també de les dificultats que els investigadors tenen per a poder realitzar el seu treball degut a la manca de pressupostos i tot el temps perdut en burocràcia per a aconseguir una mínima inversió.

Durant la interpretació de les gràfiques i els seus resultats (última part del projecte), van sorgir uns petits problemes degut a la diferència pel que fa al sistema operatiu dels ordinadors de la Dra. Eva i meu. Aquest problema va ser fàcil de solucionar gràcies al préstec i utilització d'ordinadors propers amb el mateix sistema operatiu.

He d'estar especialment agraïda a l'Eva, per la seva paciència i la constant ajuda que m'ha proporcionat en tot moment; sense ella no hauria pogut realitzar aquest complex treball. També agrair al Cristian Pablo Moiola, un investigador del VHIR que m'ha ajudat quan l'Eva no ha pogut estar disponible.

També agrair a la Laura Bueno i a l'Andrés Delgado (amiga i germà respectivament), pel seu ajut i la seva experiència en projectes i treballs d'aquest caire. Per últim, però no per això menys important, donar les gràcies a la meva tutora, per haver-me guiat i haver estat disponible sempre que ho he necessitat; així com també a l'institut, per l'oportunitat que m'han donat de poder viure aquesta gran experiència.

## BIBLIOGRAFIA

- ✚ American Cancer Society (2016) Cáncer de endometrio (uterino). URL: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeendometrio/guiadetallada/cancer-de-endometrio-uterino-early-signs-and-symptoms>
- ✚ American Cancer Society (2016) ¿Qué es el cáncer? Una guía para pacientes y sus familias. URL: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/aspectosbasicossobreelcancer>
- ✚ Bover, M. I. (2015) Cáncer de endometrio-útero. URL: <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/ginecologico/endometrio>
- ✚ Fundación contra el Cáncer (2012) Cáncer de endometrio. URL: <https://www.esmo.org/content/download/6602/115023/file/ES-Cancer-de-Endometrio-Guia-para-Pacientes.pdf>
- ✚ Garassino, M. (2013). Conjunto de guías ESMO para los pacientes: ESMO Medicina personalizada, 52.
- ✚ Garralda, E., Keren P. i Pedro, P. (2014). Clinical Cancer Research: Integrated Next-Generation Sequencing and Avatar Mouse Models for Personalized Cancer Treatment, 10.
- ✚ Girotti, M., Gremel, G., Lee, R., Gavani, E., Rothwell, D., Viros, A., et al. (2015). Application of Sequencing, Liquid Biopsies, and Patient-Derived Xenografts for Personalized Medicine in Melanoma, 15.
- ✚ Instituto Nacional del Cáncer (2015) ¿Qué es el cáncer?. URL: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- ✚ Oncoguía SEGO: Cáncer de Endometrio (2010). Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario, 28.
- ✚ Perna, M., Santo, V., Vrushank, D. (2013). Elsevier. Cancer Letters. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy, 12.
- ✚ Tentler, J., Choon, A., Weekes, C., Jimeno, A., Leong, S., et al. (2012) Nature Review. Clinical Oncology. 9, 338–350.