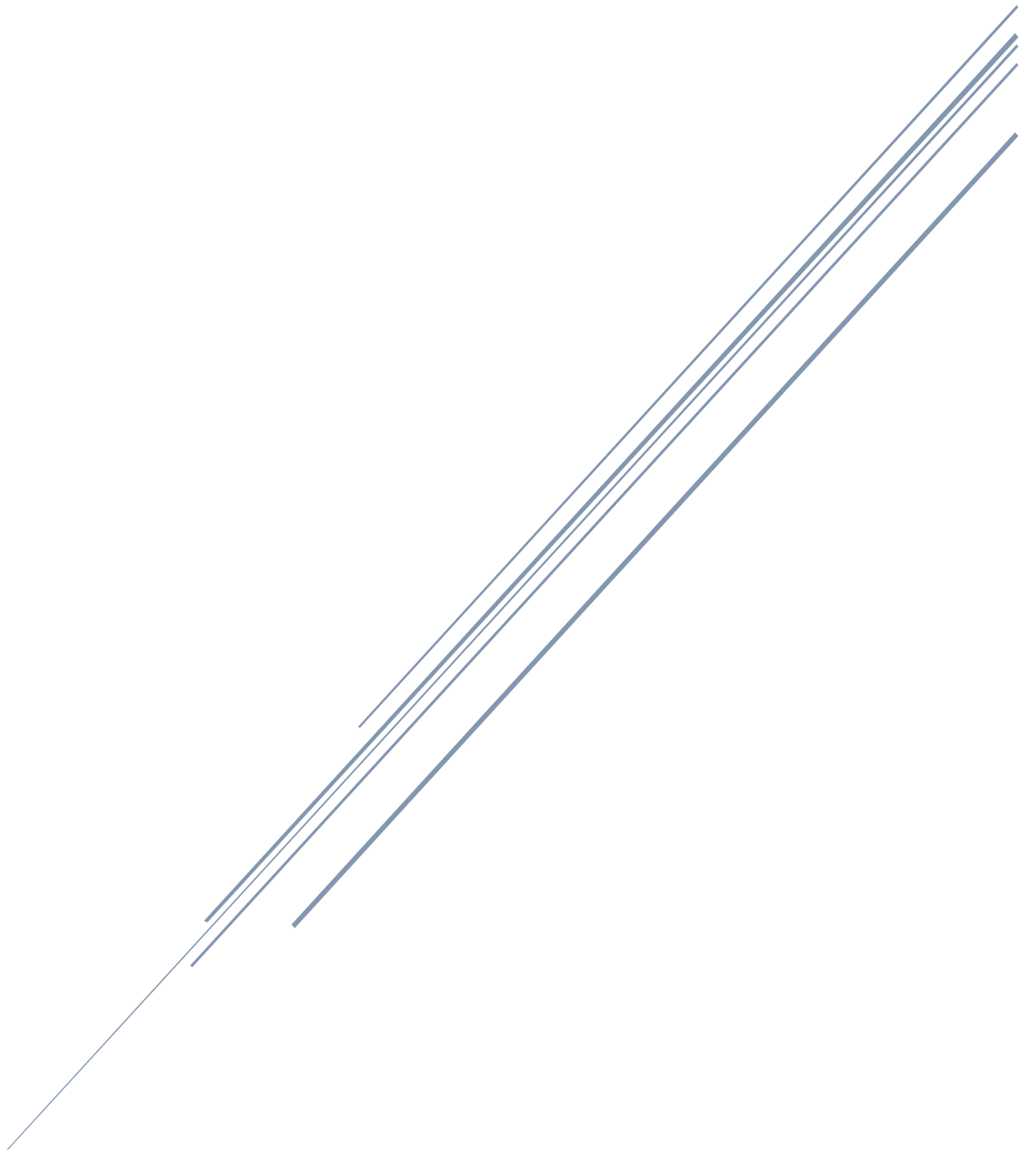


A la recerca de nous tractaments contra el  
càncer d'ovari intervenint sobre el cicle  
cel·lular tumoral



## **RESUMEN**

El cáncer de ovario constituye actualmente una de las causas de muerte por cáncer más importantes en mujeres. Esto es debido a la dificultad de su diagnóstico precoz y la resistencia de las células tumorales a los tratamientos convencionales.

Este trabajo persigue indagar, investigar, si procedimientos que inducen estrés a células tumorales de ovario podrían convertirse en nuevos tratamientos. Las situaciones de estrés analizadas han sido: la inducción de un déficit de nutrientes y la aplicación de un antibiótico antineoplásico (actinomicina D).

Para ello se han utilizado dos líneas celulares de cáncer de ovario mantenidas en cultivo *in-vitro*, midiendo la eficacia de cada tratamiento con la expresión del Ki67, un biomarcador indicador del índice de proliferación celular, siempre comparándolas con la actuación del mismo tratamiento también sobre células no-tumorales.

Los resultados obtenidos permiten concluir que ninguna de las situaciones analizadas son la solución idónea, ya que, además de afectar a las células tumorales, también lo hacen, en mayor o menor grado, sobre las células no tumorales. Por lo tanto, la investigación queda abierta a trabajar nuevas opciones.

## **ABSTRACT**

Ovarian cancer is currently one of the leading causes of cancer death in women. This is due to the difficulty of its early diagnosis and the resistance of tumoral cells to conventional treatments.

The aim of this project has been to research new treatment options. This area of research has been based on dealing with different stress situations in ovarian tumoral cells, in order to analyse whether these could become new treatments or not. The stress situations analysed were the induction of a nutrient deficiency and the application of an antineoplastic antibiotic (actinomycin D).

This has been done with different ovarian cancer cell lines, cultured *in-vitro*, measuring the effectiveness of each treatment by the expression of Ki67, a biomarker indicator of the cell proliferation index, in comparison with the action of the same treatment in non-tumoral cells.

The conclusions drawn from the research show that none of the situations analysed are the ideal solution, since they do not only affect tumoral cells but also non-tumoral cells. Therefore, research is open to work on new options.

# ÍNDIX

INTRODUCCIÓ .....	5
MARC TEÒRIC.....	9
1. El càncer.....	9
1.1. Incidència del càncer.....	9
1.2. Definició.....	11
1.3. El cicle cel·lular i el càncer .....	12
1.4. Diagnòstic i tractaments .....	17
2. El càncer d'ovari .....	22
2.1. Incidència del càncer d'ovari .....	22
2.2. L'aparell reproductor femení i el tumor ovàric .....	24
2.3. Tipus de tumors d'ovari i desenvolupament .....	25
2.4. Prevenció i diagnòstic del càncer d'ovari.....	27
2.5. Tractaments i seguiment del càncer d'ovari.....	30
3. Fases en la recerca de nous tractaments i noves línies d'investigació .....	35
OBJECTIUS.....	39
HIPÒTESIS.....	39
MARC PRÀCTIC .....	41
1. Material .....	42
2. Creació de cultius cel·lulars per a l'experimentació a partir de línies cel·lulars.....	42
2.1. Línies cel·lulars .....	43
2.2. Creació d'un cultiu cel·lular.....	43
2.3. Divisió d'un cultiu cel·lular .....	45
3. Establiment de la proliferació cel·lular a partir de l'indicador ki67.....	47
4. Anàlisi de la proliferació de les cèl·lules tumorals i no-tumorals sotmeses a diferents tractaments a partir de l'indicador ki67.....	53
RESULTATS .....	56
1. Càlcul de la proliferació de les cèl·lules no-tumorals i de les tumorals .....	56
2. Càlcul de la proliferació de les cèl·lules no-tumorals i de les tumorals en diferents situacions d'estrès. ....	58
2.1. Dèficit de nutrients .....	58
2.2. Actinomicina D .....	61
2.3. Cisplatí .....	63
CONCLUSIONS .....	66
BIBLIOGRAFIA I BIBLIOGRAFIA WEB .....	69
ANNEXOS.....	72



## INTRODUCCIÓ

Abans de començar el meu treball de recerca, tenia molt clar que el tema principal d'aquest havia de ser el càncer.

Crec que tothom estarà d'acord amb el fet que *càncer* és una de les paraules més temudes actualment. És una paraula que, a la majoria de persones, només escoltar-la, ens produeix una sensació de por, d'aquesta que et fa posar els pèls de punta.

A mi sempre m'ha fet molta por aquesta paraula, però també m'ha creat molta curiositat. Com pot ser que tingui tanta por d'una malaltia, d'una paraula, de la qual realment no sé gairebé res?

Per això, ja fa anys que el món de l'oncologia em sembla molt interessant i sempre que puc intento saber-ne més, d'aquesta part de la medicina i la recerca biomèdica. Mai he tingut gaire clar què volia estudiar quan acabés el batxillerat ni a què volia dedicar la meva vida. Però, d'alguna manera, encara que no en fos del tot conscient, sempre he sabut que m'agradaria aconseguir que a poc a poc tots i totes tinguem menys por d'aquesta malaltia.

Per aquest motiu, el que volia aconseguir amb aquest treball era saber més sobre el càncer: què és, què l'origina, els seus tractaments, les diferents vies d'investigació, etc., i sobretot, volia experimentar de primera mà el que és treballar en un laboratori d'investigació.

De manera que, després de contactar amb diferents laboratoris de recerca oncològica, el doctor Francesc Vinyals, el cap d'investigació del grup de Molecular Signaling del laboratori del programa Pro-Cure-ICO de l'IDIBELL, em va acceptar al seu grup de treball i em va posar en contacte amb la investigadora Agnès Figueras.

La primera etapa del treball, des del mes d'abril fins al mes de juliol, ha consistit a buscar informació i documentació sobre el càncer i, en especial, sobre el càncer d'ovari. A partir d'aquesta recerca he pogut establir els objectius i les hipòtesis del treball.

Un cop establertes les hipòtesis que es volien respondre, vaig poder començar la part pràctica, que s'ha desenvolupat durant dos mesos en un dels laboratoris que té l'IDIBELL a l'Institut Oncològic de Catalunya (ICO). Va consistir a provar diferents estratègies (dèficit de nutrients i administració d'un antibiòtic) que poden actuar sobre el cicle cel·lular de cèl·lules tumorals *in-vitro*, per tal d'aturar-ne la proliferació descontrolada i analitzar si aquestes estratègies poden funcionar com a nous tractaments.

La feina al laboratori ha resultat molt divertida i interessant. No vaig tenir gaires dificultats perquè l'Agnès o qualsevol membre del grup d'investigació (Núria, José Luis i Ferran) em van ajudar en tot moment i van fer el possible perquè entengués tot el que estava fent i per què ho feia. Ha resultat una experiència molt enriquidora, durant la qual vaig poder posar en pràctica moltes de les coses apreses a l'institut i vaig aprendre moltes de noves. També va ser una experiència molt reveladora, ja que em va fer adonar que en un futur m'agradaria treballar en un laboratori en la recerca oncològica.

En canvi, he topat amb força dificultats a l'hora de trobar informació sobre conceptes i termes tan específics i tècnics, perquè la majoria d'informació l'havia d'extreure d'articles, sovint en anglès i escrits en un registre científicotècnic molt complex.

Tot i així, el que m'ha semblat més difícil a l'hora de dur a terme el meu treball ha estat plasmar sobre el paper tot el que he après de manera comprensible per a tot aquell que el llegeixi, hagi sentit mai a parlar del tema o no. Per fer-ho, m'han estat molt útils algunes explicacions que donen tant el doctor Manel Esteller al seu llibre *Parlem de càncer. Més de 50 respostes als principals dubtes*, com Pere Estupinyà al seu llibre *El lladre de cervells. Tot compartint el coneixement científic de les ments més brillants*, en què expliquen de manera senzilla tot allò que es coneix sobre el càncer.

Encara que, en termes generals, ha estat un procés llarg, m'hauria agradat haver disposat de més temps per poder aprendre més tècniques i procediments d'un laboratori de recerca mèdica, experimentar totes les diferents fases d'una investigació i conèixer més sobre el càncer i els seus avenços.

Per acabar, m'agradaria agrair al doctor Francesc Vinyals i a tot l'equip del grup Pro-Cure-ICO del laboratori de l'IDIBELL, per acollir-me al seu laboratori, en especial a Agnès Figueras, per ser la meua guia en cada pas, resoldre'm tots els dubtes i ensenyar-me el funcionament d'un laboratori de recerca. També vull agrair a la meua tutora del treball de recerca, que m'ha assessorat en tot moment a l'hora de redactar i dur a terme el meu treball, assegurant-se que quedés el més perfecte possible. Finalment, també voldria agrair a la meua mare, que m'ha ajudat i donat suport sempre, i a la meua germana, estudiant de medicina, que, amb els seus coneixements, m'ha pogut aclarir molts dels conceptes científicotècnics que he tractat durant el treball.

També vull agrair al meu pare per ser una de les raons per les quals he tingut aquest tema tan present, que m'ha fet plantejar-me tantes preguntes i ,sobretot, ha fet que vulgui dedicar la meva vida professional a la recerca contra el càncer.

Com diu el periodista John Diamond, fent un joc de paraules amb la paraula anglesa *sentence* (que té doble significat en anglès, *sentència* i *frase*), “*cancer* is a word, not a sentence”. Amb aquest treball he après que la recerca ens permet perdre la por d'aquesta malaltia i deixar de considerar-la una sentència.





## MARC TEÒRIC

### 1. El càncer

El càncer no és una única malaltia, sinó moltes. S'anomenen càncer perquè totes tenen una característica comuna: la proliferació anòmla de les cèl·lules. Més enllà d'aquesta propietat fonamental, hi ha grans diferències entre aquestes malalties. Això fa que contínuament s'obrin noves línies d'investigació per a la recerca de tractaments i diagnòstics, cada cop més específics per a cada tipus de càncer.

#### 1.1. Incidència del càncer

Segons estudis realitzats per l'Organització Mundial de la Salut (OMS), el càncer és la segona causa de mort al món, ja que ocasiona al voltant de 10 milions de defuncions cada any i el 2030, es preveu un augment del 75 % en la incidència d'aquest grup de malalties.

El nombre de casos de càncer diagnosticats a cada regió del món és variant, depenent sobretot del nivell de desenvolupament de cada país. En general, la incidència és més elevada als països desenvolupats, degut que l'esperança de vida és superior a 65 anys, edat a partir de la qual el risc de desenvolupar la malaltia augmenta exponencialment. Paradoxalment, les dades mostren que la mortalitat en aquests països menys desenvolupats és molt superior a la dels països desenvolupats, a causa del pitjor estil de vida i la manca de recursos sanitaris en aquests territoris.

De fet, si analitzem les causes de mort principals en països amb nivell de desenvolupament extrem, veurem diferències evidents. Als països desenvolupats la principal causa de mort són les malalties cardiovasculars, seguides del càncer. Aquestes malalties habitualment es donen en persones en una edat avançada i són complexes de tractar, ja que no es coneix gaire sobre elles. En canvi, les principals causes de mort en els països subdesenvolupats són: en primer lloc, les malalties coronàries i, en segon lloc, les infeccions respiratòries de baix grau, com podrien ser una pneumònia o una bronquitis. Aquestes malalties, en els països desenvolupats, com podria ser Espanya, tenen un diagnòstic i tractament de fàcil accés i molt controlat. És a dir, en països desenvolupats, aquest tipus de malaltia rarament podrien acabar provocant la mort del o la pacient, tot i que els pronòstics sempre empitjoren quan el pacient és d'edat avançada.

Les dades tant a Espanya com a Catalunya mostren que, segons estudis realitzats per l'Associació Espanyola Contra el Càncer (AECC), la incidència del càncer ha augmentat en els últims anys de manera lenta i progressiva. El 2015 a Catalunya la incidència era

del 0,53 % i, en la totalitat d'Espanya, del 0,55 %. Mentre que el darrer any 2020, la incidència a Catalunya ha augmentat fins al 0,57 % i a Espanya fins al 0,59 %.

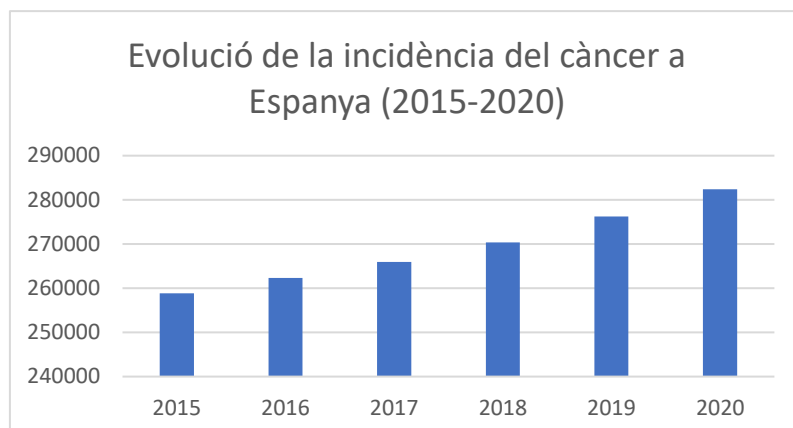


Fig. 1. Gràfica evolució de la incidència del càncer a Espanya des de l'any 2015 al 2020. Font: AECC

Com es pot veure amb aquestes dades, la incidència ha augmentat en aquests últims anys i, de fet, es preveu que seguirà en ascens. Això es deu que tant Catalunya com el conjunt d'Espanya estan patint un envelliment de la població, cosa que, juntament amb l'ampliació de l'esperança de vida, provoca que cada vegada una part més gran de la població es trobi en la franja d'edat en la qual el risc de patir càncer és molt més elevat. A més a més d'aquest envelliment de la població, un dels factors més clars causants de l'augment en la incidència d'aquesta malaltia, són els factors mediambientals, com: la contaminació, la radiació, etc. De fet, el director de l'Agència Internacional d'Investigació en Càncer, Christopher P. Wild, a la conferència inaugural del 23è Congrés Mundial de la Societat Internacional de l'Epidemiologia Ambiental (ISEE), va anunciar que el 90 % dels casos de càncer estan causats per factors mediambientals. És a dir, que aquests factors són realment rellevants en l'augment en la incidència que està experimentant el càncer.

Tot i que la incidència del càncer tant a Espanya com a Catalunya es troba en ascens, segons estudis realitzats per la Societat Espanyola d'Oncologia Mèdica (SOEM) la supervivència d'aquesta malaltia també està augmentant. Segons aquests estudis, en homes, la supervivència neta a 5 anys pel total de càncers va passar de 52 % en el període 2002-2007 a 55,3 % en el període 2008-2013. En el cas de les dones, la supervivència entre aquests dos períodes va augmentar del 59,1 % al 61,7 %, sempre tenint en compte que hi ha variacions en funció del tipus de tumor del qual es tracti. Entenent la supervivència com un indicador que es defineix com la probabilitat de sobreviure un

temps determinat, habitualment 5 anys, després del diagnòstic i considerant aquests resultats, es pot concloure que, tot i que hi ha un augment de casos, les possibilitats de superar la malaltia també es troba en augment, gràcies tant a l' existència d'un sistema sanitari universal que atén tots als ciutadans independentment de la seva condició social, econòmica o origen, com a la recerca de nous tractaments i a la gestió integral del càncer. Sense oblidar-se de la prevenció, que permet un diagnòstic precoç i una millor supervivència.

Respecte als tipus de càncer més comuns tant a Espanya com a Catalunya, la incidència és molt semblant a ambdós territoris. En totes dues regions, el càncer de pròstata és el més comú entre els homes i el de mama entre les dones, seguit del colorectal en ambdós sexes.

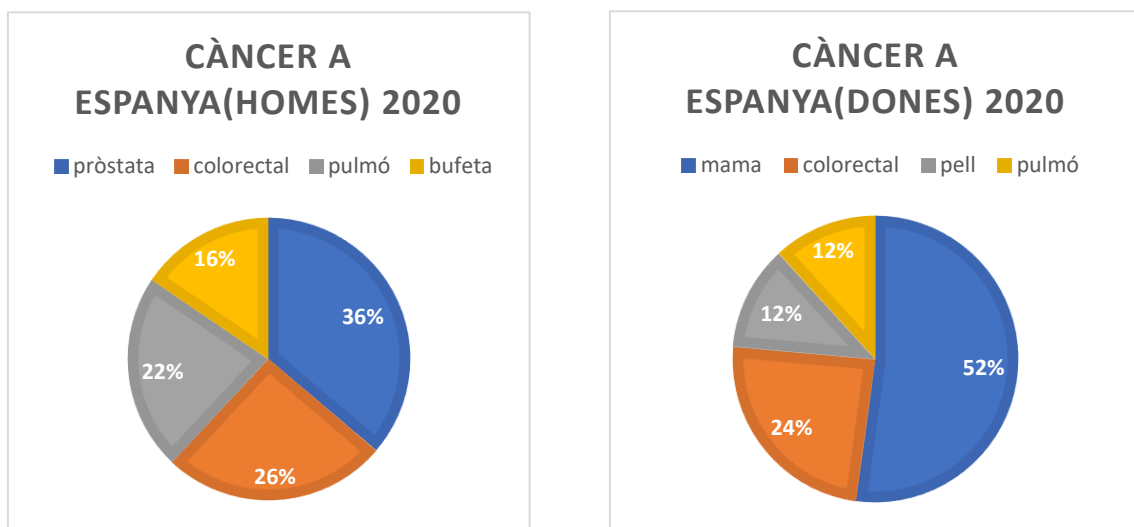


Fig 2. Incidència dels diferents tipus de càncer el 2020. Font: AECC

## 1.2. Definició

El càncer engloba un gran nombre de malalties en què es troba afectat el material genètic cel·lular, caracteritzades per una proliferació descontrolada de les cèl·lules.

De manera natural, les cèl·lules que formen qualsevol organisme pluricel·lular creixen i es divideixen contínuament amb l'objectiu de realitzar les seves respectives funcions. Quan les cèl·lules es fan malbé, es danyen o simplement s'envelleixen, són eliminades i reemplaçades per cèl·lules noves.

Però, en el càncer, aquest procés controlat de producció de noves cèl·lules i d'eliminació de les velles s'altera, es descontrola. La causa d'aquest descontrol són mutacions o alteracions que es donen a gens específics de l'ADN (àcid desoxiribonucleic), que s'encarreguen de controlar el cicle cel·lular de cada cèl·lula. Aquests són els

protooncogens i els gens supressors de tumors, els quals s'encarreguen d'activar la divisió cel·lular i d'aturar-la, respectivament.

Per una banda, quan aquestes mutacions actuen sobre els protooncogens, n' augmenten la producció, la qual cosa provoca que el creixement de la cèl·lula s'estimuli en excés. En conseqüència, es dona una sobreproducció de cèl·lules. Per una altra banda, quan aquestes mutacions afecten els gens supressors de tumors, el botó d' **stop** de la cèl·lula capaç d'aturar el seu creixement desapareix, de manera que les cèl·lules es queden sense cap manera d'aturar la seva proliferació.

Així, aquestes alteracions en el material genètic provoquen que cèl·lules malmeses o velles que haurien de seguir el seu procés i morir, sobrevisquin i, a més, es formin cèl·lules que no són necessàries, fet que produeix l'aparició d'acumulacions de cèl·lules no desitjades i no funcionals, és a dir, de tumors.

Aquests tumors creixen ràpidament ocupant el lloc de les cèl·lules funcionals, i impedeixen t així el bon funcionament de l'organisme. És el que coneixem com a càncer.

### **1.3.El cicle cel·lular i el càncer**

Com s'ha explicat a l'apartat anterior, les mutacions que donen inici al càncer afecten uns determinats gens que alteren l'evolució cel·lular normal de les cèl·lules, és a dir, la seqüència d'etapes coneguda com cicle cel·lular.

Conèixer aquest cicle, les alteracions que presenta en cèl·lules tumorals i els detonants que les indueixen permet acabar d'entendre la malaltia i condueix a noves vies de tractament.

#### **1.3.1. Definició**

El cicle cel·lular es podria definir com el conjunt de processos, etapes o canvis que pateix la cèl·lula des de que és formada per la divisió d'una cèl·lula preexistent, anomenada cèl·lula mare, fins que es divideix per a donar lloc a dues cèl·lules noves, anomenades cèl·lules filles.

Aquest cicle pot tenir una durada molt variable depenent del tipus de cèl·lula de la qual es tracti. Hi ha cèl·lules que triguen 3 h a dividir-se, altres 7 h, 20 h, 24 h... de fet, també n' hi ha que, a causa del seu alt grau d'especificació, no s'arriben a dividir mai, com en el cas de les neurones.

### 1.3.2. Etapes del cicle cel·lular i regulació

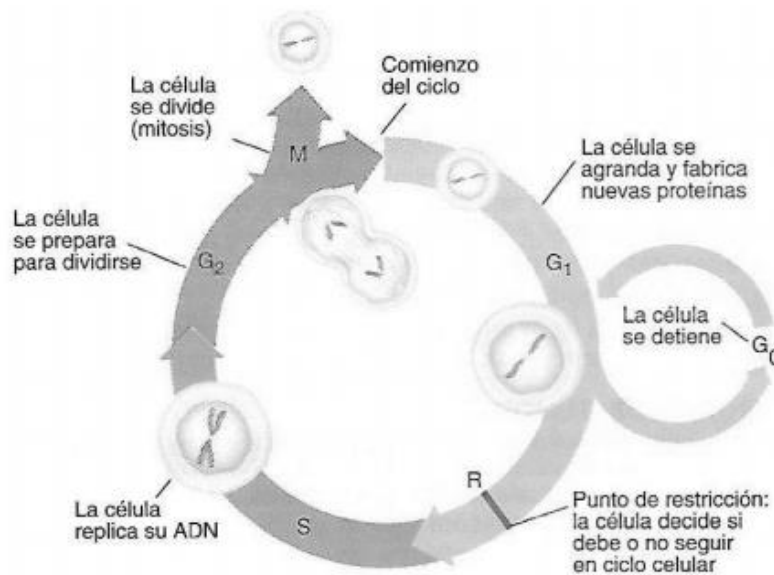


Fig. 3. Esquema fases cicle cel·lular. Font: *SCIENTIFIC AMERICAN: Investigación y ciencia*:

El cicle cel·lular es pot dividir en dues grans fases: la interfase, en què la cèl·lula creix, i la divisió cel·lular, en què com el nom indica, la cèl·lula es divideix.

#### LA INTERFASE:

És la fase més llarga del cicle cel·lular i en la qual la cèl·lula creix i es prepara per a dur a terme la divisió. Consta de les següents subfases:

- Fase G<sub>1</sub>. En aquesta fase la cèl·lula creix, ja que està acabada de néixer, és petita i amb carències. Al finalitzar aquesta fase G<sub>1</sub>, la cèl·lula arriba a un punt de no-retorn, anomenat també punt R. Un cop arribat a aquest punt, és impossible evitar que la cèl·lula experimenti les fases posteriors.

Tot i així, hi ha la possibilitat que a la cèl·lula, abans d'arribar a aquest punt de no-retorn o punt R, es comencin a manifestar determinats gens que fan que aquesta es converteixi en una cèl·lula especialitzada del teixit que aquests gens determinin. Es pot convertir en una cèl·lula del teixit adipós, epitelial, en una neurona, etc. A aquest procés se l'anomena diferenciació cel·lular i, quan la cèl·lula l'experimenta, es considera que ha sortit del cicle i es troba ja en la fase G<sub>0</sub>.

Aquesta fase G<sub>0</sub> pot durar dies, fins i tot mesos, o, en el cas de cèl·lules molt especialitzades com les neurones, pot no acabar mai. Però generalment, aquestes cèl·lules que experimenten la fase G<sub>0</sub>, després d'un temps determinat,

sota l'efecte d'uns determinats factors cel·lulars, tornen a la fase G<sub>1</sub>, en què assoleixen el punt de no-retorn.

- Fase S. Perquè la cèl·lula passi del punt de no-retorn o punt R a la fase S, cal que “l'interruptor” molecular s'encengui. Això succeeix quan augmenten els nivells d'unes proteïnes anomenades ciclines D i E.

En aquesta fase les cèl·lules continuen la seva activitat i és en la que es produeix la duplicació de l'ADN, per tal que les seves dues descendents tinguin material genètic idèntic entre elles i a la progenitora.

- Fase G<sub>2</sub>. Aquesta fase comença un cop l'ADN està completament duplicat, i finalitza quan ja es comencen a formar els diferents cromosomes<sup>1</sup> a causa de la condensació de la cromatina<sup>2</sup>. Continua l'activitat cel·lular i es comencen a sintetitzar molècules proteïques necessàries per a poder realitzar la següent etapa: la divisió (histones, microtúbuls del fus mitòtic, etc.)

## LA DIVISIÓ CEL·LULAR:

És la part del cicle cel·lular en què la cèl·lula mare es divideix, de manera que dona lloc a dues cèl·lules filles genèticament idèntiques entre elles i a ella. En aquesta fase del cicle, hi distingim dues etapes no sincròniques: la mitosi, en què es produeix la divisió del nucli de la cèl·lula, i la citocinesi, en què es produeix la divisió del citoplasma.

Per tal que aquesta divisió cel·lular es produeixi correctament, les cèl·lules han desenvolupat uns mecanismes de control (*checkpoints*) que detecten possibles errades en la duplicació de l'ADN o en la cromosòmica, de manera que controla que no es pugui passar d'una fase del cicle a la següent, si aquesta no ha estat acabada amb èxit.

Sovint aquests punts de control es troben alterats a les cèl·lules canceroses, cosa que causa la proliferació descontrolada de les cèl·lules. Uns d'aquests *checkpoints* més coneguts, i ja esmentats anteriorment, són els protooncogens i els gens supressors de tumors, que són components de les vies de senyalització que controlen l'entrada i la sortida del cicle cel·lular.

---

<sup>1</sup> Cromosomes: Estructures que es troben al nucli cel·lular i estan formades per condensacions de cromatina.

<sup>2</sup> Cromatina: Substància que forma els cromosomes. Consisteix en la combinació d'ADN i proteïnes.

Un exemple de gens supressors de tumors són els gens BRCA 1 i 2. Són gens de l'ADN humà que sintetitzen proteïnes que ajuden a reparar l'ADN malmès. Aquesta correcció dels possibles errors que es poden donar a l'ADN assegura la estabilitat de l'ADN de les cèl·lules i la seva correcte duplicació.

Com a exemples de protooncogens, trobem el gens KRAS i BRAF, els quals sintetitzen cadascun una proteïna que participa en les vies de senyalització cel·lular. En el cas del KRAS, la proteïna controla la divisió, la maduració i la mort cel·lular, i en el del BRAF, participa també en el control del creixement i la divisió cel·lular.

### **1.3.3. Característiques cel·lulars rellevants en el cicle i com es veuen alterades en les cèl·lules canceroses.**

Les cèl·lules no canceroses que formen un organisme pluricel·lular (o un teixit), a més a més de regular el seu cicle en funció de les necessitats de l'organisme, presenten unes característiques que permeten el funcionament coordinat de totes elles. A causa de les mutacions en l'ADN, aquestes característiques o funcions es veuen afectades en les cèl·lules canceroses, i ho fan de la següent manera:

- **Comunicació cel·lular:** Les cèl·lules no-canceroses es comuniquen entre elles mitjançant senyals químics. Aquests senyals normalment es transmeten mitjançant proteïnes específiques, i els permet saber quan han de reproduir-se i quan no. Aquests senyals viatgen des de la superfície de la cèl·lula fins al nucli. Un cop allà, la cèl·lula recull tots els missatges i decideix si ha de dividir-se o no. Però, les cèl·lules canceroses aconsegueixen reproduir-se sense control evadint o ignorant, entre d'altres, les senyals d' *stop* de les cèl·lules veïnes. A causa de les mutacions genètiques, en les cèl·lules canceroses aquestes senyals procedents de la superfície de la cèl·lula, o bé envien més ordres d'activació de les que haurien o bé provoquen que els gens supressors de tumors no s'accionin i per tant, la cèl·lula mai rebí l'ordre d'aturar el seu creixement.
- **Adhesió cel·lular:** Una de les principals característiques que diferencien les cèl·lules tumorals de les no-tumorals és que aquestes últimes necessiten adherir-se a les cèl·lules veïnes per sobreviure, mentre que les tumorals poden viure sense fer-ho.

Les cèl·lules normals s'adhereixen a les membranes cel·lulars de les cèl·lules veïnes mitjançant unes molècules d'adhesió que es troben a la superfície



d'aquestes. Aquesta unió entre les cèl·lules, permet que aquestes es mantinguin en la seva ubicació adequada i facilita el pas de senyals entre elles.

Les cèl·lules canceroses perden les molècules d'adhesió que les permet mantenir-se unides a les cèl·lules veïnes i seguir a la seva localització correcta. De manera que aquestes cèl·lules poden alliberar-se i fer metàstasi<sup>3</sup> a teixits propers o bé a altres teixits més allunyats, viatjant a través de la sang o el líquid limfàtic.

- Especialització cel·lular: En un organisme pluricel·lular complex, les cèl·lules esdevenen especialitzades per tal de complir les funcions específiques que requereix un teixit concret. Per exemple, poden esdevenir cèl·lules musculars, cerebrals, òssies o de qualsevol altre teixit.

En canvi, les cèl·lules canceroses no són cèl·lules especialitzades, no passen per la fase G<sub>0</sub>, per la qual cosa, no es converteixen en cèl·lules d'un tipus concret. Així que la seva única funció és dividir-se.

- Mort cel·lular: Una cèl·lula no-tumoral té la capacitat d'autodestruir-se, fenomen que rep el nom d'apoptosi<sup>4</sup>. Això ho fa mitjançant uns mecanismes de comprovació de l'ADN, que al detectar un dany en la cèl·lula, indiquen la seva destrucció. Però les cèl·lules canceroses presenten unes mutacions genètiques que provoquen que aquests danys que indicarien la destrucció de la cèl·lula, no siguin detectats. De manera que la cèl·lula perd la seva capacitat d'autodestruir-se.

A més a més, les cèl·lules també tenen un mecanisme que els permet comptar i limitar el nombre de vegades que cada una d'aquestes s'autoprodueix. Els telòmers són un element clau en aquest mecanisme. Els telòmers són els segments d'ADN que constitueixen els extrems dels cromosomes i que serveixen per a protegir aquests de possibles danys. En les cèl·lules normals, cada cop que l'ADN es duplica durant la fase S del cicle cel·lular, els seus respectius telòmers es van escurçant una mica en cada duplicació. Quan els telòmers s'han escurçat fins a una longitud crítica, la cèl·lula rep una senyal que l'indica que dugui a terme l'apoptosi, és a dir, que s'autodestruïxi.

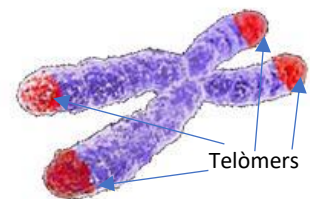


Fig. 4. Representació de telòmers. Font: *internet*

<sup>3</sup> Metàstasi: Expansió de les cèl·lules canceroses des del teixit on es formen fins a un altre teixit de l'organisme.

<sup>4</sup> Apoptosi: Forma de mort programada de les cèl·lules en organismes pluricel·lulars.

- **Reproducció cel·lular:** Les cèl·lules no-canceroses es reproduïxen en la quantitat que l'organisme ho necessita, per a substituir cèl·lules velles, que s'han fet malbé o que es destrueixen, sense cap excés o manca de producció.

En canvi, Les cèl·lules canceroses presenten mutacions genètiques o cromosòmiques que modifiquen les seves propietats reproductives. De manera que les cèl·lules són les que controlen els seus propi senyals de creixement i no creixement, és a dir, de dividir-se o no. Aquest fet que provoca que aquestes estiguin contínuament reproduint-se de manera descontrolada i desmesurada. A més, aquestes cèl·lules no envelleixen, és a dir, no perden la capacitat de dividir-se amb el pas del temps, així que mantenen la seva capacitat de replicació i creixement.

#### **1.4.Diagnòstic i tractaments**

Tot i que és ben sabut que l'origen del càncer es troba en l'ADN, el diagnòstic d'un càncer no comença en un anàlisis genètic, sinó que el primer que fa el metge o metgessa quan arriba el pacient amb algun símptoma de la malaltia, és elaborar una història clínica i fer una exploració física. La història clínica és un document que recull els antecedents familiars i personals del pacient i el seu estil de vida, que són els factors principals que determinen les mutacions que originen el càncer.

Si l'exploració i la història clínica indiquen la possible existència d'un càncer, es procedeix a fer proves diagnòstiques que poden ser dels següents tipus:

- **Les proves analítiques:** Aquestes proves permeten, observant paràmetres que actuen d'indicadors tumorals, saber si existeix un càncer o no. En són exemples les anàlisis de sang, d'orina o de femta.
- **Les proves d'imatge:** Aconsegueixen mostrar l'interior de l'organisme sense necessitat d'intervenció quirúrgica. En són exemples les radiografies, les endoscòpies, les ecografies o les ressonàncies magnètiques nuclears.
- **L'estudi de teixits:** Consisteix en estudiar la caracterització de les cèl·lules dels possibles teixits amb càncer, extrets durant la biòpsia<sup>5</sup>, per a confirmar si aquestes són malignes o benignes.

---

<sup>5</sup> Biòpsia: Procediment diagnòstic que consisteix en extreure o extirpar una petita mostra de teixit per a examinar-la posteriorment al laboratori

Després de dur a terme les proves pertinents i diagnosticar el càncer, un comitè multidisciplinari format per, entre d'altres: radiòlegs, especialistes en medicina nuclear, patòlegs i oncòlegs, es reuneix per tal de decidir quin tractament és el més efectiu per al o la pacient. Els factors més rellevants que es tenen en compte a l'hora de decidir el tractament que es realitzarà són els següents: les característiques del pacient, és a dir, l'edat, el seu estat funcional, si té alguna altra malaltia que pogués dificultar el tractament; la fase en què es troba el càncer i el tipus de tumor del que es tracta.

Depenent del que decideixi aquest comitè d'experts, al pacient se li aplicarà un o més tractaments. Els més comuns i coneguts són els següents:

**Cirurgia:** Consisteix en extirpar el tumor de forma directa. És un tractament definitiu en tumors localitzats sense metàstasi, tot i que de vegades pot necessitar l'aplicació de més tractaments per acabar d'erradicar la malaltia. La cirurgia també és sovint utilitzada en alguns tipus de càncer per a reduir la mida del tumor, especialment com a tractament pal·liatiu amb l'objectiu de suavitzar els símptomes causats pel tumor.

**Radioteràpia:** : Aquest tractament altera la capacitat de divisió de les cèl·lules canceroses mitjançant radiacions ionitzants d'alta energia. Amb la radiació el que s'aconsegueix és provocar petites alteracions a l'ADN de la cèl·lula. Aquestes alteracions, si no poden ser corregides pels diferents mecanismes de reparació de la cèl·lula, són les que impossibiliten que aquesta es divideixi, i causa la seva mort.

La radioteràpia és un tractament d'aplicació local, és a dir, que no es subministra a tot el cos, sinó que només és aplicat a la zona afectada pel tumor. Tot i això, les cèl·lules no canceroses que es troben a prop del tumor també son afectades per la radiació, però la gran majoria d'aquestes es recuperen i tornen a poder dur a terme les seves funcions correctament.

El motiu de perquè aquestes radiacions afecten més a les cèl·lules canceroses que a les no-canceroses està directament connectat a la radiosensibilitat de les cèl·lules, lligada a la diferenciació cel·lular. S'ha descobert que com menys diferenciada funcional o morfològicament es troba la cèl·lula, més alta és la seva radiosensibilitat, és a dir, més afí és a la radiació. La funció principal d'aquestes cèl·lules no-diferenciades és la divisió, i com s'ha vist anteriorment a l'apartat 1.3.3, la no-diferenciació de les cèl·lules és una de les propietats més característiques de les cèl·lules canceroses.

Aquest tractament pot ser administrat de manera general amb aparells productors de radiació gamma, X o d'electrons, o de manera localitzada a la zona del tumor, o també pot ser administrat durant la cirurgia en una regió anatòmica concreta per tal de millorar el control local del tumor.

**Tractament farmacològic:** Aquest tractament s'acostuma a combinar amb d'altres, però també s'administra de manera exclusiva. Els tractaments més rellevants són els següents:

-Quimioteràpia: En aquesta teràpia s'administren fàrmacs, majoritàriament per via intravenosa, que actuen sobre aquelles cèl·lules que es troben en procés de divisió, interferint en el cicle cel·lular d'aquestes de diferents maneres segons cada tipus de fàrmac. Aquests fàrmacs es poden o bé combinar amb altres fàrmacs o administrar-se de forma exclusiva. La quimioteràpia es pot administrar abans del tractament principal per tal de reduir la mida del tumor, o després d'aquest, per tal d'eliminar les restes de la malaltia.

El principal inconvenient d'aquest tractament és que afecta a totes aquelles cèl·lules que es troben en procés de divisió, siguin canceroses o no. Les cèl·lules canceroses, com tenen un nivell de proliferació molt alt, són més susceptibles al medicament, però també hi ha moltes altres cèl·lules sanes al cos en fase de divisió, les quals també resulten danyades. Un exemple molt clar d'aquest efecte sobre les cèl·lules sanes, és la caiguda del cabell que experimenten els pacients que són tractats amb aquests fàrmacs, això és degut a que les cèl·lules del cabell es troben en constant divisió i això fa que els fàrmacs actuïn també contra elles.

Els tres tipus de fàrmacs quimioteràpics més utilitzats són:

-Els antimetabòlits: Aquests fàrmacs actuen enllaçant-se amb l'ADN i l'ARN, substituint les molècules que fan possible la síntesi d'aquestes substàncies, provocant així que l'ADN no es pugui duplicar durant la fase S del cicle cel·lular i per tant, la cèl·lula no es pugui dividir. En són exemples: el metotrexat i el fluorouracil.

-Els inhibidors de la topoisomerasa: La topoisomerasa és l'enzim encarregat de separar les dues cadenes de nucleòtids que formen la doble hèlix d'ADN per tal de que l'ADN pugui ser copiat durant la fase S del cicle cel·lular. El que fan aquests fàrmacs és inhibir, bloquejar, aquest enzim per tal de que no sigui possible

la duplicació de l'ADN i per tant la cèl·lula no es pugui dividir. En són exemples la doxorubicina i la CPT-11.

-Els agents alquilants: Aquests fàrmacs alteren l'estructura habitual de la doble hèlix d'ADN. Aquest canvi en la molècula d'ADN pot provocar ruptures o enllaços innecessaris entre diferents cadenes o dins una mateixa cadena. Aquestes alteracions, si no poden ser corregides pels diferents mètodes de reparació de l'ADN dels que disposa la cèl·lula, portaran a aquesta a dur a terme l'apoptosi, és a dir posarà en marxa el programa de suïcidi cel·lular, com s'ha comentat a l'apartat 1.3.3. En són exemple d'aquest tipus de fàrmacs el clorambucil i la ciclofosfamida.

-Hormonoteràpia: El creixement d'alguns tumors, com els de mama i els de pròstata, depenen d'unes hormones concretes del cos per a poder créixer. L'hormonoteràpia busca aturar l'activitat d'aquestes hormones en l'organisme o modificar la seva quantitat, per tal d'evitar o eliminar el creixement del tumor.

-Teràpies biològiques: Són un tipus de tractaments en les que s'utilitzen substàncies produïdes pels organismes vius. Aquestes substàncies poden ser sintetitzades pel propi organisme o poden ser creades al laboratori. Aquests fàrmacs bloquegen de forma específica determinades proteïnes que es troben en les cèl·lules tumorals. Cada medicament actua sobre una proteïna concreta d'una manera específica. Dins d'aquestes teràpies, troben un tipus que s'està fent molt popular, la immunoteràpia. L'objectiu d'aquest tractament és donar eines al sistema immunitari del pacient, per tal de que ell mateix pugui combatre la malaltia. Hi ha diferents tractaments d'immunoteràpia. Alguns actuen ajudant al sistema immunològic a aturar o frenar el creixement de les cèl·lules canceroses i altres l'ajuden a destruir aquestes cèl·lules o impedir que el càncer es dissemini a altres parts del cos. Per exemple, en un d'aquests tractaments, es fa ús d'anticossos monoclonals<sup>6</sup> per tal d'ajudar al sistema immune a combatre el càncer.

Quan el sistema immunològic detecta algun cos perjudicial per l'organisme, produeix anticossos. Els anticossos són proteïnes que neutralitzen els cossos estranys que entren a l'organisme unint-se a antígens, que són les molècules que "marquen" aquells cossos com a estranys, per tal de que els anticossos els reconeguin.

---

<sup>6</sup> Anticossos monoclonals: Anticossos idèntics procedents de la mateixa cèl·lula mare.

En la immunoteràpia, aquests anticossos monoclonals, que han estat creats en el laboratori, s'utilitzen per a potenciar els anticossos naturals del propi pacient o actuar com a anticossos per sí mateixos. Aquests anticossos poden ajudar a combatre el càncer de diferents formes. En alguns casos, poden utilitzar-se per a inhibir l'activitat de les proteïnes anòmales de les cèl·lules canceroses i així reduir la seva velocitat de proliferació. En altres casos, es poden utilitzar per detectar la proteïna que es vol desactivar, unint-se a ella i deixant-la "marcada" per tal de que el sistema immunològic del propi pacient, la reconegui i l'elimini. Un exemple de medicament amb aquest mecanisme d'acció és el Trastuzumab, utilitzat en el tractament del càncer de mama, que és capaç de reconèixer la proteïna HER-2, una proteïna que es troba sobre-expressada en alguns càncer de mama i que està relacionada amb el creixement tumoral.

Aquests són els tractaments més comuns i coneguts, però també hi ha d'altres més nous que han aparegut en els últims anys, com:

**Transplantaments de medul·la òssia:** Consisteix en intercanviar les cèl·lules mare de la medul·la òssia del malalt i les cèl·lules mare sanes d'un donant. Aquest donant pot ser una persona externa o el propi pacient. Aquest tipus de tractament únicament és útil en aquells pacients que pateixen leucèmia o limfomes<sup>7</sup>, ja que la medul·la trasplantada únicament és capaç de produir cèl·lules sanguínies.

**Hipertèrmia:** En aquest tractament s'aplica calor sobre el tumor per tal de danyar i erradicar les cèl·lules canceroses sense danyar les cèl·lules sanes que l'envolten. Això es fa mitjançant o bé una màquina que es troba fora de l'organisme, o a través d'una agulla o una sonda que es col·loca directament sobre el tumor.

**Teràpia làser:** En aquesta teràpia s'aplica una gran quantitat de llum sobre les cèl·lules canceroses per tal d'eliminar-les. Això es fa mitjançant un tub molt prim que desprèn una gran quantitat de llum, el qual es col·loca dins del cos o sobre la pell.

Aquesta teràpia es pot utilitzar amb diverses finalitats, com: reduir o destruir tumors; per tancar les terminacions nervioses al acabar la cirurgia, i d'aquesta manera minimitzar el dolor; o tancar els vasos limfàtics per tal d'evitar que les cèl·lules tumorals facin metàstasi, és a dir, que es dissipin a altres teixits.

---

<sup>7</sup> Limfomes: càncer del sistema immunitari que es manifesta quan els glòbuls blancs o limfòcits, que són cèl·lules de la sang que produeix la medul·la òssia i que ajuden a defensar l'organisme contra les infeccions, es divideixen de manera anormal o no moren quan ho haurien de fer.

**Teràpia fotodinàmica:** En aquest tractament s'administra al pacient un medicament que és sensible a un tipus concret de llum. Aquest medicament perdura a les cèl·lules canceroses durant més temps que en les sanes. De manera que posteriorment, s'aplica llum mitjançant un làser o una altra font a les cèl·lules cancerígenes. La llum provoca que aquest medicament que s'ha administrat anteriorment al pacient es converteixi en una substància capaç d'eliminar les cèl·lules cancerígenes.

**Crioteràpia:** Aquesta teràpia consisteix en aplicar un gas que es troba a temperatures extremadament baixes, que permet congelar i erradicar les cèl·lules canceroses. Aquest mètode es pot utilitzar per a eliminar cèl·lules precanceroses, és a dir, aquelles que en un futur poden convertir-se en canceroses.

Com s'ha pogut veure, existeixen un gran nombre de tractaments contra el càncer que, poc a poc, gràcies a la recerca es van perfeccionant i es van trobant de nous. Però la lluita contra aquesta malaltia encara no està guanyada, ja que com s'ha pogut veure anteriorment al punt 1.1, el càncer segueix essent una de les principals causes de mort arreu del món, provocant la mort de milions de persones any darrere any. A més a més, aquests tractaments comporten un gran nombre d'efectes secundaris perjudicials per als i les pacients. Això fa necessària la recerca de nous tractaments més afectius, que aconseguixin augmentar la supervivència d'aquesta malaltia i que la qualitat de vida dels pacients sigui millor, que vagin més enllà de la supervivència al tumor i comportin menys efectes secundaris.

## **2.El càncer d'ovari**

### **2.1.Incidència del càncer d'ovari**

Com ja s'ha explicat al principi d'aquest treball, el càncer no és una malaltia, sinó que en són moltes. Entre aquest gran conjunt de malalties genètiques que comparteixen la proliferació anòmala de les cèl·lules, es troba el càncer d'ovari. Segons un estudi publicat al 2018 per "The World Ovarian Cancer Coalition", el càncer d'ovari és el setè tipus de neoplàsia<sup>8</sup> més comuna arreu del món, i és també la vuitena malaltia que causa la mort de més dones a l'any.

A continuació es pot observar una taula amb la incidència i la mortalitat d'aquest tipus de càncer als diferents continents o regions del món l'any 2012.

---

<sup>8</sup> Neoplàsia: Tumor

<b>REGIÓ</b>	<b>INCIDÈNCIA AL 2012</b>	<b>MORTALITAT AL 2012</b>
<b>ÀSIA</b>	111.877	66.215
<b>EUROPA</b>	65.584	42.749
<b>AMÈRICA DEL NORD</b>	23.529	16.995
<b>AMÈRICA DEL SUD</b>	17.921	11.471
<b>ÀFRICA</b>	17.755	13.085
<b>OCEANIA</b>	2.043	1.402
<b>TOTAL MUNDIAL</b>	239.000	152.000

Fig. 5. Taula incidència i mortalitat càncer d'ovari al món any 2012. Font: *THE-WORLD-OVARIAN-CANCER-COALITION-ATLAS-2018.pdf*

Com mostra la figura 5, i en consonància a allò descrit a l'apartat 1.1, al càncer d'ovari li passa el mateix que a la resta de neoplàsies i és que els cassos augmenten en les regions més desenvolupades, a causa de l'estil de vida del que els seus ciutadans gaudeixen, que els permet tenir una vida més llarga, i per tant arribar a edats on el risc de patir qualsevol tipus de càncer, inclòs el d'ovari, augmenten. Però també veiem com en proporció els països menys desenvolupats mostren tasses de mortalitat més elevades, degudes a al pitjor estil de vida en aquestes regions i a la manca de recursos sanitaris que hi trobem en aquestes zones. Aquestes dades, tot i no ser molt actuals, reflecteixen la mateixa realitat respecte els països desenvolupats i els no desenvolupats.

Pel que fa a Catalunya i Espanya, la incidència d'aquest tipus de neoplàsia és molt semblant a ambdues regions. Segons estudis realitzats per l'Associació Espanyola Contra el Càncer (AECC), al 2015 es van diagnosticar 527 nous casos de càncer d'ovari només a Catalunya i a en la totalitat d'Espanya s'hi van detectar 3313. Mentre que a aquest últim any 2020, a Catalunya s'han registrat un total de 560 noves pacients diagnosticades d'aquesta malaltia i, a Espanya s'han detectat 3513 nous casos.

Com podem comprovar amb aquestes dades, la incidència del càncer d'ovari tant a Espanya com a Catalunya es troba en augment. Això es deu a que tal i com ja hem comentat anteriorment al punt 1.1, tant la incidència de càncer d'ovari com la del càncer en general es troba en augment, degut especialment a l'envelliment de la població i l'augment de l'esperança de vida.



Avui en dia, a part d'estudiar possibles factors que afavoreixen o perjudiquen l'aparició d'aquesta malaltia, la recerca biomèdica està especialment centrada en la recerca de proves, senyals que permetin diagnosticar-la en estadis poc avançats, de manera que sigui més fàcil de curar; a més de per descomptat, nous tractaments, més eficaços contra aquest tipus de neoplàsia.

## 2.2. L'aparell reproductor femení i el tumor ovàric

Tal i com el seu propi nom indica, el càncer d'ovari és aquell que afecta a diversos teixits del sistema reproductiu femení, principalment els ovaris.

Cada dona posseeix dos ovaris que són els encarregats de la producció de les hormones sexuals (progesterona i estrògens) i de la síntesi de les cèl·lules reproductives de l'organisme, és a dir, dels òvuls.

Els ovaris tenen una mida i una forma semblants a la de una ametlla i es troben situats a l'extrem oposat de la paret pèlvica, a ambdós costats de l'úter. Cadascun d'aquests ovaris es troba connectat a les trompes de Fal·lopi mitjançant filaments proteics anomenats fímbries. Els extrems lliures de les trompes de Fal·lopi es troben units més enllà de la superfície lateral dels ovaris per tal de transportar òvuls a l'úter.

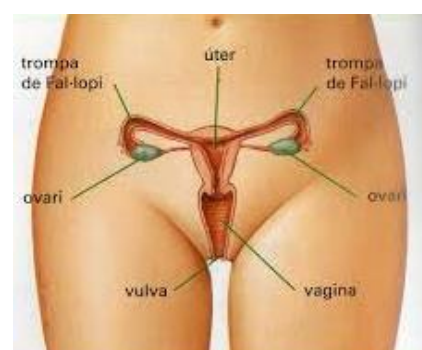


Fig. 6. Representació parts del sistema reproductiu femení.

L'ovari està molt implicat en els processos propis del sistema reproductiu de la dona: la menstruació, la gestació, l'ovulació, entre d'altres. Aquests processos suposen una divisió cel·lular contínua que afavoreix l'aparició d'errades en el material genètic de les noves cèl·lules.

Aquestes errades o mutacions de l'ADN o material genètic de les cèl·lules de l'ovari o d'un teixit proper a aquest són les que permeten l'aparició del tumor que acabarà causant el càncer. Com es pot observar a la figura 7, els ovaris estan formats per tres tipus diferents de cèl·lules: les cèl·lules epitelials superficials, les cèl·lules estromals de cordó sexual, les quals constitueixen la major part del teixit ovàric, i les cèl·lules germinals, encarregades de produir els òvuls. El tipus de cèl·lula que ha proliferat de manera descontrolada és de gran rellevància a l'hora de diagnosticar el tipus de càncer d'ovari del que es tracta, ja que li confereix característiques diferents.

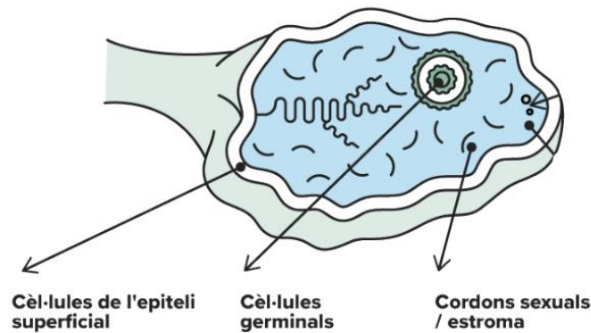


Fig.7. Dibuix tipus de cèl·lules de l'ovari. Font:clinicbarcelona.org

### 2.3. Tipus de tumors d'ovari i desenvolupament

De la mateixa manera que quan es parla de càncer, es parla d'un conjunt de malalties diferents amb una característica essencial comuna, existeixen diferents tipus de càncer d'ovari segons el criteri que s'apliqui per a la seva classificació.

Si el criteri és el seu pronòstic, els tumors d'ovari es poden subdividir en tres grups: els benignes, els malignes i els que presenten característiques d'ambos tipus anteriors, els qual s'anomenen tumors de límit.

Si el criteri és l'origen de les cèl·lules tumorals, existeixen 3 tipus de càncer d'ovari:

**1. Carcinoma epitelial.** Aquest tipus de càncer d'ovari és el més freqüent, representa entre un 85% i un 90% dels casos. Es desenvolupa a partir de les cèl·lules de la capa externa de l'ovari (figura 7) i són especialment freqüents en pacients que superen els 50 anys. Dins d'aquest tipus de càncer d'ovari, troben 5 subgrups:

- Tumors serosos d'alt grau. Són el tipus de tumor d'ovari més freqüents i segons les recents investigacions, es creu que la majoria d'aquests carcinomes apareixen als extrems de les trompes de Fal·lopi. Reben aquest nom perquè es troben en l'estadi de progressió tumoral III o IV (aquests estadis es troben descrits en detall a l'annex 1).

Aquestes cèl·lules tumorals, presenten en el 50% dels casos el gen TP53 mutat. Aquest gen és qui codifica la proteïna p53 que participa en el control del cicle cel·lular com a supressor tumoral.

Aquest tipus de tumor està molt associat al càncer de mama-ovari hereditari. S'ha observat que les dones que presenten el gen BRCA<sup>9</sup>1 mutat tenen un risc d'entre el 40-60% de desenvolupar aquest càncer, i les que presenten el BRCA 2, d'un 11-27%. També hi ha casos en els que els tumors serosos no es troben associats a les mutacions d'aquests gens, però això es dona en un percentatge molt baix.

- Tumors serosos de baix grau. Aquest tipus de tumor acostuma a formar-se progressivament a partir d'un cistadenoma<sup>10</sup> serós benigne que acaba convertint-se en carcinoma<sup>11</sup> serós invasiu de baix grau.

En la majoria de casos, les cèl·lules canceroses d'aquest tipus de tumor tenen mutats o bé el gen KRAS o el BRAF, els quals estan involucrats en el control del creixement, la multiplicació i la mort cel·lular.

Aquest tipus de tumor és més comú en edats joves i acostuma a tenir millor pronòstic. També és important esmentar que aquestes cèl·lules són força resistent a la quimioteràpia, per aquest motiu s'estan buscant altres mètodes més efectius per a tractar la malaltia.

- Tumors endometroides. Els tumors endometroides en el 28% dels casos són bilaterals. Aquests tumors estan formats per masses sòlides de consistència tova o fibrosa i les seves cèl·lules presenten nuclis i citoplasmes anormals.

En aquest tipus de càncer són comunes les mutacions en els gens beta-carelina (CTNNB1) i PTEN i en els gens ARID1A i RAS, els quals actuen en la proliferació cel·lular.

- Tumors de cèl·lules clares. Representen un 5% dels casos i les cèl·lules que el formen tenen un aspecte clar, per això reben aquest nom. En un 20-40% dels casos, aquest tipus de càncer pot ser bilateral. No té gaire bon pronòstic si es detecta tard i acostumen a tenir afectats els gens PTEN, ARID1A o PBK, els quals haurien d'actuar com a supressors tumorals.

**2. Tumors de cèl·lules germinals.** Representen un 10% dels casos i són freqüents en dones joves menors de 25 anys. Aquests tumors, tal i com el seu propi nom indica, es

---

<sup>9</sup> Gens BRCA 1 i 2: Gens de l'ADN humà que sintetitzen proteïnes que ajuden a reparar l'ADN malmès. Aquesta correcció dels possibles errors que es poden donar a l'ADN, assegura la estabilitat de l'ADN de les cèl·lules i la seva correcta duplicació.

<sup>10</sup> Cistadenoma: tumor benigne d'ovari derivat de l'epiteli superficial.

<sup>11</sup> Carcinoma: tumor que s'inicia a la pell o a les cèl·lules superficials dels òrgans.

generen a les cèl·lules germinals, és a dir, a aquelles cèl·lules on es produeixen els gàmetes, és a dir, els òvuls.

**3. Tumors de l'estroma.** Aquest tipus de tumor és el menys freqüent i es pot desenvolupar a qualsevol edat, tot i que la incidència és més alta en dones d'entre 30 i 50 anys. Aquests tumors es donen a les cèl·lules responsables de la síntesi de les hormones sexuals femenines, és a dir, a l'estroma.

#### Etapas o estadis del desenvolupament del càncer d'ovari

Un aspecte a definir en el diagnòstic d'un càncer és l'estadi o l'evolució que aquest presenta. Aquests estadis o etapes permeten conèixer on es troba el càncer, si s'ha disseminat a altres òrgans, cap a on ho ha fet i el grau d'afectació d'aquests. Van numerats del estadi I al IV, on l'afectació augmenta amb la numeració. L'estadi I acostuma a indicar que el càncer es troba localitzat, és a dir, ubicat en una regió en concret. Mentre que l'estadi IV, ja implica disseminació a altres òrgans (metàstasi), i per tant, una major gravetat de la malaltia, i conseqüentment, un pitjor pronòstic. La descripció detallada dels diferents estadis del càncer d'ovari es pot consultar a l'annex 1.

El tipus de tumor del que es tracta i l'estadi en el que es troba són uns dels principals aspectes que tenen en compte els experts a l'hora de determinar el tractament que haurà de seguir la pacient.

#### **2.4. Prevenció i diagnòstic del càncer d'ovari.**

Abans però del diagnòstic i l'administració d'un determinat tractament a la pacient, el punt més important i la millor eina que es té per evitar aquesta malaltia, o si més no, aconseguir un millor pronòstic, és la prevenció.

La prevenció d'una malaltia recull una sèrie de mesures que es duen a terme amb l'objectiu de reduir la probabilitat d'acabar desenvolupant la malaltia en concret. Així doncs, el que s'espera és que els casos i les morts disminueixin.

Per tal d'afavorir i fer possible aquesta prevenció, s'analitzen els factors de risc i els factors de protecció de la malaltia, en aquest cas, del càncer d'ovari. Els factors de risc agrupen tot allò que augmenta el risc de desenvolupar la malaltia. En canvi, tots aquells factors que disminueixen les possibilitats de patir-la, s'anomenen factors de protecció.

Molts d'aquests factors que afavoreixen l'aparició del càncer no són evitables, com és el cas de la heretar certs gens. Però també hi ha molts que es poden controlar i evitar com és el cas de consumir substàncies nocives pel nostre organisme, com per exemple el tabac o la contaminació ambiental de les grans ciutats.

Així doncs, la principal manera de prevenir l'aparició d'un càncer és evitar els factors de risc i augmentar els factors de protecció.

Alguns factors de risc del càncer d'ovari segons l'Associació Espanyola Contra el Càncer(AECC) i L'Institut Nacional del càncer(NIH), són els següents:

- Antecedents familiars de càncer d'ovari. Si una dona té un o més familiars que pateixen càncer d'ovari o l'han patit, les probabilitats de que aquesta l'acabi desenvolupant són més altes.
- El risc de patir càncer d'ovari és major en les dones que hereten mutacions en els gens BRCA 1 i BRCA 2 o altres. Els gens BRCA 1 i BRCA 2, com ja s'ha explicat anteriorment a l'apartat de regulació del cicle cel·lular, actuen com a gens supressors de tumors, corregint els possibles errors que es poden donar en l'ADN durant el cicle. Quan algun d'aquests gens presenta alguna alteració o mutació, aquests no sintetitzen correctament aquestes proteïnes encarregades de la correcció de l'ADN. De manera que la possibilitat de que les cèl·lules presentin alteracions genètiques augmenta i per tant, l'aparició d'un càncer també.
- Teràpia de reemplaçament hormonal. Les probabilitats de desenvolupar càncer d'ovari augmenten lleument en aquelles dones que després de la menopausa decideixen prendre teràpia de reemplaçament hormonal. El reemplaçament hormonal consisteix en uns medicaments que contenen hormones femenines que reemplacen l'estrogen que el cos de les dones deixa de produir després de la menopausa.
- Pes. Tenir sobrepès es considera un factor de risc del càncer d'ovari i sovint augmenta els risc de mort per aquest tipus de càncer.
- Endometriosi. Les dones que pateixen aquesta malaltia són més sensibles a desenvolupar càncer d'ovari. La endometriosi consisteix en el creixement de cèl·lules uterines en zones del cos on no haurien de créixer aquest tipus de cèl·lules. Això pot causar dolor, sagnats abundants, sagnats entre períodes de menstruació i infertilitat.

Factors de protecció del càncer d'ovari:

- Anticonceptius orals. Consumir anticonceptius orals disminueix el risc de desenvolupar càncer d'ovari.
- Lligadura de trompes. Les dones que s'han sotmès a la lligadura de trompes tenen un risc menys elevat de desenvolupar càncer d'ovari.
- Tenir fills. Les dones amb fills tenen un risc menys elevat de patir càncer d'ovari que les dones que no en tenen. De fet, com més fills té la dona, menor és el risc de desenvolupar la malaltia.
- Salpingectomia. La extirpació d'una o ambdues Trompes de Fal·lopi disminueix el risc de desenvolupar càncer d'ovari.
- Lactància. Es relaciona la lactància amb la disminució del risc de patir aquest càncer. Com més llarga sigui la lactància, menor és el risc.
- Salpin ooforectomia reductora de risc. Moltes dones amb un risc elevat d'acabar desenvolupant la malaltia decideixen extirpar-se els dos ovaris encara sense càncer per tal de reduir el risc de patir-lo. Entre aquestes dones trobem, per exemple, a les dones amb els gens BRCA 1 i BRCA 2 mutats.

Evitar els factors de risc i potenciar els factors de prevenció no assegura la no aparició d'un càncer, simplement es considera que pot ajudar a no desenvolupar-lo.

Aquesta malaltia sovint és força difícil de diagnosticar, ja que als estadis inicials del tumor d'ovari, pot no donar cap símptoma o presentar símptomes molt lleus i inespecífics, els quals es poden confondre amb els de malalties comunes.

Però, quan la malaltia ja es troba en un estadi més avançat(estadis III-IV), els principals símptomes d'aquesta malaltia són: ascites, és a dir, un augment de la panxa a causa de l'acumulació de líquid; una sensació d'estómac ple continu; un dolor persistent; dolor al orinar o defecar i pèrdua de sang inesperada per la vagina.

Si la pacient experimenta aquests símptomes i els metges sospiten de que es pot tractar d'un tumor a l'ovari, les proves que poden ajudar al diagnòstic són:

- Una història clínica completa. Com ja hem esmentat anteriorment a l'apartat 1.4, la història clínica és un document on es guarda tota la informació relativa a la salut

del pacient, incloent els tractaments o atencions que ha rebut anteriorment i la informació familiar.

- Anàlisis de sang. No és una prova específica per al diagnòstic de càncer d'ovari, però permet saber l'estat general del pacient i poder detectar anomalies associades al desenvolupament de la malaltia. A més a més, inclou el seguiment del marcador tumoral de diagnòstic, el CA 125. Un marcador tumoral de diagnòstic, és un tipus de bio-marcador. Els bio-marcadors s'utilitzen per fer prediccions en pacients en què hi ha sospita d'un càncer. Aquests bio-marcadors tumorals són capaços de determinar l'existència del càncer, especialment en els pacients que no presenten símptomes (més informació al punt 2.5.4.).
- Exploració física i ginecològica. En aquesta exploració, el metge palpa l'úter, la vagina, els ovaris, la bufeta i el recte per tal de trobar possibles masses tumorals o altres signes de la malaltia, com l'acumulació de líquid a l'abdomen.
- Ecografia ginecològica. Aquesta prova permet veure l'interior vaginal, de manera que els experts poden analitzar l'estat dels òrgans, la possible presència de tumors i si hi ha líquid a la cavitat pèlvica. L'aparell utilitzat en aquesta prova s'anomena ecògraf.
- TAC de pelvis. Aquesta prova es realitza amb un aparell amb forma de tub circular de raigs X, el qual realitza radiografies del pacient des de diferents angles. Posteriorment, aquestes radiografies són processades i combinades en un ordinador per tal d'obtenir imatges on es visualitzen tots els òrgans d'una forma molt clara i precisa. Aquesta prova permet obtenir molta informació sobre la mida i la localització dels possibles tumors, d'entre d'altres.
- Ressonància magnètica nuclear(RMN). No s'utilitza gaire, sinó que normalment serveix per a completar la informació de les altres proves. És molt semblant al TAC, però que enlloc d'utilitzar radiacions, es fa ús d'un camp magnètic.
- Biòpsia. És l'única prova que proporciona un diagnòstic definitiu de la malaltia i consisteix en l'extirpació d'una petita quantitat de teixit per tal d'analitzar-lo al laboratori. En l'estudi d'aquesta petita quantitat de teixit extirpat, es pot determinar de quin tipus de tumor es tracta i l'estadi en el que es troba.

## **2.5. Tractaments i seguiment del càncer d'ovari**

A partir de les dades obtingudes amb les diferents proves de diagnòstic, es determina de quin tipus de tumor es tracta i en quina etapa de la malaltia es troba. Depenent

principalment d'aquests dos factors, el comitè d'experts determinarà quin és el tractament més adient, d'entre tots els disponibles, per a la pacient.

### **2.5.1 Cirurgia**

#### **En estadis inicials**

Si durant la laparotomia per la biòpsia es confirma l'existència d'algun tumor a qualsevol dels dos ovaris o a ambdós, tant aquests com l'úter són extirpats. A més a més, durant aquesta intervenció, també es prenen mostres dels ganglis limfàtics i dels teixits del voltant per tal d'analitzar-los i poder acabar d'establir l'estadi en el que es troba la malaltia.

Gran part dels pacients que es troben en Estadi I quan se'ls sotmet a aquesta intervenció quirúrgica, únicament necessitaran d'aquesta intervenció per a tractar la malaltia. Tot i això, al voltant d'un 20-30% de les pacients presenten una sèrie de factors de risc que indiquen que en un futur podrà haver una recaiguda. Aquests factors de risc són: cèl·lules en grau 3 de diferenciació, és a dir, que hi ha més risc de que el càncer es dissemini a altres teixits; la presència de tumors a la superfície de l'ovari; i el trencament de la càpsula ovàrica<sup>12</sup>.

#### **En estadis avançats**

Quan el càncer es troba en estadis avançats, aquest es troba estès per zones veïnes a l'ovari, com la cavitat pèlvica i el peritoneu. En aquesta situació el tractament consisteix en una cirurgia cito-reductora. És a dir, en extirpar tots els tumors visibles per tal d'augmentar la supervivència de la pacient. Aquesta cirurgia també es pot dur a terme després d'un tractament de quimioteràpia, que permet reduir la mida dels tumors per tal de facilitar la seva extirpació.

### **2.5.2. Quimioteràpia: Compost de platí i taxans**

#### **En estadis inicials**

A les pacients amb risc de recaiguda es complementa el tractament quirúrgic amb quimioteràpia. La quimioteràpia en aquest tipus de càncer consisteix en la combinació de dos medicaments. S'usa la combinació d'un compost de platí, que pot ser o bé el cisplatí o el carboplatí, i un taxà, que pot ser o bé el paclitaxel o el docetaxel. A aquestes pacients se'ls administraran les dosis que els especialistes trobin necessaris, però habitualment se'ls administra com a mínim 3-4 dosis.

---

<sup>12</sup> Càpsula ovàrica: Càpsula que envolta l'ovari.



## En estadis avançats

S'utilitza la mateixa combinació d'un compost de platí i un taxà, però en aquest cas el més habitual és administrar 6 cicles a la pacient, que duren aproximadament 21 dies (una dosi cada tres setmanes). La quimioteràpia es pot administrar per via intraperitoneal, és a dir, de manera directa a la cavitat peritoneal mitjançant un tub. Però tot i ser molt eficaç, aquesta quimioteràpia té molts efectes secundaris, de manera que només se'ls administra a aquelles pacients amb un bon estat general.

Alguns dels afectes secundaris més freqüents són els següents: vòmits, fatiga, anèmia, baixada dels leucòcits i els trombòcits i caiguda dels cabells.

També hi ha la possibilitat de seguir un tractament antiangiogènec, amb el qual s'aconsegueix aturar el creixement del càncer. Això s'aconsegueix mitjançant l'administració d'un fàrmac anomenat Bevacizumab per via intravenosa que evita que el tumor construeixi els vasos sanguinis necessaris per a la seva alimentació.

Però aquest tractament també presenta una sèrie d'afectes secundaris, dels quals els més freqüents són la hipertensió arterial i la proteïnúria, és a dir, l'eliminació de proteïnes per la orina. Però gran part d'aquests efectes adversos es poden solucionar amb l'administració de determinats medicaments que permeten controlar-los.

### 2.5.2.1. Els compostos del platí: el cisplatí. Què és i com actua.

El cisplatí és un medicament quimioteràpic utilitzat en el tractament contra el càncer. Aquest fàrmac és capaç d'aturar la proliferació descontrolada de les cèl·lules tumorals, modificant la divisió cel·lular i destruint les cèl·lules que es multipliquen massa ràpid.

Una manera d'actuar d'aquest fàrmac és provocar alteracions en l'estructura de l'ADN i inhibir l'ADN polimerasa<sup>13</sup>, l'ARN polimerasa<sup>14</sup> i altres enzims importants en la duplicació i traducció de l'ADN (fase S del cicle cel·lular).

Altres mecanismes d'acció del cisplatí són: danyar els mitocondris<sup>15</sup>, disminuir l'activitat d'ATP(Adenosina Trifosfat)<sup>16</sup> i alterar els mecanismes de transport cel·lular. El cisplatí

---

<sup>13</sup> ADN polimerasa: Enzim encarregat de duplicar les cadenes d'ADN durant la duplicació.

<sup>14</sup> ARN polimerasa: Enzim encarregat de sintetitzar ARN.

<sup>15</sup> Mitocondris: orgànuls cel·lulars encarregats de la respiració cel·lular, la qual proporciona a la cèl·lula l'energia necessària per a realitzar totes les seves activitats.

<sup>16</sup> ATP(Adenosina Trifosfat): Molècula orgànica molt rica en energia.

aconsegueix provocar, finalment, l'aturada del cicle cel·lular en la fase G<sub>2</sub> i posteriorment causa la mort cel·lular programada.

Aquest medicament s'administra per via intravenosa en forma de infusió, és a dir, en forma líquida, i la quantitat que s'administra depèn de factors com: l'alçada del pacient, el seu pes, el seu estat de salut, el tipus de càncer que pateix, entre d'altres.

Entre els efectes secundaris d'aquest fàrmac trobem: infeccions, neoplàsies benignes, trastorns del sistema limfàtica sanguini, trastorns del sistema immunològic, trastorns endocrins, trastorns del metabolisme i la nutrició, trastorns del sistema nerviós, trastorns oculars, trastorns de l'oïda, trastorns cardíacs, trastorns vasculars i alteracions musculoesquelètiques i dels teixits conjuntius.

Els efectes secundaris d'aquest medicament i la gravetat d'aquests venen condicionats per la quantitat de substància que s'administra. Dit això, cal destacar que la majoria dels pacients no acostumen a experimentar tots els efectes secundaris esmentats anteriorment.

#### **2.5.2.2. Els taxans. Què són i com actuen**

Els taxans són, com ja s'ha comentat anteriorment, fàrmacs utilitzats en la quimioteràpia, combinats amb cicles de cisplatí, com a tractament contra el càncer d'ovari, entre d'altres. Aquests medicaments actuen inhibint la funció dels microtúbuls del fus mitòtic<sup>17</sup>, fent així que les cèl·lules no puguin dur a terme correctament la mitosis, i per tant no es puguin dividir, de manera que acaben experimentant la mort cel·lular o apoptosi.

Aquests fàrmacs s'administren per via intravenosa i la quantitat que s'administra a cada pacient depenen de factors com: la seva alçada, el seu pes, el seu estat de salut, el tipus de càncer que pateix, com ja hem esmentat anteriorment a l'apartat 2.5.2.1, relacionat amb l'administració de cisplatí. Els taxans més utilitzats en al tractament del càncer d'ovari són el Pacitaxel i el Docetaxel. Aquests fàrmacs presenten una sèrie d'efectes secundaris que es troben descrits a l'annex 2 i 3.

#### **2.5.2.3. L'Olaparib. Què és i com actua**

El fàrmac olaparib (Lynparza) és un medicament que s'utilitza com a teràpia de manteniment i com a tractament per a aquelles dones amb càncer d'ovari avançat i que ja

---

<sup>17</sup> Microtúbuls del fus mitòtic: Estructures present en les cèl·lules eucariotes de gran importància en la divisió cel·lular.

han dut a terme varis cicles de quimioteràpia. Cal destacar que aquest fàrmac únicament és efectiu en aquelles dones que presenten mutacions en el gen BRCA 1, en el gen BRCA 2 o en ambdós gens. Diferents estudis han confirmat que aquest fàrmac és capaç de retardar les recaigudes de manera destacable a partir del primer cicle de quimioteràpia.

Aquest fàrmac actua inhibint la proteïna PARP. Aquesta proteïna s'encarrega de corregir errors produïts a l'ADN en la duplicació i la traducció o en altres moments del cicle. Inhibint aquesta proteïna, el que s'aconsegueix és que totes aquelles cèl·lules que tenen el gen BRCA mutat s'autodestruïxin. Això ocorre perquè el gen BRCA sintetitza una molècula, que igual que la proteïna PARP, ajuda a la correcció i reparació de l'ADN. Llavors, la cèl·lula, al quedar-se sense cap d'aquests correctors d'ADN, experimenta la mort cel·lular programada per tal d'evitar heretar l'ADN defectuós, ja que sense aquests correctors d'ADN, no pot arreglar els possibles errors que es puguin anar donant amb les múltiples duplicacions posteriors.

### **2.5.3. Seguiment del tractament i recaigudes: bio-marcadors**

Com tota malaltia, el càncer té un seguiment. L'objectiu principal d'aquest seguiment és identificar canvis en la salut de la pacient relacionats amb: la possible recaiguda del càncer en el mateix lloc del tumor primari o en situació de metàstasi, la detecció precoç de l'aparició de nous tumors i la valoració d'efectes secundaris relacionats amb els tractaments administrats. En aquest seguiment juguen un paper molt important els bio-marcadors tumorals.

El concepte "bio-marcador" és definit per l'Institut Nacional del Càncer" com a "una molècula biològica que es pot trobar a la sang, en fluids o en teixits, la presència o absència de la qual és un signe d'un procés normal o anòmal o bé una condició de malaltia." És a dir, és una substància, l'anàlisi de la qual, dona molta informació de la possible existència d'un càncer i del seu estat. Per tant, aquests marcadors són molt útils tant pel diagnòstic com pel seguiment del càncer.

Dins d'aquesta definició, trobem entre d'altres, els bio-marcadors de resposta a la teràpia. Aquest tipus de bio-marcadors s'utilitzen per fer el seguiment de la reacció d'un pacient que pateix una malaltia concreta quan se li administra un fàrmac determinat. Identifica quins pacients són susceptibles a un efecte específic del fàrmac i quins no, de manera que permeten saber si el tractament està resultant útil per a la pacient o no.

Un d'aquests bio-marcadors tumorals, que s'ha utilitzat en la part experimental d'aquest treball de recerca, és el Ki67. Aquest bio-marcador és molt utilitzat com a marcador

tumoral de diagnòstic en el càncer de mama, però en aquesta investigació s'utilitza com a marcador de seguiment terapèutic, que permet saber si els fàrmacs utilitzats sobre les cèl·lules en cultiu aconseguen reduir la proliferació de les cèl·lules.

A més dels tractaments que tenen com a objectiu l'eliminació del càncer, existeixen d'altres que tenen com a objectiu controlar els símptomes i mantenir la qualitat de vida del pacient. Quan la recaiguda consisteix en l'aparició de nous tumors, el més comú és una cirurgia cito-reductora combinada amb una quimioteràpia posterior. D'altra banda, depenent del temps que ha passat des de l'última dosi que se li ha administrat a la pacient i la recaiguda, el tractament quimioteràpic serà diferent.

Com s'ha pogut veure, el càncer d'ovari es tracta generalment amb cirurgia i quimioteràpia. Aquests tractaments són força eficaços però, en el cas de la quimioteràpia, també molt nocius per la resta de cèl·lules del cos. L'aplicació d'aquest tractament provoca molts efectes secundaris sobre l'organisme de la pacient i la debilita, cosa que fa que no sigui el tractament ideal, ja que sovint els danys que causa són majors a les millores que pot generar. A més a més, no es coneixen gaires marcadors tumorals de diagnòstic ni de seguiment d'aquest tipus de neoplàsia en concret, cosa que fa que molts dels casos es detectin en estadis avançats de la malaltia i conseqüentment, el pronòstic sigui pitjor. Per aquest motiu, la recerca de nous tractaments i de marcadors de diagnòstic per tal de detectar la malaltia abans i que aquests tractaments siguin més afectius, és molt important per a poder progressar en la lluita contra aquesta patologia que causa milers de morts cada any.

### **3.Fases en la recerca de nous tractaments i noves línies d'investigació**

Tal i com s'ha vist a l'apartat anterior, els tractaments contra el càncer d'ovari, i contra el càncer en general, busquen afectar directa o indirectament a les cèl·lules tumorals per tal d'erradicar el tumor, sempre procurant afectar mínimament les cèl·lules no-tumorals.. Tot i això, com s'ha vist anteriorment, encara no s'ha trobat cap tractament que no afecti en cap mesura a les cèl·lules sanes i per tant, no presenti efectes secundaris.

Per aquest motiu, actualment hi ha moltes noves línies d'investigació que tenen com a objectiu la recerca de nous tractaments per al càncer d'ovari, per tal de trobar-ne de nous que presentin una major eficàcia i una menor quantitat d'efectes secundaris.

Però la recerca de nous tractaments no s'inicia amb l'aplicació directa del medicament sobre els pacients, sinó amb el que es denomina com a estudis pre-clínic o de laboratori. Aquests estudis consisteixen en:

En primer lloc, estudis cel·lulars. Són habitualment les primeres proves que es realitzen a l'hora d'estudiar un nou tractament. Els investigadors analitzen els efectes del nou tractament en cèl·lules en cultiu, és a dir, en cèl·lules que s'han fet créixer de manera controlada en plaques de laboratori o tubs d'assaig.

En un segon moment, si el nou tractament, al ser provat en cèl·lules en cultiu resulta eficaç, es passa a provar-lo en animals de laboratori. De manera que, aquells tractaments que aparentment són prometedors segons els estudis realitzats en les cèl·lules en cultiu, són provats sobre animals de laboratori vius. Això permet comprovar si el tractament també és eficient en un organisme viu.

Però, aquest estudis realitzats al laboratori, tot i proporcionar molta informació útil per a la recerca, no són suficients per a saber si un tractament és realment eficaç i segur per a ser utilitzat en pacients. Els humans i els animals de laboratori, com per exemple els ratolins, no són iguals, no absorbeixen, ni processen, ni eliminen de la mateixa manera un medicament. De manera que un tractament pot ser eficaç sobre un ratolí, però no ser-ho sobre els humans. A més un tractament pot no provocar cap efecte secundari visible sobre l'animal de laboratori, però en canvi, sí presentar-lo sobre les persones.

Tot i així, si els estudis pre-clínic mostren que el tractament és prometedor, l'administració encarregada de regular els assajos clínics de tractaments, l'Agència Europea de Medicaments (EMA), a Europa, decideix si el nou tractament pot iniciar la següent fase per a la recerca de nous tractaments: els assajos clínics, que consisteixen en provar els nous medicaments en humans.

Generalment aquests assajos clínics es troben definits per etapes. Cadascuna d'aquestes fases està dissenyada per tal de respondre a certes qüestions.

Fase 0. En aquesta fase s'administren petites dosis del nou tractament a un número reduït de persones. Amb aquestes proves s'aconsegueix determinar si el medicament arriba al tumor, si el actua sobre el cos humà de la manera que s'espera i com responen les cèl·lules tumorals a aquest.

En aquesta fase dels estudis, és molt poc probable que els pacients notin cap millora, ja que les dosis administrades són molt baixes. Per una altra banda, aquesta baixa administració del tractament també afavoreix a que el risc sigui menor.

Fase I. Aquesta fase té com a objectiu determinar la dosi màxima d'un nou tractament que es pot administrar de forma segura sense causar efectes secundaris greus. Aquests estudis també són útils per determinar quina es la millor manera d'administrar un nou tractament.

En aquesta fase, primer s'administra una dosi baixa del tractament a un primer grup reduït de persones. Si només es manifesten efectes secundaris menors, s'administren dosis més altes a un segon grup. Aquest procés es repeteix fins que es troba la dosi amb més possibilitats de funcionar mentre els nivells d'efectes secundaris es troben dins del que es considera acceptable.

Fase II. En aquesta fase es determina l'eficàcia del tractament per a determinats tipus de càncer. En aquesta es treballa amb grups d'entre 25 i 100 persones amb, generalment, el mateix tipus de càncer, als quals se'ls administra el nou tractament segons les dosis i les vies d'administració que han resultat més adients en la fase I de l'assaig.

Fase III. Aquesta fase té com a objectiu comparar la seguretat i l'eficàcia del nou tractament amb els tractaments ja provats i utilitzats en el moment de manera estàndard. En aquests estudis es treballa amb un gran número de persones, mínim centenars d'elles i acostumen a durar més temps que els de les fases I i II.

Un cop assolida aquesta fase de la investigació. Quan s'ha demostrat que el nou tractament és més segur i presenta més avantatges que els tractaments estàndard del moment, s'envia una sol·licitud del nou tractament a l'EMA per a la seva aprovació. Aquesta determinarà mitjançant una revisió dels estudis i els assajos realitzats si el tractament es adequat per utilitzar-se en pacients o si considera que necessita més evidències que demostrin que els beneficis que ofereix el nou tractament són majors que els riscos que suposa.

Fase IV. En aquesta fase s'investiga els tractaments aprovats per l'EMA. Aquests tractaments estan disponibles als metges per a que el receptin als seus pacients, però els medicaments segueixen sota observació durant un llarg període de temps. Això es deu a que encara queden moltes preguntes a resoldre sobre el tractament, com per exemple si es possible que amb el pas del temps es descobreixin nous efectes secundaris d'aquest.

Els estudis que s'estan realitzant actualment són molt variats i en aquests s'estan provant coses molt diferents:

- Buscar la manera d'inhibir l'actuació de proteïnes que formen part de les vies de senyalització que regulen el creixement cel·lular.
- Trobar mecanismes per tal de que els fàrmacs arribin al tumor.
- Cercar de nous bio-marcatadors que proporcionin un millor diagnòstic.

- Estudiar la funció de determinats protooncogenes que es troben mutats en aquest tipus de càncer, per tal de trobar noves estratègies terapèutiques eficients que permetin un millor tractament d'aquests tumors.
- Buscar teràpies d'immunoteràpia i de teràpia dirigida per al càncer d'ovari
- Investigar el perquè de la resistència que presenten les cèl·lules tumorals als tractaments convencionals
- Provar l'eficàcia de la combinació de fàrmacs ja estudiats.

Un exemple d'aquest últim tipus d'investigació, és el que ha dut a terme recentment un grup d'investigació del grup Cell Death Discovery. Han estat provant al laboratori la combinació de dos medicaments: un que presenta un inhibidor de l'enzim PARP i un altre que consisteix en un compost d'arsènic. Aquests dos medicaments ja han estat provats anteriorment i els estudis han afirmat que per una banda, els inhibidors de la poli adenosina difosfat-ribosa polimerasa (PARP) mostren beneficis en la supervivència de pacients de càncer d'ovari que presenten els gens BRCA1 o 2 mutats o recombinats. Això es deu a que com ja s'ha dit anteriorment a l'apartat 2.5.2.3, quan es parlava de l'Olaparib, que actua també inhibint la proteïna PARP, tant els gens BRCA 1 i 2 com el PARP, són mecanismes de control que té la cèl·lula per controlar i corregir els possibles errors que pot presentar l'ADN, de manera que quan aquests dos mecanismes són inhibits, la cèl·lula inicia el procés d'apoptosi. Però aquest fàrmac té un inconvenient, i és que no presenta una gran eficàcia en tots els tipus de mutacions que pot presentar els gens BRCA 1 i 2. Per una altra banda, el medicament amb un compost d'arsènic, produeix talls en l'ADN, causant efectes antitumorals. Per aquesta raó els investigadors van pensar que la combinació d'ambdós fàrmacs podia millorar l'eficàcia del tractament, i així va ser. Aquest assaig es va realitzar en dues línies cel·lulars diferents: la línia Skov3, de la que es parlarà més endavant al marc pràctic del treball, i la línia CAO3. Els estudis realitzats mostren que aquesta combinació dels dos fàrmacs ha provocat una supressió important en la viabilitat de les cèl·lules tumorals i la seva proliferació. El tractament farmacològic també va causar danys en l'ADN i per tant, l'acceleració en el procés d'apoptosi en ambdues línies cel·lulars. Posteriorment, el tractament farmacològic que es proposava va ser provat en animals de laboratori i es va veure que aconseguia reduir el creixement del tumor. Actualment, aquest projecte, aquest tractament, està encara pendent de que la FDA (equivalent de l'EMA als Estats Units) determini si pot començar els seus assajos clínics.

## OBJECTIUS

Amb aquest treball els objectius s'han volgut assolir han estat els següents:

- Conèixer què és el càncer i què el causa.
  - Entendre les diferències entre les cèl·lules tumorals i les no-tumorals.
  - Conèixer si tots els càncers són iguals.
  - Saber l'alteració de quins elements provoquen l'aparició del càncer.
  - Establir patrons d'incidència i de distribució d'aquesta malaltia.
  - Conèixer si és possible la prevenció d'aquesta malaltia.
  - Revisar els diferents factors que suposen més risc de patir càncer (herència, factors ambientals, estil de vida, etc.)
- Establir quins són els tractaments existents i potencials per aquesta malaltia.
  - Fer una revisió bibliogràfica de tots els tractaments actuals.
  - Conèixer les noves vies d'investigació del càncer, en especial, del d'ovari.
- Experimentar de primera mà el que és treballar en un laboratori.
  - Treballar amb cèl·lules en cultiu.
  - Utilitzar maquinària pròpia d'un laboratori de recerca.
  - Conèixer mètodes d'investigació i anàlisi.
- Analitzar l'actuació d'un tractament que actualment s'aplica sobre pacients, en cèl·lules en cultiu.
- Conèixer el món de la recerca biomèdica, els mètodes d'investigació que s'utilitzen en aquesta i les diferents fases que es donen en la recerca de nous tractaments.
  - Entendre de quina manera es sap que un tractament és segur.
  - Establir el temps que pot passar des dels primers assajos d'un tractament fins a la seva comercialització.

## HIPÒTESIS

Les hipòtesis de la part pràctica del treball busquen trobar nous tractaments contra el càncer d'ovari, utilitzant diferents estratègies per alterar el cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals, amb una afectació mínima sobre les cèl·lules no tumorals. Les hipòtesis són formulades de la següent manera:



- 1- “Provocant una deficiència de nutrients a la cèl·lula, s’aconsegueix reduir la proliferació de les cèl·lules tumorals, afectant mínimament les cèl·lules no tumorals.”
  
- 2- “Evitant la síntesi de proteïnes necessàries per a la divisió de la cèl·lula amb l’aplicació d’actinomicina D, s’aconsegueix la reducció del nombre de cèl·lules tumorals en divisió, amb la mínima afectació sobre les cèl·lules no tumorals.”

## MARC PRÀCTIC

Com ja s'ha vist en el marc teòric del treball, els tractaments actuals que s'ofereixen pel càncer d'ovari tenen efectes secundaris que afecten la vida diària de les pacients. Per aquest motiu, un dels principals objectius de les noves vies d'investigació és trobar noves línies de tractament que presentin una eficàcia igual o superior als actuals però una menor quantitat i gravetat d'efectes secundaris.

Aquest treball de recerca investiga actuacions que tenen com a diana el cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals i analitza la seva potencialitat com a tractament. La part pràctica d'aquest treball consisteix en provar possibles tractaments sobre cèl·lules tumorals d'ovari en cultiu, i posteriorment, analitzar si aquests podrien ser una nova manera de tractar aquesta malaltia. S'ha dut a terme a l'IDIBELL dins del laboratori del Programa *ProCure-ICO*. En aquest programa hi ha diferents grups de treball segons especialitats terapèutiques i tipus de tumors; la part experimental del treball es realitza concretament amb el grup de *Molecular Signaling*; que realitza estudis dels tumors analitzant els senyals moleculars i treballa majoritàriament en càncer d'ovari.

Per tal de comprovar si aquestes actuacions podrien funcionar com a nous tractaments per al càncer d'ovari, es du a terme un experiment. En aquest es valora l'afectació del cicle cel·lular a l'etapa de divisió de les cèl·lules en cultiu (tumorals i no-tumorals) mitjançant l'expressió del bio-marcador Ki67. Això es realitza un cop aplicada una substància (actinomicina D) i induint un dèficit de nutrients, sempre comparant-les amb l'actuació del mateix tractament també sobre cèl·lules no-tumorals. Els valors d'aquest bio-marcador permeten extreure conclusions sobre la taxa de divisió i per tant, fa possible confirmar o refutar les hipòtesis plantejades.

Per una altra banda, també es vol veure l'actuació d'un medicament actualment aplicat a pacients, el cisplatí, en cèl·lules en cultiu. Aquesta experimentació permet no només valorar l'afectació del fàrmac sobre cèl·lules tumorals, sinó també sobre cèl·lules no-tumorals sanes.

Els procediments utilitzats en l'experiment s'explicaran en tres apartats diferents per tal de reduir la complexitat del redactat i facilitar la comprensió de les etapes i objectius de cadascun d'ells:

- Creació de cultius cel·lulars per a l'experimentació a partir de línies cel·lulars

- Establiment de la proliferació cel·lular a partir de l'indicador ki67
- Anàlisi de la proliferació cel·lular tumoral i no tumoral sotmeses a diferents tractaments a partir de l'indicador ki67.

## 1. Material

El material utilitzat durant la part experimental del treball, dels quals es pot consultar la descripció i funció a l'annex 4, són els següents:

-Plaques de cultiu de 100ml.	-Bec bunsen.
-Plaques de cultiu de 6 pous.	-Microscopi.
-Pipeta serològica.	-Microscopi de fluorescència.
-Micropipetes.	-Incubador.
- Pipetejador	-Congelador.
-Tubs de microcentrífuga (Eppendorfs)	-Campana de flux laminar.
-Bomba de buit	-Material per crear medis de cultiu cel·lulars (DMEM, RPMI, FBS, Piruvat, L-glutamina, Penicil·lina i Estreptomicina)
-Vidres.	
-Porta objectes.	
-Pinces.	-Anticòs Ki67 i anticòs secundari.

## 2. Creació de cultius cel·lulars per a l'experimentació a partir de línies cel·lulars

Per a la investigació s'utilitzen 3 línies cel·lulars, dues tumorals i una no-tumoral, cultivades in-vitro per crear cultius cel·lulars.

El cultiu cel·lular és un procés en el qual es donen les condicions òptimes per tal de permetre la proliferació controlada de cèl·lules, fins a obtenir un nombre elevat. Totes aquestes cèl·lules conserven la seva autonomia i no treballen de manera coordinada, és a dir, que actuen com a cèl·lules individuals i no com a teixits.

Com ja s'ha comentat a l'apartat 3 del marc teòric del treball, en les primeres fases de les investigacions s'utilitzen cultius cel·lulars que no es comporten com a teixits. S'assumeix que si aquestes cèl·lules en cultiu es veuen afectades pel tractament utilitzat, també ho faran les d'un teixit o òrgan. Per aquest motiu, en les investigacions es busca treballar amb cèl·lules més semblants possible a les cèl·lules afectades pels tumors o malaltia.

## 2.1. Línies cel·lulars

Les tres línies cel·lulars que s'utilitzen en la investigació són les següents:

### -Cèl·lules C2C12

Les cèl·lules C2C12 són cèl·lules mioblastes de ratolí, és a dir, cèl·lules que donen lloc a cèl·lules musculars. Són cèl·lules no-tumorals i es caracteritzen per tenir una estructura força allargada.

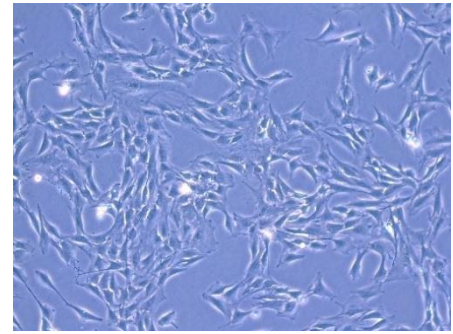


Fig. 8. Fotografia microscòpica cèl·lules C2C12

### -Cèl·lules A2780

Les A2780 són cèl·lules tumorals d'ovari de morfologia epitelial. Aquesta línia de cèl·lules provenen d'una pacient que no havia sigut tractada abans d'extreure-li aquestes cèl·lules amb les que ara s'investiga. Per tant, aquestes no han estat sotmeses a cap mena de medicament ni tractament abans de ser extretes.

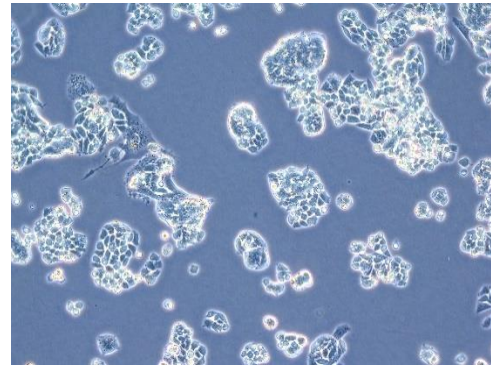


Fig. 9. Fotografia microscòpica cèl·lules A2780

### -Cèl·lules Skov3

L'altre tipus de cèl·lules tumorals amb les que es treballa són les Skov3, són cèl·lules epitelials humanes extretes d'un càncer d'ovari. Més concretament, aquestes cèl·lules van ser extretes d'una dona blanca de 64 anys quan patia aquesta malaltia, i s'han anat duplicant, clonant, per tal de poder investigar amb elles. Aquestes cèl·lules, a diferència de les A2780, si que van estar sotmeses a tractaments abans de ser extretes.

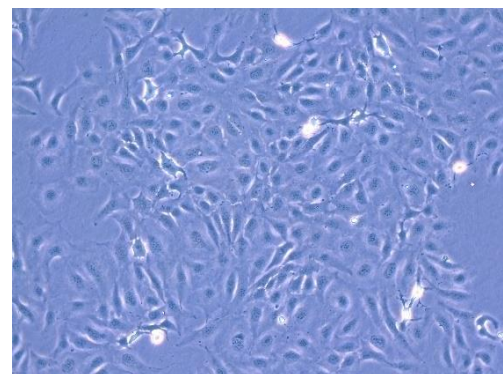


Fig. 10. Fotografia microscòpica cèl·lules Skov3

## 2.2. Creació d'un cultiu cel·lular

El procediment que es duu a terme per a preparar els cultius cel·lulars utilitzats en la investigació és el següent:

**1r.** S'extrauen les diferents línies cel·lulars del congelador de nitrogen líquid.

Els congeladors de nitrogen líquid es troben en una cambra aïllada i són capaços d'arribar a temperatures de  $-200^{\circ}\text{C}$ . Per aquest motiu, a l'hora de recollir els eppendorfs, que contenen les cèl·lules congelades, els quals es troben dins de diferents compartiments del congelador, s'utilitzen materials per protegir-se de possibles corrosions. Aquest equipament de protecció consta de: uns guants específics, una bata especial i una pantalla per tal de cobrir els ulls, la boca i el nas de possibles danys.

Un cop extretes les cèl·lules, s'utilitza un recipient de transport de cèl·lules especial, per transportar-les de la sala on es troben els congeladors al laboratori.

**2n.** Es netegen amb desinfectant els envasos dels diferents materials necessaris per crear plaques amb medi de cultiu (DMEM, RPMI, FBS, piruvat, L-glutamina i Penicil·lina) amb l'objectiu d'eliminar qualsevol substància externa que pugui contaminar la mostra.

**3r.** Es crea el medi de cultiu afegint als pots de DMEM i RPMI diverses substàncies d'enriquiment filtrades amb l'ajuda d'una xeringa i un filtre de 22 micròmetres.

Aquestes substàncies comunes a tots els medis de cultiu ( i imprescindibles per la vida cel·lular) són:

-FBS (Fetal Bovim Serum): Serveix per donar proteïnes i nutrients.

-Piruvat: És útil pel metabolisme de la cèl·lula.

-L-glutamina: És útil pel metabolisme de la cèl·lula.

-Penicil·lina i Estreptomicina: S'afegeixen per tal de que no creixin cossos no desitjats a les plaques, com fongs i bacteris.

S'afegeixen a medis específics per cada tipus cel·lular: DNEM per cèl·lules C2C12 i Skov3 i RPMI per cèl·lules A2780.

**4t.** S'afegeixen 12 ml del medi a les 3 plaques de 100 ml amb ajuda d'una pipeta serològica i un pipetejador. Es preparen dos amb la dissolució de DMEM(una per les cèl·lules Skov3 i l'altre per les C2C12) i una amb la de RPMI (per les cèl·lules A2780).

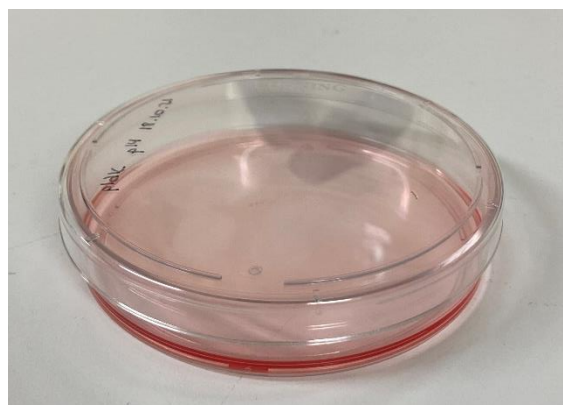


Fig.11. Imatge placa de cultiu cel·lular

S'escafa amb les mans l'ependorf on es troben les cèl·lules congelades i amb la pipeta serològica i el pipetejador s'afegeixen a cada placa les cèl·lules corresponents. Es guarden les plaques de cultiu a l'incubador.

Cal destacar que tot el procediment explicat anteriorment per a preparar el cultiu de les cèl·lules es realitza dins d'una campana de flux laminar, per tal de que la mostra no pugui ser contaminada per cap cos no desitjat.



Fig. 12. Campana de flux laminar

### **2.3.Divisió d'un cultiu cel·lular**

Quan s'experimenta amb cèl·lules en un laboratori, és molt important tenir més d'un cultiu de cada tipus de cèl·lula amb les que s'està treballant a l'abast, ja que si només es tinguéssim un i per qualsevol cosa l'experiment no sortís com s'esperava, s'hauria de tornar a repetir tot el procediment per a l'obtenció de cèl·lules en cultiu, cosa que suposaria una pèrdua innecessària de temps i de diners.

Per aquest motiu, dos dies després de sembra els cultius cel·lulars, quan les cèl·lules ja s'han reproduït prou, es divideix cada placa inicial (de cada línia cel·lular), en tres plaques diferents:

- Una placa d'experimentació, les cèl·lules de la qual s'utilitzaran per a l'experiment.
- Una placa de manteniment, per tal de tenir cèl·lules a l'abast si no sortís correctament l'experiment.
- Una placa per congelar. Es congelen novament les cèl·lules i es tornen a guardar al congelador per tal de que en un futur si algú més vol experimentar amb aquestes cèl·lules, en tingui a la seva disposició.

El procediment que es du a terme per dividir les tres plaques de cultiu inicial en tres de noves cadascuna és el següent:

1. Comprovació de la convergència de la placa al microscopi. S'analitza al microscopi la convergència de cada placa, per saber quina quantitat de cada tipus de cèl·lula cal transportar a la nova placa.
2. Extracció del medi de les plaques amb la bomba de buit i una pipeta Pasteur. Així es deixa únicament les cèl·lules sense medi a la placa, les quals es troben enganxades al fons d'aquesta.
3. Rentat de la placa amb PBS. S'afegeix una mica de PBS a les plaques i es treu un altre cop amb la bomba de buit, per tal de netejar les cèl·lules.
4. S'afegeixen entre 1 i 2 ml d'una dissolució de PBS+tripsina a cada placa de 100 ml per tal de que les cèl·lules s'aixequin del fons de la placa, i així puguin ser transportades. La tripsina és un enzim que trenca les proteïnes de la membrana plasmàtica de la cèl·lula que utilitza aquesta per enganxar-se. Actua a temperatura ambient.

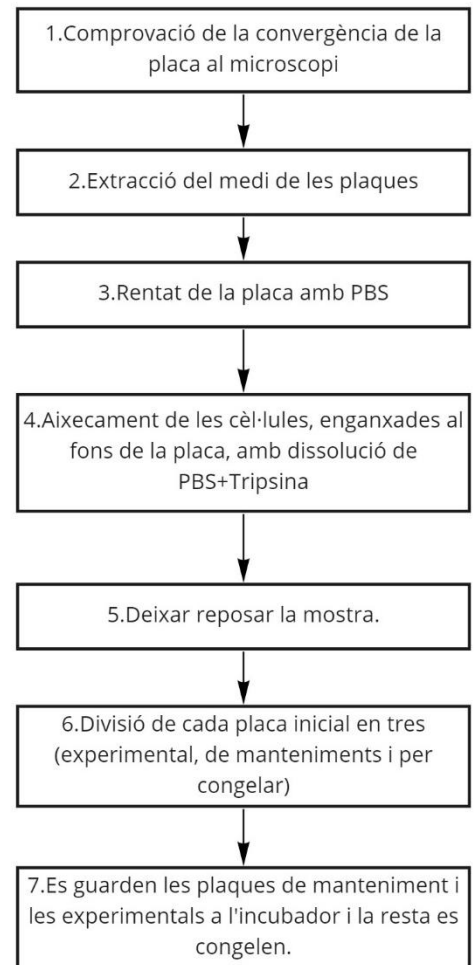


Fig. 13. Esquema procediment divisió de plaques

5. Comprovació a través del microscopi de si les cèl·lules ja s'han desenganxat del fons de la placa, després de 10-15 minuts de repòs, per tal de que la tripsina faci efecte.
6. Amb ajuda de la pipeta serològica i el pipetejador, s'afegeix la quantitat corresponent de cada tipus de cèl·lula a les tres plaques noves( 1 placa experimental, 1 de manteniment i 1 per congelar, per a cada tipus de cèl·lula) amb els seus medis corresponents, preparats novament per a cada placa.
7. Es guarden les plaques experimentals i les de manteniment a l'incubador i la resta es tornen a congelar.

També és molt important assenyalar que sempre que s'utilitzen cèl·lules en cultiu al laboratori, és imprescindible que cada dos o tres dies, al arribar al laboratori s'observi al microscopi com avança la convergència de cada placa de cultiu. És essencial fer-ho



perquè si es deixen créixer les cèl·lules sense parar dins d'una placa, arriba un moment en que aquestes no tenen prou espai i acaben morint-se per falta de superfície on viure. Si això passa, es perd la viabilitat del cultiu cel·lular i s'ha de preparar de nou. Així doncs, quan s'observa al microscopi una elevada convergència, es procedeix a dividir aquell cultiu en noves plaques. Per a fer-ho es du a terme el mateix procediment que en la divisió de les tres plaques inicials en tres de noves cadascuna.

### 3. Establiment de la proliferació cel·lular a partir de l'indicador ki67

Com s'estableix a l'aparat 1.3.3 del marc teòric, les cèl·lules tumorals presenten una taxa de divisió més elevada que la resta, produint una proliferació descontrolada. Així doncs, abans d'aplicar qualsevol tractament, s'ha d'establir quin és el grau de proliferació o quantitat de cèl·lules en divisió en referència al total de cada cultiu.

Per tal de valorar el percentatge de cèl·lules en divisió de les diferents línies cel·lulars, es mesura la presència del biomarcador ki67, visible amb tècniques d'immunofluorescència. (Més informació sobre biomarcadors a l'aparat 2.5.3 del marc teòric).

El ki67 és una proteïna globular que s'expressa (apareix, es detecta) al nucli cel·lular durant les fases G1, S, G2 i la mitosis, però en canvi no s'expressa en aquelles cèl·lules que es troben en la fase G0. Això vol dir que la presència de ki67 marca les cèl·lules que estan en divisió o en etapes que inevitablement portaran a la divisió (consulteu aparat 1.3.2 del marc teòric). Per tant, permet conèixer la quantitat de cèl·lules que es troben en divisió del total del cultiu i establir un índex de proliferació en %. De manera que com més alt sigui el nivell de ki67 en el tumor o de les cèl·lules en cultiu, més ràpid serà el seu creixement.

Aquesta tècnica d'immunofluorescència s'aplicarà a totes tres línies cel·lulars a partir dels respectius cultius un cop dividida cada placa de les diferents línies cel·lulars en tres plaques noves (una de manteniment, una altra de control i una experimental), per tal de comptar amb més cèl·lules amb les que poder experimentar si es necessita repetir l'experiment.

Però, aquesta tècnica no s'aplica al cultiu inicial, sinó que es transfereixen les cèl·lules de cada placa experimental a una única placa de 6 pous, de manera que aquesta nova placa, conté 2 pous de cada línia cel·lular



Fig. 14. Placa de 6 pous



A cada pou s'introdueixen 4 vidres per tal de que les cèl·lules s'enganxin a la superfície d'aquests i posteriorment, es puguin posar sobre un porta objectes, amb l'objectiu de poder observar les mostres al microscopi de fluorescència. Un cop introduïts els vidres, es du a terme la immunofluorescència del Ki67 que permetrà detectar la quantitat de Ki67 existent a les mostres.

Per tal de poder detectar les cèl·lules on es present el ki67 aquest s'ha de fer visible. Això és el que pretén la tècnica d'immunofluorescència, marcar aquesta proteïna amb un cos emissor de fluorescència detectable amb microscopis específics. Això s'aconsegueix mitjançant dos anticossos, un primer anticòs que detecta la molècula en concret que es vol identificar, i un segon anticòs que conté una substància fluorescent visible en el microscopi de fluorescència.

Primer, s'incuba el primer anticòs, anomenat anticòs primari, el qual localitza el ki67, que actua d'antigen per l'anticòs en aquest cas. Posteriorment, s'incuba el segon anticòs, l'anticòs secundari, el qual conté una substància fluorescent que fa possible que sigui visible al microscopi de fluorescència. Aquest segon anticòs s'adhereix a l'anticòs primari. D'aquesta manera, quan s'observen les mostres al microscopi, es pot veure de color verd les cèl·lules on s'expressa l'antigen que es vol detectar, en aquest cas, el Ki67.

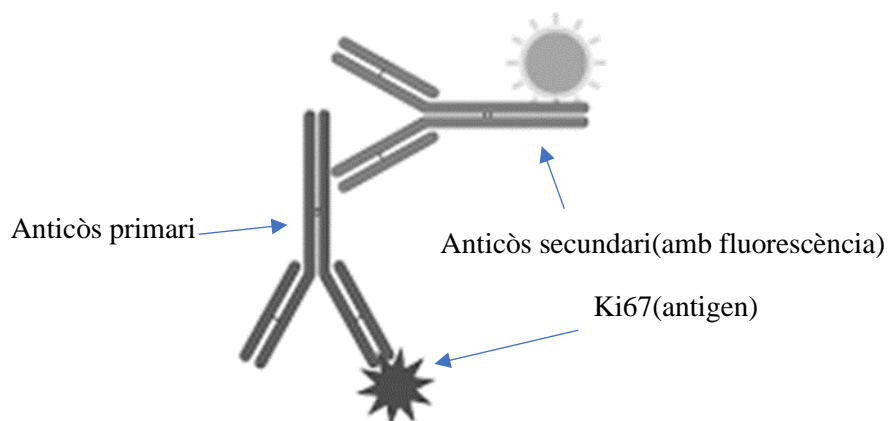


Fig. 15. Esquema complex antigen-anticòs primari + secundari

A banda d'aquests dos anticossos, també s'afegeix als cultius una substància anomenada Dapi que tinta tots els nuclis de les cèl·lules del cultiu de color blau, independentment de si en aquestes s'expressa el Ki67 o no. Això permet saber el nombre de cèl·lules existents al cultiu, per tal de posteriorment, a partir de les imatges obtingudes al microscopi de fluorescència, calcular el percentatge de cèl·lules amb Ki67, respecte les totals de la mostra.

En qualsevol prova de laboratori és imprescindible fer un control de l'experiment, per tal de comprovar que els resultats que s'estan obtenint no són producte d'un error de procediment, alteració de les mostres o d'una variable que no s'ha controlat. En aquest cas el control de l'experiment s'ha realitzat mitjançant l'aplicació de l'anticòs primari únicament a la meitat dels vidres preparats, i que per tant implica que si l'experiment s'ha dut a terme correctament, a aquells vidres no hi hauria d'expressar-se aquest anticòs que marca el ki67 en cap de les cèl·lules.

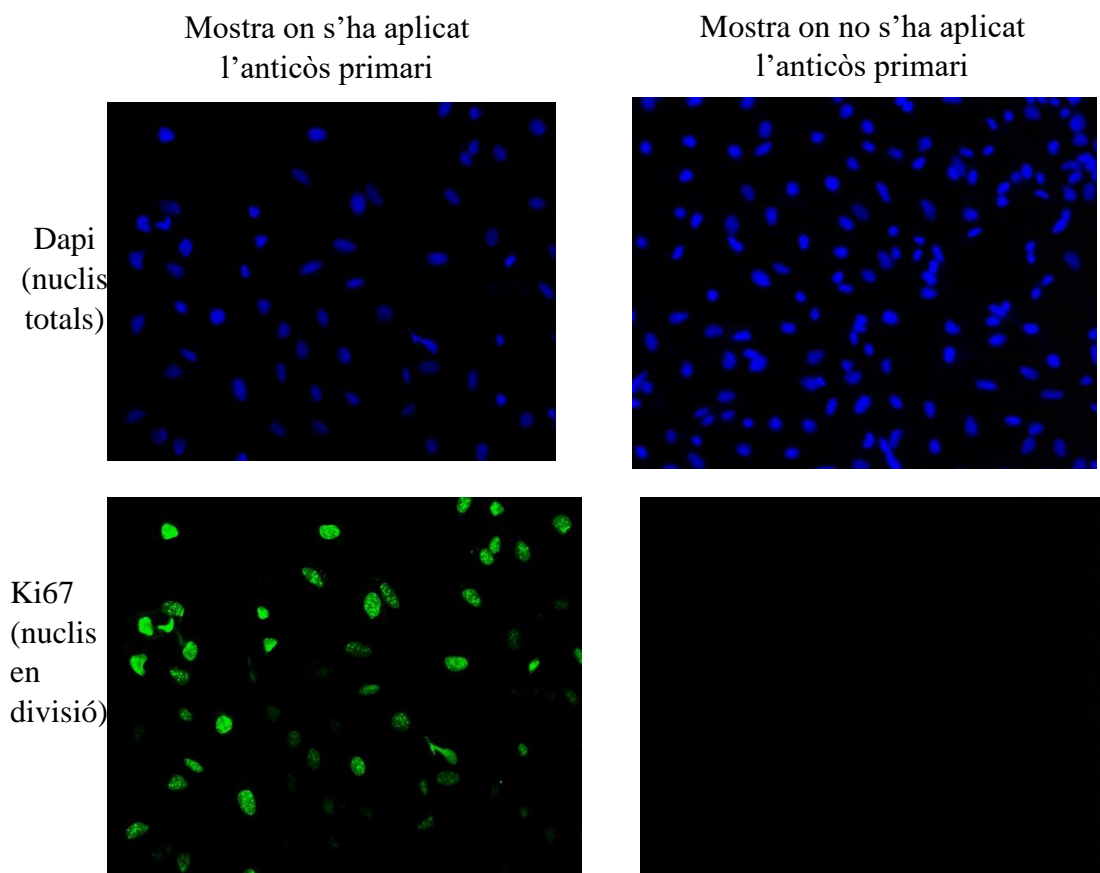


Fig.16. Imatges control de l'experiment

Un cop comprovat que els resultats obtinguts són verídics, s'extrauen fotos dels resultats de la immunofluorescència, per tal de fer el comptatge dels nuclis cel·lulars que presenten Ki67 respecte els que no i calcular el percentatge d'aquest bio-marcador en les mostres.

## Procediment:

### **1. Cultiu dels diferents tipus de cèl·lules en plaques amb el seu medi corresponent.**

Per a cultivar les tres línies cel·lulars, es duu a terme el procediment explicat anteriorment a l'apartat 2.4.(Preparació d'un cultiu cel·lular).

### **2. Divisió de la placa de cultiu inicial de cada tipus de cèl·lula en 3 plaques diferents.**

L'explicació detallada del procediment per tal de dividir les plaques inicials és troba explicat anteriorment a l'apartat 2.4(divisió d'un cultiu cel·lular).

### **3. Divisió de les plaques d'experiments en una placa de 6 pous.**

Per tal de dur a terme aquest pas de la tècnica, es segueix el mateix procediment que a la fase anterior, però en lloc de dividir-ho en tres plaques, es divideix en una única placa de 6 pous, de manera que s'obtenen 2 pous de cada tipus de cèl·lula.

### **4. Introducció de 4 vidres a cada pou.**

Per fer-ho, es duu a terme el següent procediment:

1. S'agafa el vidre amb ajuda d'unes pinces i es suca en alcohol.
2. Es crema el vidre amb un Bec Bunsen, per tal d'esterilitzar-lo.
3. S'introdueix el vidre dins del pou.
4. Es repeteix el mateix procediment per cada vidre.

### **5. Preparar cultius per a la immunofluorescència del Ki67.**

El procediment que cal seguir per tal de preparar la immunofluorescència del Ki67 de les mostres és el següent:

- 1) Neteja amb PBS 1x:

S'extreu el medi dels pous amb la bomba de buit i la pipeta Pasteur, s'afegeix PBS amb la pipeta i el pipetejador i es torna a extreure amb la bomba de buit.

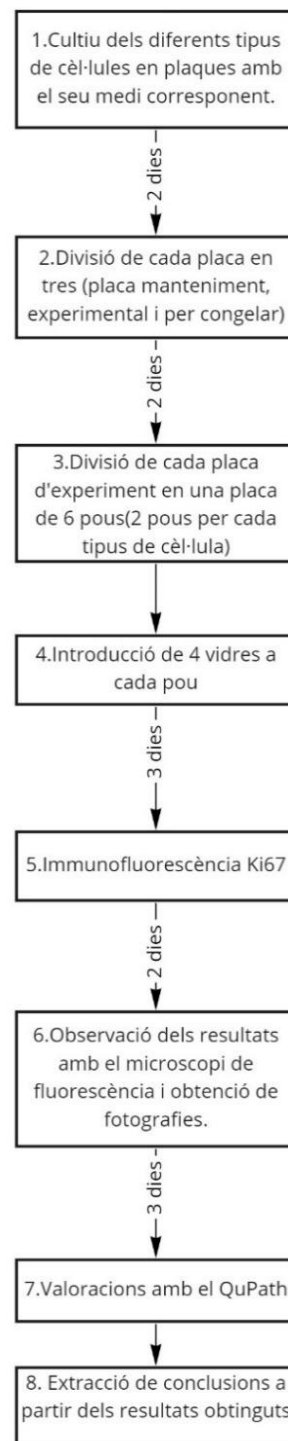


Fig. 17. Esquema procediment

Es repeteix el procediment 3 cops, i la última vegada es deixa el PBS a les plaques.

2) Fixació amb PFA al 4%

S'afegeixen 800 microlitres de PFA al 4% a cada placa amb ajuda de la pipeta i el pipetejador per a fixar les cèl·lules al fons de la placa i que no es moguin.

3) Netejar amb PBS 1x

Es du a terme el mateix procediment que en el primer rentat.

4) Permeabilització. Serveix per a facilitar el transport cap a l'interior de la cèl·lula.

a) S'afegeixen 1000 microlitres d'una dissolució 1x de tritó (100 microlitres PBS+900 microlitres aigua+1 microlitre Tritó) als pous.

b) Es deixen reposar les plaques 20 minuts a temperatura ambient.

5) Incubació Bovine Serum Albumin (BSA)

S'afegeixen 3 microlitres d'una dissolució de PBS 1x+ BSA al 1% (1 microlitre BSA al 3% + 2000 microlitres PBS 1x) als pous i es deixen reposar 20 minuts.

6) Incubació anticòs ki67. (Només l'afegim a 2 plaques de cada tipus de cèl·lula)

a) Es preparen 200 microlitres d'una dissolució de PBS 1x i l'anticòs primari (1 microlitre de l'anticòs primari+ 1999 microlitres de PBS 1x) dins d'un eppendorf.

b) S'afegeixen 30 microlitres de la dissolució a cada placa.

c) Es deixen reposar les mostres durant 1 hora.

7) Rentat amb dissolució de PBS 1x +tritó (0,1%)

Es du a terme com el primer rentat.

8) Incubació anticòs secundari( S'afegeix a totes les plaques)

a) Es preparen 1200 microlitres d'una dissolució del anticòs secundari i PBS 1x.(6 microlitres anticòs + 1194 microlitres PBS)

b) S'afegeix amb la micropipeta 200 microlitres de dissolució a cada placa.

c) Es deixen reposar les mostres 1 hora.

9) Rentat PBS 1x + tritó (0,1%)

10) Incubació DAPI 1/3000.

a) Es preparen 1500 microlitres d'una dissolució de DAPI i Stock  
1mg/microlitre(1micro litre dapi+ 300ml dissolució Stock)

b) S'introdueixen 125 microlitres de dissolució a cada placa.

c) Es deixen reposar les mostres 10 minuts.

11) Rentat PBS+ tritó

10) Muntatge.

S'extreuen dos vidres de cada cèl·lula (un amb els dos anticossos i un sense el primer de cada) amb les pinces i es col·loquen al porta objectes.

## 6. Observació dels resultats al microscopi de fluorescència i obtenció de fotografies.

**1r.** Posar un porta objectes al microscopi de fluorescència i observar-lo amb diferents filtres des de la pantalla d'un ordinador connectat al microscopi.

**2n.** Fotografiar les mostres amb una càmera connectada a l'ordinador.

**3r.** Repetir el procediment amb un nou vidre.

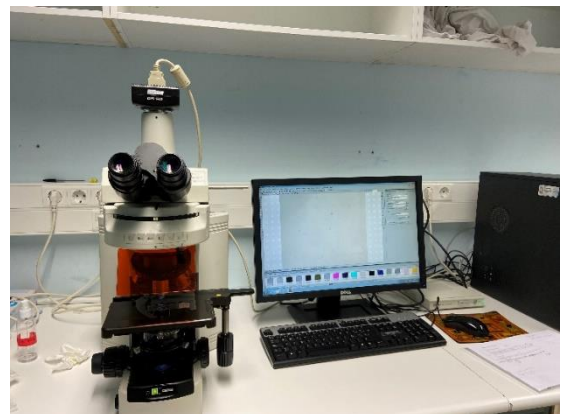


Fig. 18. Microscopi de fluorescència

## 7. Valoracions amb el QuPath

Es compten el nombre de nuclis (blaus) i de nuclis amb ki67 (verds) que hi ha en cada foto, mitjançant un programa d'ordinador anomenat QuPath. Per tal de després fer un recompte i poder calcular la mitjana del percentatge de ki67 existent en cada tipus de cèl·lula,



Fig.19. Logo programa QuPath

## 8. Extracció de conclusions a partir dels resultats obtinguts

A partir dels càlculs duts a terme a l'apartat anterior, s'extreuen conclusions.

#### **4. Anàlisi de la proliferació de les cèl·lules tumorals i no-tumorals sotmeses a diferents tractaments a partir de l'indicador ki67**

L'objectiu d'aquest experiment és sotmetre les cèl·lules a diferents situacions d'estrès, per tal d'analitzar si aquestes actuen sobre el cicle cel·lular de les cèl·lules, aconseguint reduir la seva proliferació. Amb aquest experiment també es vol considerar si imposar aquestes situacions d'estrès a les cèl·lules podrien ser possibles tractaments contra el càncer d'ovari. D'altra banda, també es vol observar com un tractament en ús actualment (el cisplatí) pot afectar les cèl·lules en cultiu de les primeres fases d'investigació.

Per valorar les cèl·lules en divisió als cultius dels diferents tipus cel·lulars, s'utilitza, com es fa també en l'establiment de la proliferació cel·lular de les diferents línies cel·lulars, la anàlisi de la quantitat de ki67 existent en les mostres, per tal de saber el percentatge de cèl·lules del cultiu que es troben en divisió.

Per aquest motiu, gran part dels procediments duts en l'experiment ja s'han explicat anteriorment a l'apartat 3 del marc pràctic (establiment de la proliferació cel·lular a partir de l'indicador ki67), de manera que a continuació només es detallen els procediments que suposen canvis.

## Procediment:

### **1.Preparació de 4 plaques de 6 pous a partir de les plaques de manteniment.**

A partir de les plaques de manteniment, es preparen 4 plaques de 6 pous cadascuna (dos pous per cada tipus de cèl·lula): 1 placa de control, 1 placa amb cisplatí, 1 placa d'actinomicina D i 1 placa on es provoca un dèficit de nutrients per a les cèl·lules. Aquestes plaques de cultiu es preparen tal i com s'ha explicat anteriorment a l'apartat de preparació i divisió de cultius cel·lulars, però en lloc de dividir les plaques inicials en tres de noves, es divideixen en 4 plaques de 6 pous.

### **2.Incubació de les diferents situacions d'estrès/tractaments**

#### 2.1 Control

La placa de control serveix per a poder veure l'evolució, el comportament de les cèl·lules sense estar en cap situació d'estrès. Per a obtenir-la, simplement es prepara la placa amb el seu medi corresponent, com s'ha explicat anteriorment.

#### 2.2. Dèficit de nutrients

A l'hora de preparar els medis de cada pou de la placa, en lloc d'afegir:

- DMEM/RPMI
- FBS (Fetal Bovim Serum)
- Piruvat
- L-glutamina
- Penicil·lina i Estreptomicina

S'afegeix tot menys FBS, per tal de deixar a la cèl·lula sense proteïnes ni nutrients amb que poder aconseguir energia per a dividir-se.

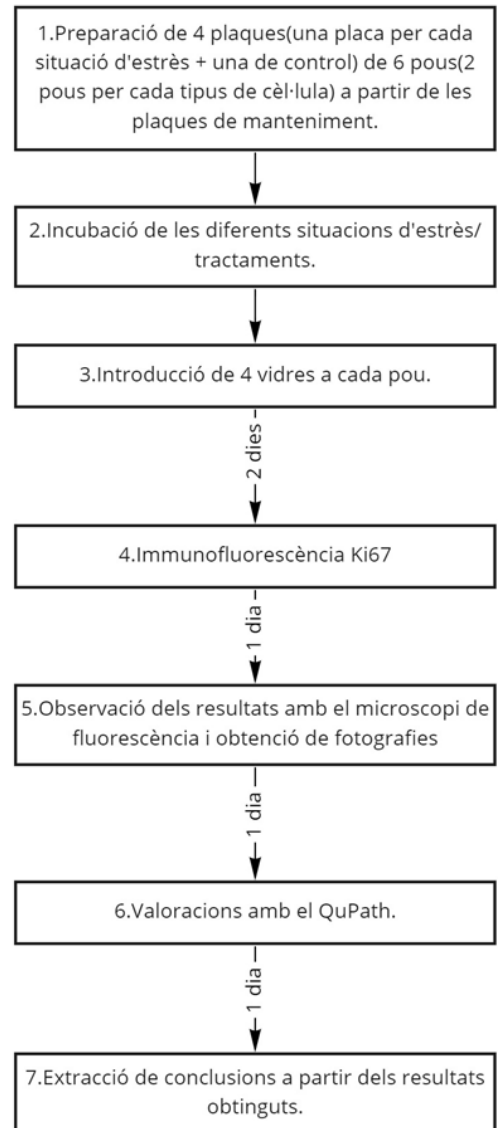


Fig. 20 .Esquema procediment

### 2.3. Actinomicina D

A cada pou de la placa s'afegeix 2 ml de medi amb 2 microlitres d'actinomicina D.

L'actinomicina D és un medicament que inhibeix la transcripció d'ADN a ARN i per tant, la cèl·lula no pot sintetitzar proteïnes. De manera que aquesta no té les proteïnes necessàries per a dur a terme el cicle cel·lular: no pot sintetitzar els enzims necessaris per a la duplicació de l'ADN, ni les proteïnes que constitueixen el fus mitòtic, ni les que empaqueten l'ADN en forma de cromosomes, entre d'altres.

Per tant, el que es busca amb l'aplicació d'aquesta substància és que la cèl·lula no pugui dur a terme correctament el cicle cel·lular, i per tant, no es pugui dividir.

### 2.4. Cisplatí

A cada placa s'aplica una quantitat de cisplatí determinada per tal d'eliminar el 10% de les plaques del cultiu. La quantitat varia en funció de la línia cel·lular de la qual es tracta, ja que cadascuna mostra una resistència diferent al tractament.

### **3. Introducció de 4 vidres a cada pou.**

Procediment idèntic que a apartat 3.

### **4. Immunofluorescència Ki67**

Procediment idèntic que a apartat 3.

### **5. Observació dels resultats al microscopi de fluorescència i obtenció de fotografies.**

Procediment idèntic que a apartat 3.

### **6. Valoracions amb el QuPath**

Procediment idèntic que a apartat 3.

### **7. Extracció de conclusions a partir dels resultats obtinguts**

Procediment idèntic que a apartat 3.

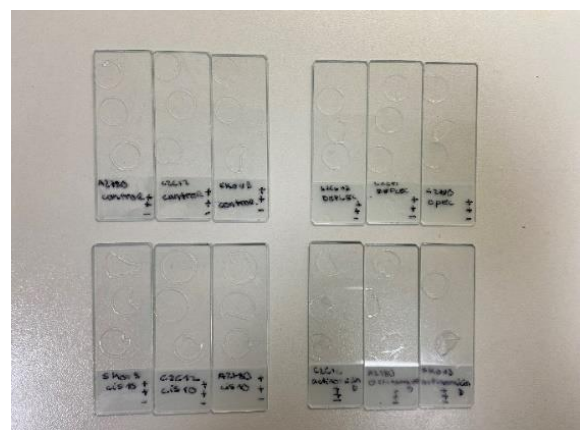


Fig.21. Porta objectes de les diferents situacions d'estress.



## RESULTATS

Un cop provats els tractaments en els cultius de diferents tipus cel·lulars i obtingudes les imatges de les mostres amb el microscopi de fluorescència, es procedeix a calcular el percentatge de de cèl·lules en les que s'expressa el Ki67. Això es realitza de la següent manera:

A partir de les imatges obtingudes, es fa un recompte de les cèl·lules que presenten el Ki67 i que per tant, mostren el nucli tintat de color verd, i dels nuclis tintats pel Dapi, de color blau. A partir d'aquest recompte, es calcula el percentatge de cèl·lules en divisió de la mostra, és a dir, el percentatge de nuclis verds(Ki67) respecte el total de nuclis blaus(Dapi).

### 1. Càlcul de la proliferació de les cèl·lules no-tumorals i de les tumorals

A continuació es pot observar un exemple de les imatges de la immunofluorescència del Ki67 de les mostres control(apartat 3 del marc pràctic). El recull de totes les fotos realitzades(no només les mostrades a continuació) és el que s'utilitza en el càlcul del percentatge de Ki67 en les mostres de les tres línies cel·lulars quan aquestes es troben en un medi favorable per a elles.

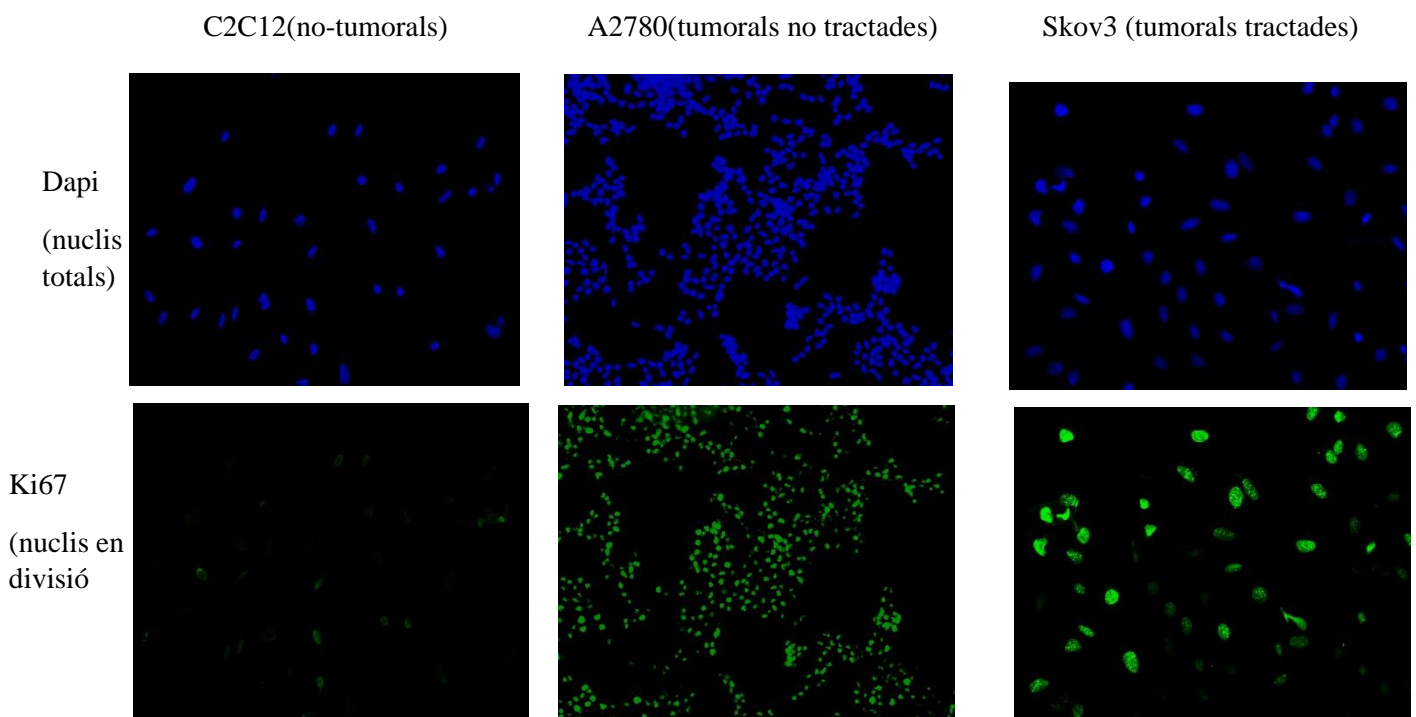


Fig 22. Fotografies extretes del microscopi de fluorescència de les diferents línies cel·lulars

Com es pot veure, les imatges posen els nuclis en divisió en relació amb els nuclis totals, de manera que permet calcular el % de cèl·lules en divisió

A la següent taula(Figura 23) es troben agrupats els recomptes tant de nuclis blaus(nombre de nuclis totals) com de nuclis verds(nuclis on s'expressa el Ki67) de cada fotografia. Aquestes dades s'extreuen, per una banda de les mostres obtingudes de les plaques control elaborades per a l'establiment de la proliferació cel·lular de cada línia cel·lular(apartat 3 marc pràctic)(dia 1). I , per una altra banda, de les plaques control preparades per a l'anàlisi de la proliferació de les cèl·lules tumorals i no-tumorals sotmeses a diferents tractaments(apartat 4 marc pràctic)(dia 2). En aquesta taula apareix també el percentatge de Ki67 mitjà existent en les mostres de cada línia cel·lular.

foto	C2C12		A2780		Skov3	
	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67
dia 1 a	30	9	652	450	62	45
dia 1 b	67	6	840	566	108	65
total dia 1	97	15	1492	1016	170	110
% ki67 dia 1	15,5		68,1		64,7	
dia 2 a	259	23	78	50	51	27
dia 2 b	188	22	62	55	48	36
total dia 2	447	45	140	105	99	63
%ki67 dia 2	10,1		75		63,63	
mitjana % ki67	12,8		71,55		64,17	

Fig 23. Taula recompte de nuclis totals i nuclis amb el Ki67 expressat + % Ki67 en les plaques de cada línia cel·lular

A continuació es mostra una gràfica comparativa de la mitjana del percentatge del biomarcador Ki67 existent en les mostres de cada línia cel·lular.

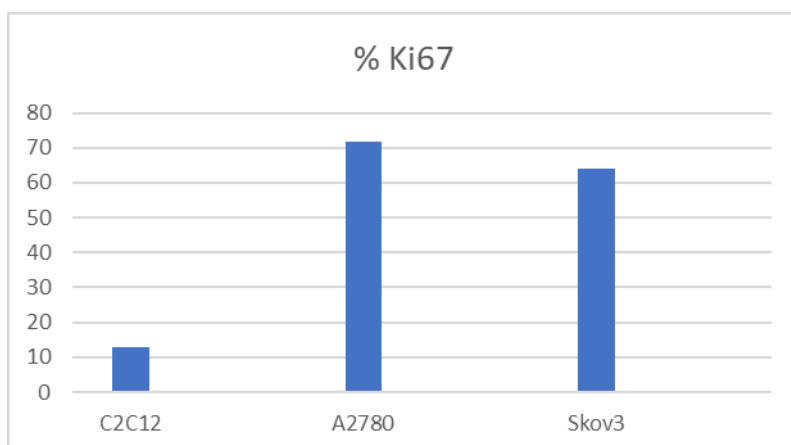


Fig 24. Gràfica comparativa del % Ki67 en les plaques de cada línia cel·lular

Tal i com es pot observar a la taula (figura 23), el percentatge de Ki67 en les cèl·lules tumorals (A2780 i Skov3) és molt superior al de les cèl·lules no-tumorals(C2C12). És a dir, el percentatge de cèl·lules que es troben en divisió és més elevat en les cèl·lules tumorals que no pas en les no-tumorals. Aquests valors mitjans percentuals es comparen al gràfic (figura 24) on s'observa clarament aquesta diferència en la proliferació de les cèl·lules tumorals i les no-tumorals. Aquestes dades a banda d'aclarir i mostrar que com és ben sabut, les cèl·lules tumorals proliferen amb major velocitat que les no-tumorals, també permeten conèixer el ritme de proliferació normal de cada línia cel·lular, per tal de poder-lo comparar posteriorment amb la seva proliferació quan aquestes es veuen afectades pels diferents tractaments plantejats.

## 2. Càlcul de la proliferació de les cèl·lules no-tumorals i de les tumorals en diferents situacions d'estrès.

### 2.1.Dèficit de nutrients

A continuació es pot observar un recull d'imatges a mode d'exemple de la immunofluorescència del Ki67 dels cultius cel·lulars sotmesos a un dèficit de nutrients.

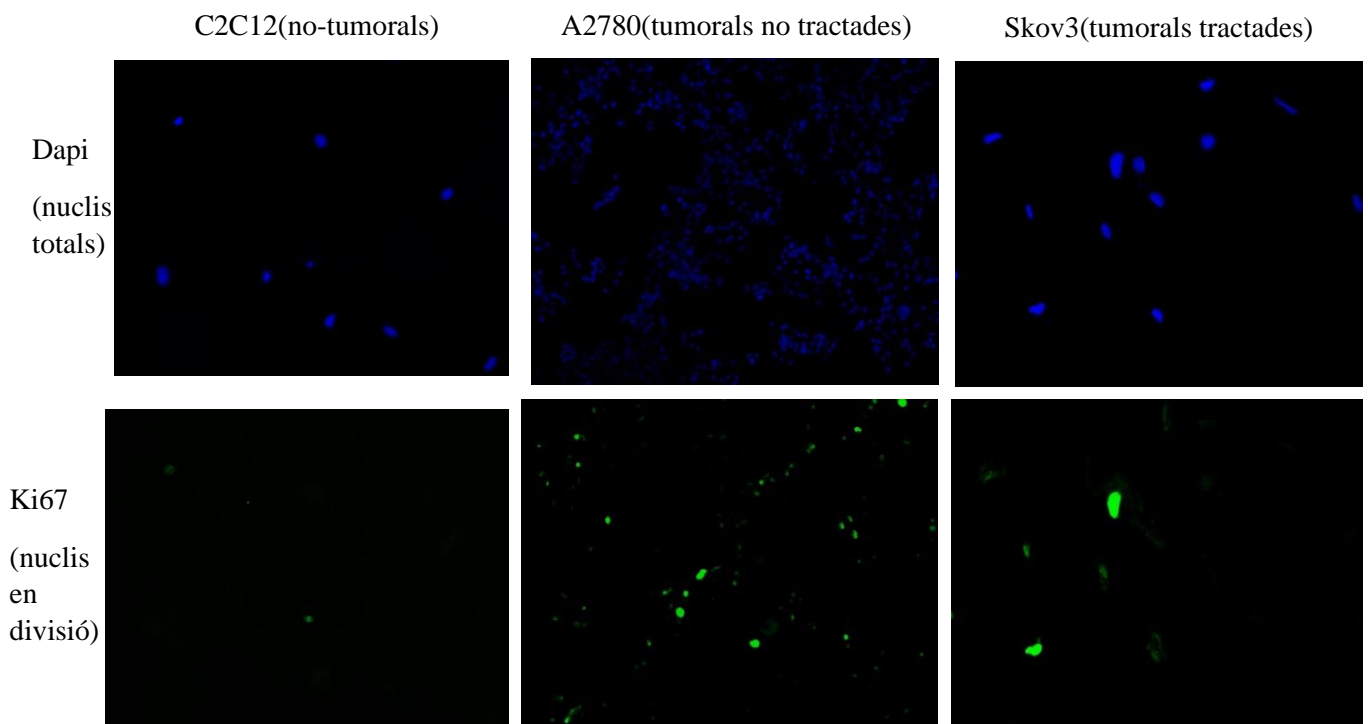


Fig 25. Fotografies extretes del microscopi de fluorescència de les diferents línies cel·lulars amb dèficit de nutrients

La següent taula (figura 26) recull el recompte de nuclis blaus (nombre de nuclis totals) i de nuclis verds(nuclis on s'expressa el Ki67) de cada fotografia, tant de les plaques control com de les plaques a les que s'indueix un dèficit de nutrients. Per una banda, en

el recompte de les plaques control, es tenen en compte tant les mostres obtingudes de les plaques control elaborades per a l'establiment de la proliferació cel·lular de cada línia cel·lular(dia 1), com les de les plaques control preparades per a la anàlisi de la proliferació de les cèl·lules tumorals i no-tumorals sotmeses a diferents tractaments(dia 2). Per l'altra banda, en el recompte de les cèl·lules de les plaques en les que s'ha induït un dèficit de nutrients, es tenen en compte les dades extretes de les mostres preparades per a la anàlisi de la proliferació de les cèl·lules tumorals i no-tumorals sotmeses a diferents tractaments(dia 2). Les lletres a i b fan referència a les diferents fotografies extretes d'un mateix cultiu.

<i>tipus cèl·lula</i>	<i>C2C12</i>				<i>A2780</i>				<i>Skov3</i>			
	control		dèficit de nutrients		control		dèficit de nutrients		control		dèficit de nutrients	
<i>tractament</i>	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67
<i>foto</i>												
<i>dia 1 a</i>	30	9			652	450			62	45		
<i>dia 1 b</i>	67	6			840	566			108	65		
<i>total dia 1</i>	97	15			1492	1016			170	110		
<i>% ki67 dia 1</i>	15,5				68,1				64,7			
<i>dia 2 a</i>	259	23	11	1	78	50	219	49	51	27	13	6
<i>dia 2 b</i>	188	22	13	1	62	55	566	41	48	36	30	12
<i>total dia 2</i>	447	45	24	2	140	105	785	90	99	63	43	18
<i>% ki67 dia 2</i>	10,1		8,3		75		11,46		63,63		41,86	
<i>% ki67 mitjana</i>	12,8		8,3		71,55		11,46		64,17		41,86	

Fig.26. Taula recompte de nuclis totals i nuclis amb el Ki67 expressat de cada mostra + comparativa del % de Ki67 de cada línia cel·lular amb dèficit de nutrients i les plaques control

A continuació s'ofereix una taula resum del percentatge de Ki67 existent en les mostres, tant de les plaques control com de les plaques en les que s'indueix un dèficit de nutrients.

<i>tipus cèl·lula</i>	<i>C2C12</i>		<i>A2780</i>		<i>Skov3</i>	
<i>tractament</i>	control	dèficit nutrients	control	dèficit nutrients	control	dèficit nutrients
<i>% ki67</i>	12,8	8,3	71,55	11,46	64,17	41,86

Fig.27. Taula resum del % de Ki67 de cada línia cel·lular amb dèficit de nutrients i les plaques control

Al gràfic següent (Figura 28) es compara el percentatge de Ki67 present a les diferents línies cel·lulars tant dels cultius control com aquells sotmesos a dèficit de nutrients.

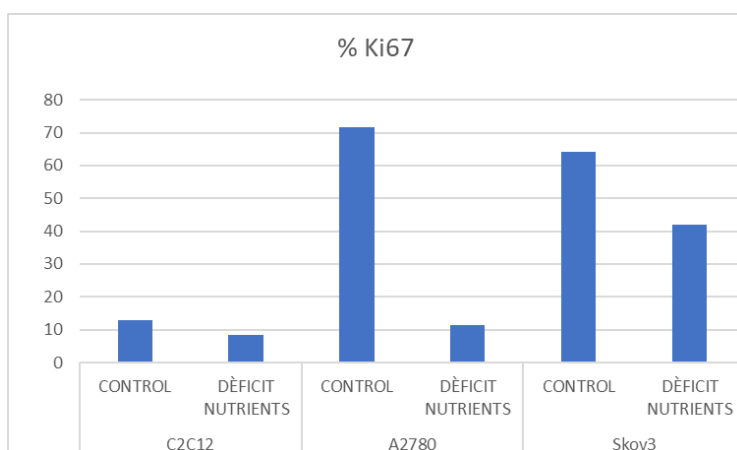


Fig. 28. Gràfica comparativa del % de Ki67 de cada línia cel·lular amb dèficit de nutrients i les plaques control

Com es pot veure a la taula (figura 27) a les plaques on no s'introdueixen nutrients, el nombre de cèl·lules tumorals en divisió es redueix, tant en les A2780, com en les Skov3. Per una altra banda, també es pot veure com provocant un dèficit de nutrients per la cèl·lula, les cèl·lules no-tumorals C2C12 també es veuen afectades. La reducció en la proliferació és significativament més forta a les cèl·lules A2780 que es redueix del 72% al 12% (suposaria un 83% de reducció), mentre que en les cèl·lules no tumorals C212 la reducció és del 13% al 8% (això suposa 38% de reducció) i en les cèl·lules Skov3 la reducció és del 64% al 42%(suposaria un 36% de reducció).

## 2.2. Actinomicina D

A continuació es mostra un recull d'imatges representatives de les obtingudes amb el microscopi de fluorescència dels cultius als quals se'ls afegeix actinomicina D.

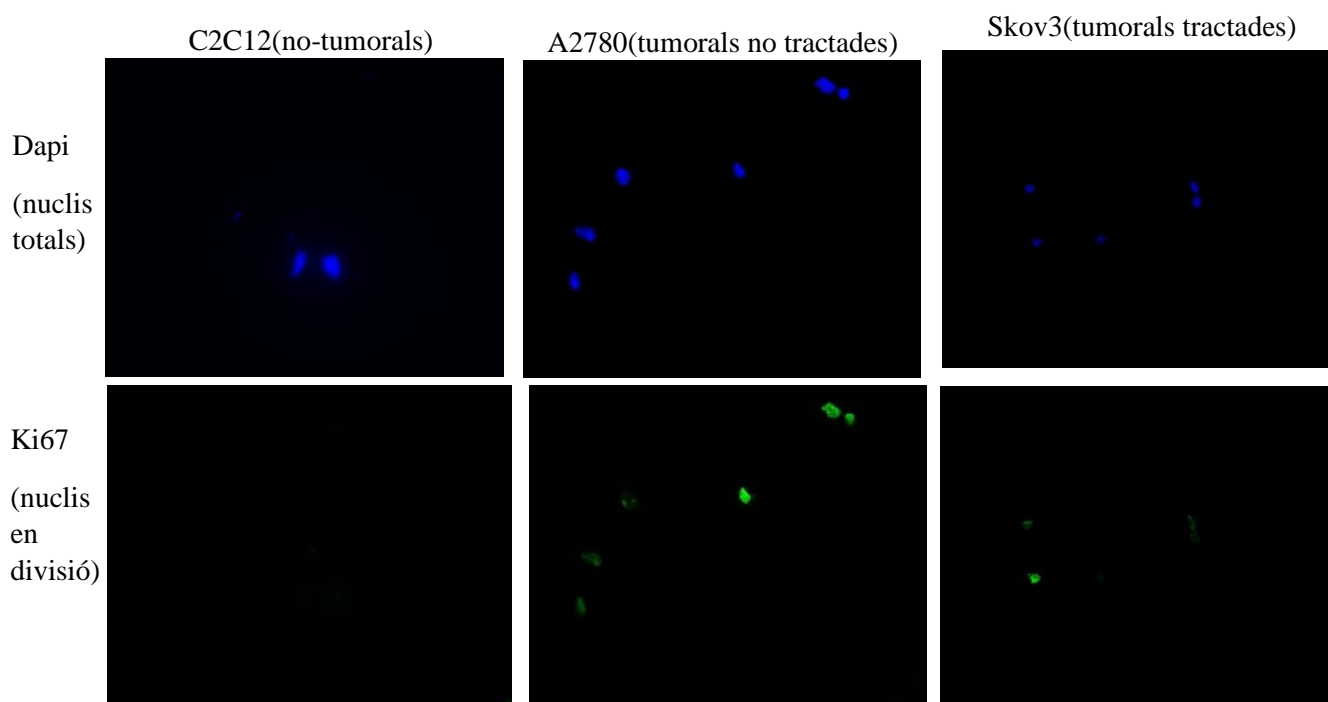


Fig. 29. Fotografies extretes del microscopi de fluorescència de les diferents línies cel·lulars amb actinomicina D

La següent taula es recull com en la taula anterior de dèficit de nutrients, el recompte dels nuclis totals i dels nuclis en els que s'expressa el Ki67 de tant les plaques control com les plaques on s'afegeix actinomicina D. Juntament amb el càlcul del percentatge de nuclis en els que s'expressa el bio-marcador respecte el nombre de nuclis totals.

tipus cèl·lula	C212				A2780				Skov3			
	control		Act D		control		Act D		control		Act D	
tractament	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67	Dapi	Ki67
<i>foto</i>												
<i>dia 1 a</i>	30	9			652	450			62	45		
<i>dia 1 b</i>	67	6			840	566			108	65		
<i>total dia 1</i>	97	15			1492	1016			170	110		
<i>% ki67 dia 1</i>	15,5				68,1				64,7			
<i>dia 2 a</i>	259	23	2	0	78	50	7	2	51	27	3	1
<i>dia 2 b</i>	188	22	2	0	62	55	6	6	48	36	5	2

<b>total dia 2</b>	447	45	4	0	140	105	13	8	99	63	8	3
<b>% ki67 dia 2</b>	10,1		0		75		61,54		63,63		37,5	
<b>% ki67 mitjana</b>	12,8		0		71,55		61,54		64,17		37,5	

Fig. 30. Taula recompte de nuclis totals i nuclis amb el Ki67 expressat de cada mostra + comparativa del % de Ki67 de cada línia cel·lular amb actinomicina D i les plaques control

A continuació s'ofereix una taula resum dels percentatges de nuclis que mostren Ki67, respecte el total de nuclis, tant dels cultius control com dels sotmesos a actinomicina D.

<b>tipus cèl·lula</b>	<b>C2C12</b>		<b>A2780</b>		<b>Skov3</b>	
<b>tractament</b>	control	Actinomicin a D	control	Actinomicin a D	control	Actinomicin a D
<b>% ki67</b>	12,8	0	71,55	61,54	64,17	37,5

Fig.31. Taula resum del % de Ki67 de cada línia cel·lular amb actinomicina D i les plaques control

A la gràfica següent (figura 32) es mostra una comparació de l'expressió de ki67 abans i després del tractament amb actinomicina D a les tres línies cel·lulars.

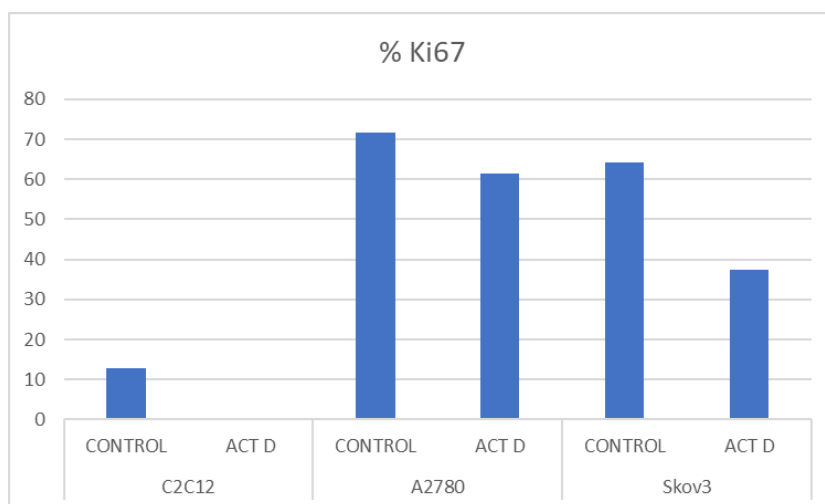


Fig. 32. Gràfica comparativa del % de Ki67 de cada línia cel·lular amb actinomicina D i les plaques control

Com es pot veure a la taula (taula 31), el percentatge de Ki67 en les plaques amb actinomicina D és inferior al de les plaques control en totes les línies cel·lulars. La reducció en la proliferació de les cèl·lules tumorals Skov3 es redueix del 64% al 37,5% (suposant un 41% de reducció) quan s'aplica actinomicina D al cultiu, i la de les

A2780 es redueix del 72% al 62% (suposant un 14% de reducció). Mentre que les C2C12 experimenten una reducció de la proliferació del 100% (disminueix del 13% al 0%). És a dir, que si abans es dividien 13 de cada 100 cèl·lules no-tumorals, ara es divideixen 0 de cada 100.

Aquesta disminució del percentatge de cèl·lules en divisió a causa de l'aplicació d'actinomicina D es pot veure clarament tant en el gràfic comparatiu del percentatge de Ki67 de cada tipus de cèl·lula amb actinomicina D i les plaques control (figura 32), com en el recull de les fotografies (figura 29).

### 2.3. Cisplatí

A continuació es pot observar un recull d'algunes de les imatges obtingudes de la immunofluorescència del Ki67 de les plaques amb cisplatí, un tractament ja utilitzat actualment en pacients, del qual es vol veure l'actuació en cèl·lules en cultiu.

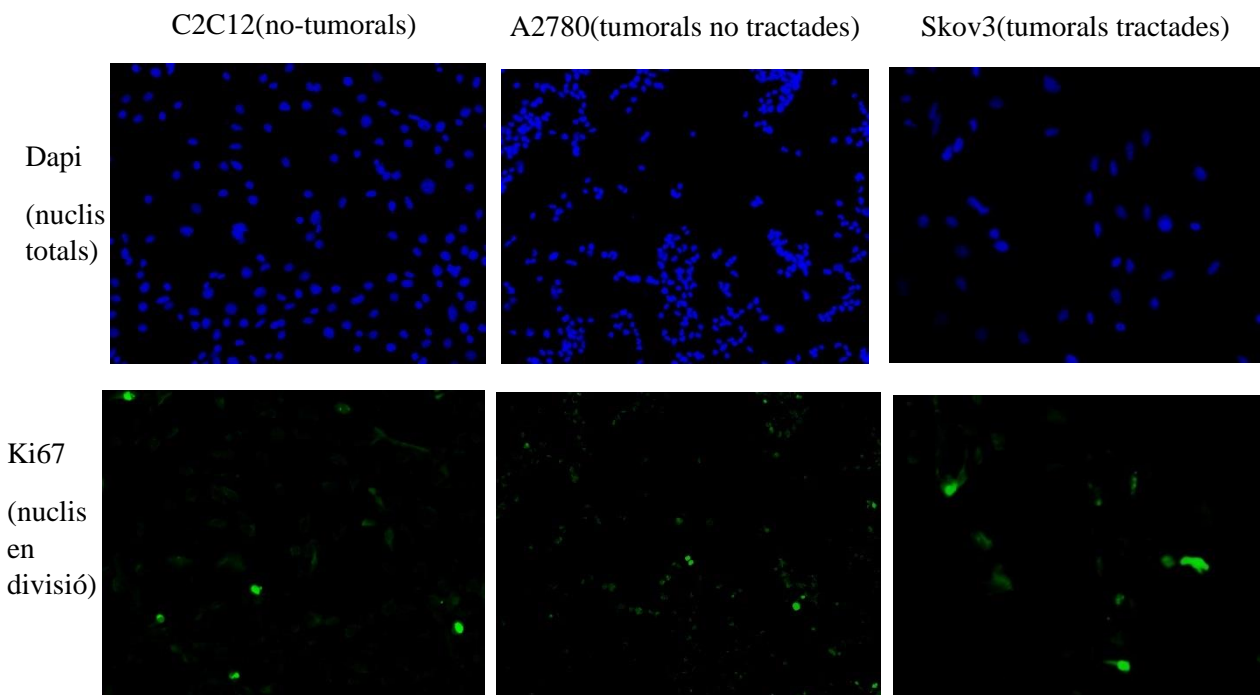


Fig.33. Fotografies extretes del microscopi de fluorescència de les diferents línies cel·lulars amb cisplatí

També s'ofereixen els resultats en una taula que recull el recompte de nuclis totals i nuclis on s'expressa el Ki67 de les plaques control i les plaques amb cisplatí de cada línia cel·lular.



tipus cèl·lula	C2C12				A2780				Skov3			
	control		cisplatí		control		cisplatí		control		cisplatí	
	dapi	ki67	dapi	ki67	dapi	ki67	dapi	ki67	dapi	ki67	dapi	ki67
foto												
dia 1 a	30	9			652	450			62	45		
dia 1 b	67	6			840	566			108	65		
total dia 1	97	15			1492	1016			170	110		
% ki67 dia 1	15,5				68,1				64,7			
dia 2 a	259	23	213	6	78	50	355	100	51	27	81	34
dia 2 b	188	22	184	8	62	55	424	120	48	36	25	16
total dia 2	447	45	397	14	140	105	779	220	99	63	106	50
% ki67 dia 2	10,1		3,53		75		27,53		63,63		47,17	
% ki67 mitjana	12,8		3,53		71,55		27,53		64,17		47,17	

Fig. 34. Taula recompte de nuclis totals i nuclis amb el Ki67 expressat de cada mostra + comparativa del % de Ki67 de cada línia cel·lular amb cisplatí i les plaques control

La taula següent és una taula resum del percentatge de Ki67 de cada línia cel·lular, tant de les plaques control com de les plaques amb cisplatí.

tipus cèl·lula	C2C12		A2780		Skov3	
	control	cisplatí	control	cisplatí	control	cisplatí
% ki67	12,8	3,53	71,559	27,53	64,17	47,17

Fig.35. Taula resum del % de Ki67 de cada línia cel·lular amb cisplatí i les plaques control

La gràfica següent compara la proliferació de les mostres control i de les mostres amb cisplatí de cada línia cel·lular.

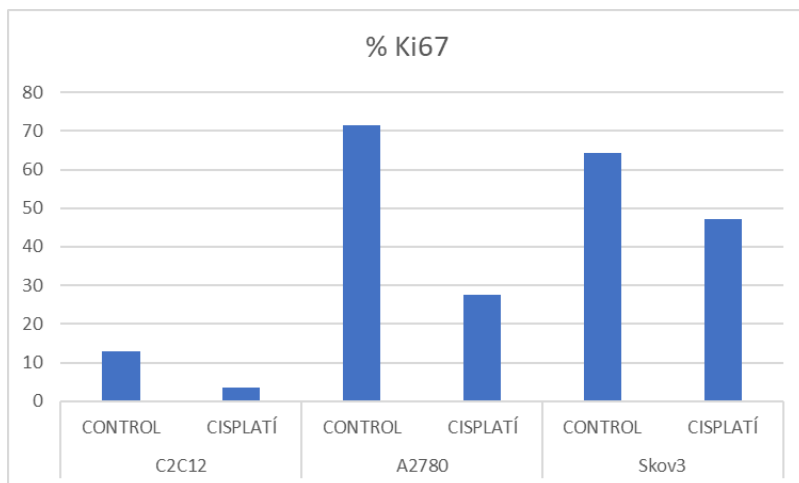


Fig. 36. Gràfica comparativa del % de Ki67 de cada línia cel·lular amb cisplatí i les plaques control

Com s'observa a la taula (figura 35), per una banda, el percentatge de cèl·lules tumorals (Skov3 i A2780) en divisió és inferior en les plaques amb cisplatí que en les plaques control. Essent molt més significatiu a la línia A2780, ja que es redueix la seva proliferació del 17% al 23% (suposaria un 60% de reducció. Per l'altra banda, el percentatge de cèl·lules no-tumorals (C2C12) també és inferior en les mostres amb cisplatí. Aquesta disminució del percentatge de cèl·lules en divisió de les plaques amb cisplatí respecte les plaques control, es veu de manera evident tant en la gràfica comparativa del percentatge de Ki67 de les mostres amb cisplatí i les control (figura 36), com en el recull de fotografies obtingudes amb el microscopi de fluorescència (figura 33).

## CONCLUSIONS

Un cop analitzats els resultats obtinguts pels procediments descrits al marc pràctic i considerant les informacions exposades al marc teòric, es pot arribar a les següents conclusions sobre les hipòtesis plantejades:

Per una banda, a la vista dels resultats obtinguts per immunofluorescència de l'indicador ki67 respecte a les cèl·lules sotmeses a un dèficit de nutrients, es pot concloure que s'ha produït una reducció de les cèl·lules tumorals en divisió, especialment en el tipus cel·lular A2780. De manera que es confirma parcialment la primera hipòtesi, que proposa que: provocant una deficiència de nutrients per a la cèl·lula, s'aconsegueix reduir la proliferació de les cèl·lules canceroses, i evitant així l'inici del cicle cel·lular i afectar mínimament les cèl·lules no tumorals, ja que, en aquestes condicions, la proliferació de les cèl·lules tumorals ha disminuït. Però, per una altra banda, la quantitat de cèl·lules no tumorals en divisió també ha minvat en una proporció semblant a les cèl·lules tumorals skov3, de manera que la segona part de la hipòtesi, en què es diu que aquest podria esdevenir un nou tractament contra el càncer d'ovari, ja que afecta mínimament les cèl·lules no-tumorals, no es confirma, ja que, si aquest tractament s'apliqués a pacients, destruiria gran part de les seves cèl·lules sanes, i això provocaria danys superiors a les millores que proporcionaria el tractament.

Pel que fa al tractament amb actinomicina D, l'anàlisi dels resultats mostra una resposta cel·lular similar al tractament de dèficit de nutrients, ja que en ambdues situacions es veuen afectades tant les cèl·lules tumorals com les no tumorals. En aquest cas, però, les cèl·lules A2780 només pateixen una reducció del 14 % en la seva proliferació mentre que les Skov3 en presenten una del 41 % i les no tumorals, del 100 %, de manera que es confirma part de la segona hipòtesi plantejada: "Evitant la síntesi de proteïnes necessàries per a la divisió de la cèl·lula amb l'aplicació d'actinomicina D, s'aconsegueix la reducció del nombre de cèl·lules tumorals en divisió, amb la mínima afectació sobre les cèl·lules no tumorals", ja que l'aplicació d'aquesta substància ha fet reduir la proliferació de les cèl·lules tumorals, però, tal com ha passat també en les cèl·lules a les quals s'ha provocat un dèficit de nutrients, la segona part de la hipòtesi no es confirma, ja que l'aplicació d'aquesta substància també ha provocat que la proliferació de les cèl·lules no tumorals disminueixi molt, de fet, per complet.

Finalment, la valoració dels resultats obtinguts respecte de les cèl·lules a les quals se'ls ha aplicat cisplatí permet afirmar que l'aplicació de cisplatí sobre cèl·lules tumorals permet reduir-ne la proliferació. Cal destacar que el medicament mostra una major afectació sobre les cèl·lules A2780, de manera que es pot establir que les cèl·lules Skov3 mostren una major resistència al cisplatí que les A2780, això podria estar lligat al fet que les Skov3 havien estat tractades anteriorment, de manera que és coherent que mostrin més resistència a determinats fàrmacs. Dit això, el fàrmac afecta també a les cèl·lules no-tumorals C2C12, de fet molt, fent reduir la seva proliferació del 13% al 4%.

Això prova que un fàrmac, que s'utilitza actualment en pacients i ha estat aprovat per la EMA, mostra una afectació sobre les cèl·lules sanes, de manera que no és un tractament ideal perquè també afecta les cèl·lules sanes de la pacient, tot i que, en traslladar el tractament a estudis en organismes més complexos, adapta l'administració i les concentracions, i això pot modificar els efectes a cèl·lules sanes.

Amb aquesta anàlisi es pot concloure que cap dels tractaments provats són tractaments ideals, ja que tots mostren efectes sobre les cèl·lules no tumorals. Cal remarcar, però, que en la línia dels resultats obtinguts del cisplatí, actualment podem estar utilitzant substàncies per al tractament que tenen el mateix efecte en cultius cel·lulars.

En tot cas, és evident la necessitat de seguir investigant per evitar tractaments amb efectes sobre les cèl·lules sanes de la pacient.

Pel que fa a la meva estada al laboratori de l'IDIBELL, m'ha permès assolir part dels meus objectius inicials: per una banda, experimentar de primera mà el que és treballar en un laboratori, experimentant amb cèl·lules en cultiu i utilitzant maquinària pròpia d'un laboratori de recerca. I, per l'altra banda, conèixer el món de la recerca biomèdica: els mètodes d'investigació i anàlisi que s'hi utilitzen. També he pogut analitzar com actua un tractament ja aprovat i utilitzat en pacients, en cèl·lules en cultiu.

La recerca feta a partir de materials publicats m'ha permès conèixer què és exactament el càncer i què el causa, entendre què diferencia una cèl·lula tumoral d'una no tumoral, i tenir informació dels tractaments existents i les noves línies d'investigació, d'entre d'altres. En definitiva, m'ha permès conèixer gran part de tot el que se sap d'aquesta malaltia actualment.

Durant la meva estada al laboratori i gràcies a tots els articles que he llegit per a dur a terme el treball, he pogut entendre en quin punt es troba la medicina i la recerca pel que fa al càncer i cap a on s'encara el futur. M'hauria agradat, però, disposar de més temps per treballar al laboratori i experimentar amb més mètodes d'investigació i resoldre les noves preguntes que m'he plantejat un cop acabat el treball: com són les següents fases en la recerca de tractaments? Quins altres mecanismes podria utilitzar per trobar uns fàrmacs realment vàlids per començar assajos clínics?

Amb tot el que he après d'aquesta malaltia i de la seva situació actual envers la medicina i la recerca, crec que, tot i que els avenços en les coneixements i els tractaments dels últims anys són fascinants, encara queda molt per saber sobre aquesta malaltia. Encara hi ha milers de preguntes que cal resoldre i, malgrat que encara no hi hem arribat, cada cop estem més a prop de poder respondre-les totes.

## BIBLIOGRAFIA I BIBLIOGRAFIA WEB

### Llibres:

- ESTELLER, Manel: *Parlem de càncer. Més de 50 respostes als principals dubtes*, Barcelona, Editorial apagea.com.
- ESTUPINYÀ, Pere: *El lladre de cervells. Tot compartint el coneixement científic de les ments més brillants*, Barcelona, Editorial La Magrana, 2011

### Revistes:

- SCIENTIFIC AMERICAN: *Investigación y ciencia: Cerco al càncer*.

### Articles:

- AECC. Impacto del cáncer en Cataluña 2020.
- INSTITUT DE RECERCA VALL D'HEBRON, DEPARTAMENT D'ONCOLOGIA TRANSLACIONAL I PEDIÀTRICA. Biomarcadors de diagnòstic, pronòstic i predicció de resposta a tractaments oncològic.
- REV CLÍN MED FAM 2016. Marcadores Tumorales.
- SEOEM. Las cifras del càncer en España 2020.
- SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL. Madrid. Factores pronósticos y predicción de respuesta en cáncer de ovario.
- SHERRI L. STEWART. Ovarian Cancer Incidence: Current and Comprehensive Statistics
- THE WORLD OVARIAN CANCER COALITION. Atlas global trends in incidence, mortality and survival. (Abril 2018)

### Pàgines web:

- AECC. El càncer.[ en línia]<<http://www.aecc.es>> [juliol 2021]
- AECC. El càncer de ovario.< [https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-ovario?utm\\_source=Google&utm\\_medium=MLT&utm\\_term=GRANTS&utm\\_content=DTXT-DTXT&utm\\_campaign=Continuidad-Performance-2019&gclid=Cj0KCQjw0oCDBhCPARIsAII3C\\_F515IVmboPcTr1TgRO-Bed96HW3H1rtvg1Mj1uVq1IPLowbAgGm5YaAgk3EALw\\_wcB](https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-ovario?utm_source=Google&utm_medium=MLT&utm_term=GRANTS&utm_content=DTXT-DTXT&utm_campaign=Continuidad-Performance-2019&gclid=Cj0KCQjw0oCDBhCPARIsAII3C_F515IVmboPcTr1TgRO-Bed96HW3H1rtvg1Mj1uVq1IPLowbAgGm5YaAgk3EALw_wcB)

- AMERICAN CANCER SOCIETY <<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario/acerca/que-es-cancer-de-ovario.html>>
- AMERICAN CANCER SOCIETY. <<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario/tratamiento/quimioterapia.html>>
- AMERICAN CANCER SOCIETY <<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/radioterapia/conceptos-basicos.html>>
- APROBY <<https://ca.approby.com/marcadors-tumorals-de-cancer-dovari/>>
- BIOPAT.<<http://www.biopat.es/1998/02/09/marcadores-de-pronostico-en-el-carcinoma-de-mama/>>
- BORGEN PROJECT. <<https://borgenproject.org/causes-of-death-in-developing-countries/>>
- CHEMOCARE. <<https://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/taxol-reg.aspx>>
- CIMA. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. <[https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/72609/Prospecto\\_72609.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/72609/Prospecto_72609.html)>
- CLÍNIC BARCELONA. <<https://www.clinicbarcelona.org/ca/asistencia/malalties/cancer/tractament>>
- GENETICA.CAT. <<https://genetica.cat/pregunta/que-es-una-mutacio-i-quins-tipus-de-mutacio-existeixen/>>
- IS Global. Institut de Salut Global Barcelona <<https://www.isglobal.org/ca/-/90-of-cancer-cases-are-caused-by-environmental-factors>>
- MAYO CLÍNIC <<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/menopause/in-depth/hormone-therapy/art-20046372>>
- NHI. Instituto Nacional del Cáncer. <<https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2018/ovario-cancer-olaparib-terapia-mantenimiento>>
- NHI. Instituto Nacional del Cáncer. <<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/gen-kras>>
- NHI. Instituto Nacional del Cáncer. <<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica/hoja-informativa-brca#qu-son-elnsprca1nbspy-elnsprca2>>

- PSICOLGIA EN CÀNCER.< <https://psicologiaencancer.com/cancer-ovari/> >
- SEAP. Sociedad Española de Anatomía Patológica. <[https://www.seap.es/posteres-xxxvi-reunion/-/asset\\_publisher/0jBK/content/daniela-maria-perez-martinez-beatriz-romero-madrid-bernardo-weil-lara-?inheritRedirect=false](https://www.seap.es/posteres-xxxvi-reunion/-/asset_publisher/0jBK/content/daniela-maria-perez-martinez-beatriz-romero-madrid-bernardo-weil-lara-?inheritRedirect=false)>
- SOEM. Sociedad Española de Oncología Médica. <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/ovario?showall=1> >
- STUDOCU. < <https://www.studocu.com/ca-es/document/universitat-de-girona/fisiopatologia/tema-10-diferenciacio-cellular-i-cancer/2400700> >
- UAB. Universitat Autònoma de Barcelona< <https://www.uab.cat/> >
- VADEMECUM. < <https://www.vademecum.es/principios-activos-docetaxel-101cd02>>
- WHO. Worlds Heakth Organisation [en línia]< <https://www.who.int>>[agost 2021]



## ANNEXOS

Annex 1: Taula de descripció estadis cancer d'ovari. Font: Tesi Doctoral: "Role of TGFB family members in physiological angiogenesis and ovarian cancer", Elisenda Alsina Sanchis. 2016.

Estadi	Descripció
<b>I</b>	El tumor es troba únicament en un dels dos ovaris o a les Trompes de Fal·lopi, encara no s'ha estès per metàstasi a cap altre teixit de l'organisme.
<b>IA</b>	El càncer es troba únicament dins d'un ovari o d'una trompa de Fal·lopi amb la superfície intacta.
<b>IB</b>	El càncer es troba a ambdós ovaris o trompes de Fal·lopi, però amb la part externa intacta.
<b>IC</b>	El càncer es troba en un o ambdós ovaris o trompes de Fal·lopi i trobem el següent: -Estadi IC1: Mentre el tumor s'està extirpant quirúrgicament, aquest es trenca. -Estadi IC2: Es trenca el tumor abans d'extirpar-lo quirúrgicament, o bé, la superfície es troba afectada. -Estadi IC3: Trobem cèl·lules cancerígenes per la zona abdominal o del perineu.
<b>II</b>	El càncer s'ha estès fins a la pelvis, de manera que també afecta a estructures com l'úter o les trompes de Fal·lopi.
<b>IIA</b>	El tumor afecta a l'úter i/o a les trompes de Fal·lopi i/o als ovaris.
<b>IIB</b>	El tumor s'ha estès a altres teixits dins la pelvis.
<b>III</b>	El tumor s'ha estès a altres teixits de fora la pelvis, afectant al peritoneu, als ganglis retro peritoneals i la superfície hepàtica.
<b>IIIA</b>	El càncer s'ha estès als ganglis limfàtics retro peritoneals, però no al peritoneu -Estadi IIIA1(i): Les metàstasis mesuren 1-10mm -Estadi IIIA1(ii): Les metàstasis mesuren 10mm o més.
<b>IIIA2</b>	El càncer s'ha estès de la pelvis fins l'abdomen.
<b>IIIB</b>	El càncer s'ha estès fins l'abdomen i mesura 0-2cm. Pot haver-se disseminat també cap als ganglis limfàtics o no.
<b>IIIC</b>	El càncer s'ha estès de la pelvis fins l'abdomen i mesura 2cm més. Pot haver-se disseminat també cap als ganglis limfàtics o no.
<b>IV</b>	El càncer s'ha estès fins al fetge o ha causat un vessament pleural -Estadi IVA: El càncer provoca un vessament pleural, és a dir, una acumulació de líquid entre les diferents capes de teixit que envolten els pulmons i la cavitat toràctica. -Estadi IVB: El càncer ja ha arribat al fetge, a la melsa o a altres òrgans situats més enllà de l'abdomen, com els ganglis limfàtics de l'engonal.

Annex 2: Efectes secundaris Pacitaxel. Font: *cima.aemps.es*



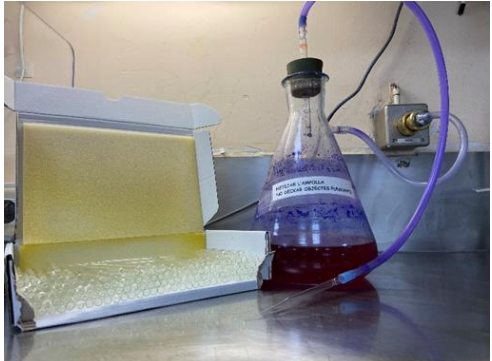
<p>Efectes secundaris més freqüents (més del 30% dels casos)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Disminució del nombre de cèl·lules sanguínies</li> <li>-Caiguda del cabell</li> <li>-Dolor muscular i articular</li> <li>-Sensació de formigueig per les mans i els peus</li> <li>-Nàusees i vòmits</li> <li>-Diarrea</li> <li>-Llagues a la boca</li> <li>-Febre</li> <li>-Calfreds</li> <li>-Dificultat per respirar</li> <li>-Etc.</li> </ul>
<p>Efectes secundaris menys freqüents(10%-29% dels casos)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Inflamació dels peus o turmells</li> <li>-Augment de la funció hepàtica sanguínia</li> <li>-Pressió arterial baixa.</li> <li>-Etc.</li> </ul>

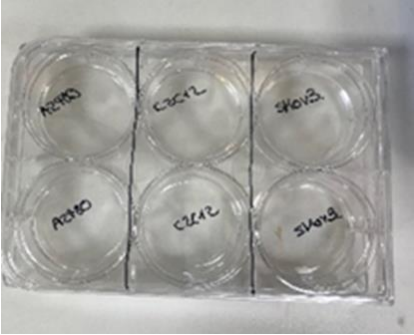



Annex 3: Efectes secundaris docetaxel. Font: *chemoscare.com*


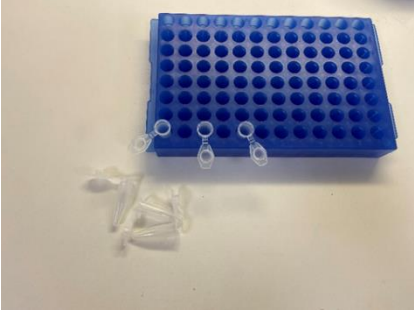
<p>Efectes secundaris més freqüents</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Risc d'infecció a causa del baix nombre de glòbuls blancs.</li> <li>-Hematomes i sagnats a causa del baix nombre de plaquetes a la sang.</li> <li>-Anèmia a causa del baix nombre de glòbuls vermells.</li> <li>-Nàusees</li> <li>-Cansament</li> <li>-Diarrea</li> <li>-Anorèxia</li> <li>-Dolor a la boca i aparició de llagues.</li> <li>-Alteracions en el gust. Tenir un sabor metàl·lic o amarg a la boca, que canviï el sabor dels aliments.</li> <li>-Formigueig a les mans i als peus.</li> <li>-Caiguda del cabell.</li> <li>-Dolor articular i muscular.</li> <li>-Acumulació de fluids.</li> <li>-Etc.</li> </ul>
<p>Efectes secundaris menys freqüents</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Dificultat per respirar.</li> <li>-Irritació dels ulls.</li> </ul>


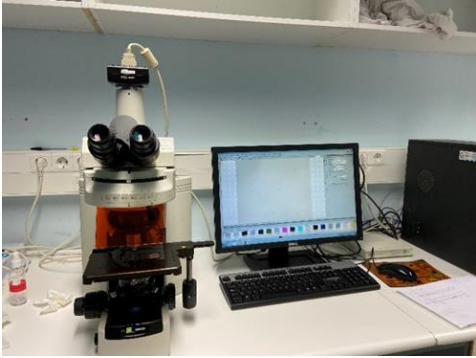
	<p>-Dolor i tumefacció de les plantes dels peus i els palmells de les mans.</p> <p>-Etc.</p>
--	--

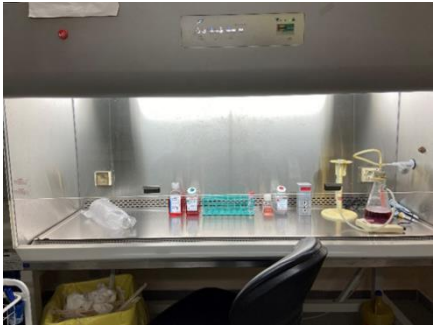
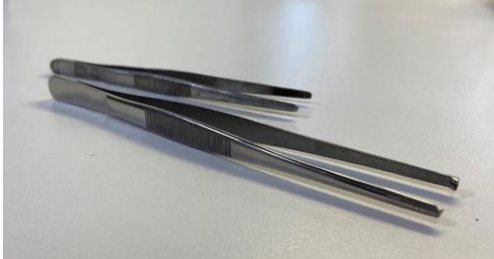

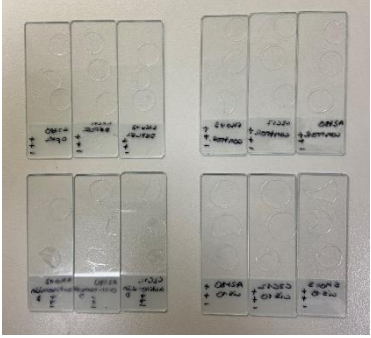
Annex 4: Descripció dels materials utilitzats.

<i>Nom</i>	<i>Descripció</i>	<i>Imatge</i>
Pipetejador	Permet l'aspiració de substàncies, per mitjà d'una pipeta	
Micropipetes	Permeten recollir i transportar substàncies	
Bomba de buit+ pipeta Pasteur	Permet absorbir substàncies	

<p>Placa de 6 pous</p>	<p>Recipient on es divideixen les cèl·lules que són utilitzades en l'experiment</p>	
<p>Pipeta serològica</p>	<p>Permet, juntament amb el pipetejador, recollir i transportar substàncies</p>	
<p>Dissolució anticòs Ki67</p>	<p>Permet marcar els nuclis on s'expressa el bio-marcador Ki67</p>	
<p>Plaques de 100 ml</p>	<p>Recipient on es cultiven els cultius inicials de cada línia cel·lular</p>	

<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM/RPMI</li> <li>• FBS (Fetal Bovim Serum)</li> <li>• Piruvat</li> <li>• L-glutamina</li> <li>• Penicil·lina i Estreptomicina</li> </ul>	<p>Material necessari per a crear un medi de cultiu cel·lular</p>	
<p>Eppendorfs (+ gradeta)</p>	<p>Recipient petit utilitzat per a guardar o transportar petites quantitats de substància.</p>	

<p>Vidres</p>	<p>Petits vidres que permeten. Juntament amb el porta objectes, observar les mostres al microscopi.</p>	
<p>Microscopi de fluorescència</p>	<p>Microscopi que utilitza fluorescència per estudiar les propietats de substàncies orgàniques o inorgàniques.</p>	

<p>Campana de flux laminar</p>	<p>Instal·lació de laboratori que permet la manipulació de substàncies de manera segura i en condicions d'esterilitat</p>	
<p>Pinces</p>	<p>Instrument que permet transportar objectes.</p>	
<p>Microscopi</p>	<p>instrument que permet augmentar la imatge de la mostra a observar, fent visible allò que no es veu a ull nu</p>	
<p>Porta objectes</p>	<p>Placa de vidre on es dipositen les mostres per tal de poder-les observar al microscopi.</p>	

<p>Congelador</p>	<p>Instal·lació que permet conservar diferents línies cel·lulars.</p>	
<p>Incubador</p>	<p>Instal·lació utilitzada per a créixer i mantenir els cultius cel·lulars.</p>	