

# Els efectes del pH en cèl·lules tumorals de glioblastoma

---

La nit estrellada



## **AGRAÏMENTS:**

Després de realitzar aquest treball durant mesos, m'agradaria donar les gràcies a la Universitat catalana i sobretot a la investigadora amb qui he col·laborat per fer possible una experiència que ha estat per mi del tot gratificant, permetent-me realitzar la part pràctica d'aquest treball, oferint-me tots els materials i temps necessari i donant-me suport quan ha estat necessari. A més a més, voldria donar les gràcies al meu tutor del Treball de Recerca, que m'ha ajudat i guiat sempre que ho he necessitat i a la meva tutora de Primer de Batxillerat per haver-me donat a conèixer el projecte FORCES i haver fet possible la realització d'aquesta gran experiència. Per últim, voldria agrair a la meva família la seva disposició per fer més plaent el procés de realització d'aquest treball i ajudar-me sempre que ho he necessitat.

# ÍNDEX

---

<b>INTRODUCCIÓ</b>	5
<b>ABSTRACT</b>	6
<b>I. EL GLIOBLASTOMA</b>	
1. El càncer	7
1.1. Definició	7
1.1.1. Les neoplàsies	7
1.2. Patogènesi	8
1.3. Etiologia	9
1.3.1. Factors endògens	9
1.3.2. Factors exògens	9
1.3.3. Gens relacionats amb el càncer	11
1.4. Classificació	11
2. El glioblastoma	13
2.1. Definició	13
2.2. Classificació	13
2.2.1. Variants histològiques del glioblastoma	14
2.2.2. Patrons histològics de glioblastoma	15
2.2.3. Variants moleculars del glioblastoma	16
2.3. Síntomes	16
2.4. Diagnòstic	17
2.5. Tractament	17
2.5.1. Tractament simptomàtic	18
2.5.2. Tractament pal·liatiu	18
2.5.2.1. Cirurgia	18
2.5.2.2. Radioteràpia	19
2.5.2.3. Quimioteràpia	19
2.5.2.4. Teràpia antiangiogènica	20
2.5.2.5. Immunoteràpia	21
2.5.2.6. Teràpia de camps elèctrics de corrent altern	22
2.5.2.7. Proteïnes terapèutiques	22
2.5.2.8. Cannabinoïdes	22
2.5.3. Recurrència	23
2.5.4. Pronòstic	23
<b>II. LES CÈL·LULES TUMORALS DE GLIOBLASTOMA</b>	
3. Les cèl·lules tumorals	24
3.1. Definició	24

3.2. Característiques	24
3.2.1. Proliferació cel·lular disregulada	24
3.2.2. Incapacitat per la diferenciació	26
3.2.3. Pèrdua de les vies apoptòtiques normals	26
3.2.4. Inestabilitat genètica	27
3.2.5. Angiogènesi	28
3.2.6. Invasió i metàstasi	28
3.2.7. Evasió del sistema immunitari	29
3.2.8. Metabolisme cel·lular alterat	31
4. Les cèl·lules mare tumorals	33
4.1. Les cèl·lules mare	33
4.1.1. Classificació	33
4.2. Les cèl·lules mare tumorals	35
4.2.1. Indicis de la seva existència	36
4.3. Implicacions clíniques	37
4.3.1. Cèl·lules mare i el tractament del glioblastoma	37

### **III. LA MESURA DE L'ACIDESA, EL CONCEPTE DEL pH**

5. El pH	39
5.1. Àcids i bases	39
5.2. Mesura del pH	40
5.3. La importància del pH en l'organisme	41

<b>PART PRÀCTICA</b>	42
----------------------	----

<b>CONCLUSIONS</b>	56
--------------------	----

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	58
---------------------	----

<b>ANNEX</b>	61
--------------	----

## INTRODUCCIÓ

---

La idea de fer aquest Treball de Recerca i d'escollir aquest tema va sorgir durant una conversa amb la meva tutora de Primer de Batxillerat. Ella em va donar a conèixer un projecte d'una Universitat catalana per a fomentar la recerca en centres de secundària. Aleshores, vaig mirar diverses de les propostes fetes pels diferents professors. D'entre totes, em va cridar molt l'atenció el tema del glioblastoma i, després d'ampliar els meus coneixements sobre aquest tipus de càncer, vaig tenir clar que volia realitzar el meu Treball de Recerca sobre això, ja que des d'un principi m'havia plantejat que tractés sobre el càncer i ho vaig trobar una gran oportunitat per descobrir com seria treballar en un laboratori fent recerca.

Així el tema central d'aquest Treball de Recerca és el glioblastoma, el tumor més comú entre els càncers del sistema nerviós central, que presenta un pronòstic realment desfavorable, arribant com a màxim als cinc anys de vida després del diagnòstic. Les cèl·lules canceroses que el formen s'acostumen a viure i proliferar en un medi àcid que elles mateixes provoquen a causa del seu propi metabolisme. L'acidesa d'un medi se sol mesurar calculant la concentració de protons ( $H^+$ ) d'aquest. Com que aquestes concentracions són molt petites i s'expressen en notació científica fem servir l'escala del pH, una escala logarítmica que va del 0 al 14 i ens indica el nivell d'acidesa d'un medi.

Així doncs, l'objectiu principal d'aquest Treball de Recerca, com bé diu el títol, és observar què passa amb les cèl·lules tumorals quan variem el pH del medi en què estan acostumades a proliferar i dividir-se sense control. Per assolir aquest objectiu, el treball es divideix en dues parts: Una part teòrica que inclou una breu explicació de què és el càncer seguit d'una explicació detallada dels conceptes bàsics d'aquest Treball de Recerca, és a dir, el glioblastoma; les cèl·lules tumorals i el pH. Després, trobem una part pràctica on s'explica fil per randa la realització d'un experiment per comprovar si la variació del pH extracel·lular altera la proliferació de les cèl·lules tumorals de glioblastoma. Al final d'aquest treball trobareu un annex on estan explicades les molècules esmentades en el text (que generalment es representen amb les seves inicials en majúscula o nombres) per facilitar-ne la comprensió.

Per la realització d'aquest treball vaig fer primer una etapa de documentació en la qual vaig recopilar informació sobre el tema estudiat sobretot a través de diversos estudis que vaig trobar per Internet. Després, un cop acabada la fase de documentació vaig organitzar tota la informació i vaig donar forma al treball. Cal dir que com que les fonts d'informació van ésser principalment estudis científics, el llenguatge d'aquest treball és científic, és a dir, es fan servir termes específics.

Per últim i durant les dues fases, vaig realitzar la part pràctica a un laboratori universitari i amb la gran ajuda d'una investigadora i doctora d'allà. Així doncs, la realització d'una part pràctica tan elaborada i amb el material de laboratori emprat no hauria estat possible si no s'haguessin donat aquestes condicions.

## ABSTRACT

---

We have all heard about cancer sometime in our lives, but what is actually cancer? It is a group of diseases basically characterized by the uncontrolled division of abnormal cells that have become immortal.

There are more than one hundred types of cancer that can be classified in different groups depending on where they originate. Glioblastoma (GBM), for instance, is the most common primary malignant brain tumor, with a really poor prognosis. Typically, the protocol for the glioblastoma treatment starts with an MRI scan followed by a biopsy to determine the nature of the disease. This process is followed by surgery to remove as much of the tumor as possible, to ensure the best outcome. For adjuvant therapy, the gold standard is radiation therapy combined with adjuvant chemotherapy.

The dismal prognosis of GBM is in part attributed to the highly heterogeneous nature of these tumors. Within the tumor mass we can find an enormous variety of abnormal cells. They share similar properties which are known as the hallmarks of cancer. Within the tumor mass there is a small group of cells that share most of the characteristics of normal stem cells: cancer stem cells (CSCs). CSCs are believed to be responsible of the origin of the disease, tumor recurrence and treatment failure; thus, a better understanding of the biology of CSCs is mandatory to develop new treatments for these patients.

In the experimental part of this project, we evaluate the potential negative effects of the variation of the extracellular pH on the proliferation of glioblastoma cancer cells and CSCs. The results indicate that, as already described in literature, cancer cells, and especially CSCs, proliferate more in an acidic environment, but when they are exposed to a more basic extracellular pH, the proliferation rate is compromised. These preliminary data indicates that a neutralization of the acidic tumor microenvironment may be a good treatment option to target CSCs for GBM patients.

# I. EL GLIOBLASTOMA

## 1. El càncer

---

### 1.1. Definició

El terme càncer, clínicament anomenat neoplàsia maligna, designa un conjunt de malalties que consisteixen en la divisió permanent de cèl·lules alterades genèticament que envaeixen i destrueixen els teixits circumdants i es disseminen per tot el cos a través dels vasos sanguinis o limfàtics, procés anomenat metàstasi. Avui dia, es coneixen més de cent tipus de càncers que afecten els humans de totes les edats, inclosos fetus i nadons.

El càncer és, actualment, una de les malalties que més vides s'enduu, produint aproximadament 9,6 milions de morts el 2018 segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS). Tot i ésser un tema a l'ordre del dia, el seu origen no és actual. Per entendre l'etimologia de la paraula ens hem de remuntar a l'època del metge grec Hipòcrates, que ja va utilitzar en aquell moment les paraules *carcinos* i *carcinoma* per referir-se als bonyis i inflamacions que presentaven alguns dels seus pacients. Aquestes paraules emprades per Hipòcrates feien referència als crancs a causa de la semblança en la forma d'aquests i els tumors, una massa sòlida amb ramificacions que s'estenen als teixits adjacents i s'assimilen a les potes de l'animal.

En condicions normals, les cèl·lules del nostre organisme creixen i es divideixen de forma ordenada i controlada, substituint així les cèl·lules mortes per altres de noves. De la mateixa manera, quan una cèl·lula normal desenvolupa mutacions o alteracions que no poden ser adequadament arreglades aquesta activa el seu propi programa de mort cel·lular, anomenat apoptosi. Les cèl·lules canceroses, però, perden tot l'ordre i el control a l'hora de dividir-se i ho fan permanentment. També, a causa de certes mutacions, les cèl·lules tumorals perden la capacitat de morir i, en dividir-se, acumulen altres errors. Aquestes cèl·lules perden les seves característiques primitives i n'assoleixen d'altres que no els hi corresponen, com la capacitat d'envair de forma progressiva i per diverses vies els diferents òrgans i teixits del cos, la capacitat de produir metàstasi.

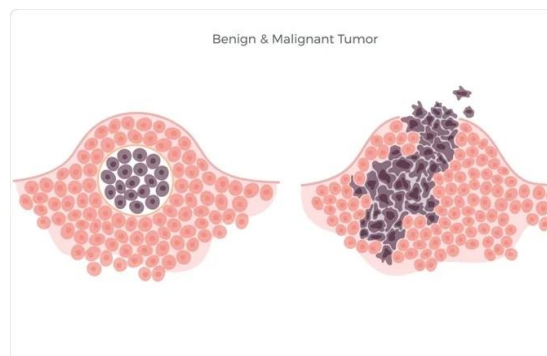
#### 1.1.1. Les neoplàsies

La major part dels càncers formen tumors, també denominats neoplàsies, que són masses sòlides i compactes que es produeixen quan un grup de cèl·lules alterades genèticament es divideixen de manera violenta i excessiva. Tot i que, en general, el terme tumor ha estat associat al càncer, existeixen dues classes de tumors: els benignes i els malignes.

Els tumors benignes són masses consistents i denses formades per un conjunt de cèl·lules que s'han dividit més del compte, provocant així un bony diferenciable de la resta del teixit. Els humans presentem diversos tumors benignes al nostre cos, com les pigues o les berrugues. Els tumors benignes no tenen la capacitat de produir metàstasi i, per tant, no provoquen la

mort del portador tret d'algunes excepcions, ja que poden resultar perillosos si estan localitzats al cervell. A més a més, aquests no solen reparèixer i les seves cèl·lules conserven la seva estructura i funció normal. En resum, no suposen un perill pel portador i aquest pot conviure amb ells tota la seva vida.

Els tumors malignes són bonys o inflamacions histolítiques<sup>1</sup> formades per cèl·lules alterades genèticament amb capacitats destructives i nocives sobre els teixits i òrgans de l'organisme. Les cèl·lules d'aquests tenen la capacitat d'envair els teixits circumdants i destruir-los. Addicionalment, són capaces de produir metastasi, destruint la membrana basal del teixit primari i introduint-se en vies sanguínies o limfàtiques per arribar a altres parts del cos i atacar òrgans sans. Els tumors malignes tenen greus repercussions per l'organisme, ja que per desenvolupar-se i disseminar-se les seves cèl·lules requereixen molts nutrients i energia, els quals roben a les cèl·lules sanes mitjançant la creació de vasos sanguinis cap a ells, procés anomenat angiogènesi. Per últim, els tumors malignes són més propensos a reparèixer un cop ja extirpats i poden provocar la mort del portador tot i ser tractats.



**Figura 1:** Representació gràfica de les diferències entre les dues classes de neoplàsies: benignes i malignes.

## 1.2. Patogènesi

La carcinogènesi és el procés pel qual les cèl·lules normals del nostre cos es transformen en canceroses, és a dir, és el procés d'aparició i formació del càncer. Aquest procés sol durar bastants anys i el podem dividir en tres fases: la fase d'iniciació tumoral, la fase de promoció i la fase de progressió.

Durant la fase d'iniciació tumoral, els agents mutàgens actuen sobre la cèl·lula i alteren el seu material genètic. No obstant això, una primera mutació no és suficient per desenvolupar càncer, però és l'inici del procés. La cèl·lula alterada ha de conservar la capacitat de dividir-se per transmetre la seva mutació en dividir-se i acabar produint un càncer. Llavors, les cèl·lules alterades comencen a reproduir-se a una velocitat superior a la normal, augmentant ràpidament el nombre de cèl·lules alterades. Les cèl·lules d'aquesta fase són denominades cèl·lules iniciades i la mutació que presenten és irreversible.

<sup>1</sup> Inflamacions que provoquen la desintegració de teixits orgànics.



Després comença la fase de promoció, durant la qual alguns agents carcinògens actuen de nou i repetidament sobre les cèl·lules iniciades. Llavors, s'augmenta la velocitat de divisió i, per tant, la possibilitat d'adquirir noves mutacions. Les cèl·lules d'aquesta fase són denominades cèl·lules promocionades. Actualment, s'han descobert molts agents carcinògens, com l'alcohol o el tabac.

Durant l'última fase, la fase de progressió, les cèl·lules promocionades pateixen noves mutacions, es tornen cada cop més anormals respecte al seu creixement i comportament i adquireixen la capacitat d'invasió, tant a nivell local com a distància. Per tant, perquè una cèl·lula normal es converteixi en cancerosa aquesta ha de patir de forma acumulativa i continuada diverses mutacions durant un llarg període de temps.

### **1.3. Etiologia**

Com la majoria de les malalties humanes, el càncer no presenta una causa concreta, sinó que és el resultat d'una sèrie de circumstàncies determinades que n'afavoreixen la seva aparició. No obstant això, trobem una sèrie de factors i substàncies que augmenten la possibilitat que aquest aparegui, els factors de risc. Podem dividir els factors de risc en dos grups: els factors endògens i els exògens.

#### **1.3.1. Factors endògens**

Els factors endògens són deguts a agents interns i, per tant, no són evitables o modificables. En distingim dos: l'herència i l'envelliment. Aproximadament entre un 5 i un 10% dels càncers són hereditaris, és a dir, els canvis en l'ADN passen als descendents, que els presenten en totes les cèl·lules del seu cos i, per això, presenten més possibilitats de patir la malaltia. Per altra banda, la major part dels càncers es produeixen en persones majors de seixanta-cinc anys, a causa de l'envelliment cel·lular, ja que les mutacions i els errors genètics es van acumulant i cada cop l'organisme presenta menys sistemes viables per combatre les cèl·lules malignes.

#### **1.3.2. Factors exògens**

Els factors exògens són generalment evitables i engloben els aspectes relacionats amb l'ambient i els agents carcinògens que afecten el nostre organisme provocant-hi alteracions que, amb el temps, poden donar lloc a càncer. Aquests són els culpables d'entre un 75 i un 80% de tots els casos diagnosticats. Els factors exògens es poden classificar segons si són de caràcter físic, químic o biològic. A continuació es tractaran breument els més importants i comuns:

- El tabac, tant el seu consum habitual com l'exposició continuada al fum d'aquest augmenten el risc de patir càncer. Les substàncies tòxiques del tabac, com el benzopirè, són agents carcinògens que, en entrar en contacte amb l'organisme, promouen la formació de tumors. El tabac és el responsable de més del 90% dels càncers de pulmó i d'un 30% de tots els tumors.

- L'estil de vida i la dieta és el segon factor de risc més rellevant perquè és el responsable del 35% dels càncers actuals. Les persones amb sobrepès tenen un risc major a desenvolupar càncer perquè el teixit adipós té una alta activitat metabòlica, produint i incrementant la circulació d'estrògens i insulina, hormones que poden estimular el creixement de cèl·lules anormals. Com que la manca d'activitat i exercici pot donar lloc a l'obesitat, es considera un factor de risc. A més a més, una dieta rica en greixos, colesterol, productes d'origen animal, aliments salats o fumats... i mancança de productes d'origen vegetal pot estimular el desenvolupament de diversos càncers, com el d'estómac o el de pàncrees.
- El consum habitual i abús d'alcohol augmenta el risc de patir càncer. L'alcohol potencia l'efecte del tabac i danya sobretot el fetge, l'encarregat d'eliminar-lo. Per aquest motiu, l'alcohol és la principal causa dels càncers hepàtics.
- Els problemes de salut i determinats fàrmacs poden estimular l'aparició de càncer. Determinades malalties o un sistema immunitari deficient pot promoure l'aparició del càncer, ja que aquest no és eficaçment atacat i destruït. Per altra banda, certs fàrmacs com les hormones o els immunosupressors poden estimular l'aparició de cèl·lules anormals.
- L'exposició a productes químics usats en la producció de materials i la indústria de nous compostos pot provocar les mutacions precursors al càncer. Entre aquests productes químics hi ha l'amiant, la gasolina...
- L'exposició prolongada i en hores de màxima intensitat a les radiacions ultraviolades que conté la llum solar poden provocar càncer de pell i melanomes. És per aquest motiu que és necessari l'ús de crema solar.
- Les radiacions ionitzants, com les radiacions  $\gamma$  o els raigs X, són perjudicials per a l'organisme perquè danyen l'estructura de l'ADN i destrueixen els mecanismes de reparació d'aquest, donant lloc a mutacions irreversibles que poden provocar càncer. Tot i això, aquestes radiacions es fan servir en l'àmbit de la salut. Trobem dues classes de radiacions ionitzants: les radiacions de baixa taxa de dosi i les d'alta taxa de dosi. Les radiacions de baixa taxa de dosi són usades per realitzar radiografies simples i comporten un risc baix de produir càncer. En canvi, les radiacions d'alta taxa de dosi són emprades per la radioteràpia i comporten un risc lleugerament alt de provocar càncer.
- Els humans estem constantment exposats a la contaminació ambiental del nostre entorn. A causa de la contaminació ambiental estem en contacte constant amb determinats agents carcinògens, com els fums contaminants alliberats en les reaccions de combustió o el quitrà. L'exposició prolongada a aquests agents afavoreixen el

desenvolupament i la polimerització de cèl·lules anormals donant lloc a càncers, freqüentment en les vies respiratòries.

- Alguns virus i bacteris poden provocar l'aparició d'un càncer, ja que s'adhereixen al material genètic de les cèl·lules i hi produeixen mutacions. Els virus que poden estimular l'aparició d'aquesta malaltia s'anomenen virus oncogènics i, entre ells, en destaquem quatre: el virus del papil·loma humà, el de l'hepatitis B o C, el virus humà de les cèl·lules T i el VIH. El virus del papil·loma humà pot provocar càncers en els genitals d'ambdós sexes, tot i que amb major freqüència en els femenins. L'hepatitis B o C produeixen la inflamació del fetge i, amb els anys, poden donar lloc a càncer de fetge. El virus humà de les cèl·lules T<sup>2</sup> que augmenta el risc de desenvolupar leucèmia o un limfoma i, per últim, el VIH que augmenta el risc de patir limfoma i un tipus poc comú de sarcoma. Per altra banda, en el cas dels bacteris, el de major risc és l'*Helicobàcter pylori* que pot provocar càncer d'estómac i algunes classes de limfoma.

### 1.3.3. Gens relacionats amb el càncer

La majoria de les mutacions provocades per errors a l'hora de la replicació de l'ADN o pels agents esmentats anteriorment afecten uns gens determinats que controlen el cicle vital de la cèl·lula: els protooncogens i els gens supressors de tumors. Aquests gens s'encarreguen de regular els processos de creixement i divisió cel·lular, funció que perden en adquirir una mutació.

Els protooncogens contribueixen a la progressió tumoral quan aquests pateixen mutacions que els activen de forma permanent, convertint-los en oncogens. Aquesta classe de mutació té un efecte dominant, és a dir, només és necessari la mutació d'un al·lel per augmentar l'activitat d'aquests. Els protooncogens solen codificar receptors de factors de creixement, que en estar mutats estan activats permanentment, o factors de creixement, que en estar mutats són produïts en excés per una transcripció descontrolada.

Els gens supressors de tumors intervenen en el procés tumoral si pateixen mutacions que els inactiven. Aquest tipus de mutació té un efecte recessiu i inactiva els gens destinats a controlar el cicle vital de la cèl·lula, fet que dona lloc a una divisió descontrolada. Tot i això, mutacions en les dues classes de gens són necessàries per desenvolupar un càncer. A més, són necessàries mutacions que afavoreixin l'activitat invasiva de les cèl·lules, com mutacions en els gens que codifiquen les proteïnes del citoesquelet.

## 1.4. Classificació

Els càncers es poden classificar en diversos grups tenint en compte el seu teixit d'origen, que és al que aquest s'assembla més. Seguint aquest patró per classificar els càncers en trobem sis classes.

---

<sup>2</sup> Són un tipus de cèl·lules del sistema immunitari conegudes popularment com a anticossos.

- Els carcinomes són una classe de càncers que s'originen a partir de les cèl·lules del teixit epitelial. Aquest és el tipus més comú de càncer, representant més del 80% dels casos totals, a causa de la gran quantitat de teixit epitelial que hi ha al cos. Els carcinomes es divideixen en dues subclasses: els adenocarcinomes i els carcinomes de cèl·lules escamoses. Els adenocarcinomes, com per exemple el càncer de mama, afecten les mucoses dels òrgans amb funció secretora i els carcinomes de cèl·lules escamoses, com per exemple el càncer de pell, s'originen en l'epiteli escamós.
- Els sarcomes són una classe de càncers que s'originen en els ossos, els músculs i els teixits tous com els cartílags o el teixit adipós. Un exemple d'aquesta classe de càncers és l'osteosarcoma, que s'origina en els ossos.
- Les leucèmies són una classe de càncers que afecten la medul·la òssia, lloc on es produeixen les cèl·lules sanguínies. Quan la medul·la òssia és cancerosa produeix glòbuls blancs immadurs en excés que no realitzen les seves funcions i afavoreixen l'aparició d'infeccions. Un exemple de leucèmia és la leucèmia limfàtica crònica (CLL), la més comuna en adults.
- Els limfomes són una classe de càncers que afecten el sistema limfàtic. A diferència de les leucèmies aquests són càncers sòlids. Els limfomes poden afectar els ganglis limfàtics en llocs específics com l'estómac o els intestins. N'és un exemple el limfoma T perifèric, que s'origina en les cèl·lules T.
- Els tumors de cèl·lules germinals són una classe de càncers derivats de les cèl·lules germinals. Aquests solen aparèixer a l'interior de les gònades, és a dir, els ovaris o els testicles i, per tant, n'és un exemple el seminoma, originat als testicles.
- Els gliomes són una classe de càncers originats al cervell o a la medul·la espinal. Aquests es denominen gliomes perquè apareixen a partir de les cèl·lules gials, les quals donen suport i protecció a les neurones. N'és un exemple el glioblastoma multiforme, el glioma més comú en adults.

## 2. El glioblastoma

---

### 2.1. Definició

El glioblastoma (GB), també denominat glioma de grau IV, és el tumor més comú en adults entre les neoplàsies malignes del sistema nerviós central (SNC). El glioblastoma és el càncer amb major malignitat que afecta les cèl·lules de la glia. Aquesta malaltia havia estat denominada glioblastoma multiforme, a causa de l'aspecte histològic heterogeni de la lesió, però actualment rep el nom de glioblastoma. El GB s'associa amb un pronòstic desfavorable, ja que només un 22% dels pacients entre 20 i 44 anys arriben a superar els cinc anys de vida segons l'American Cancer Society.

El GB és més comú en els homes, tot i que es desconeix el motiu. La majoria dels casos no solen estar relacionats amb cap mena de predisposició genètica ni amb agents nocius com el tabac o els camps electromagnètics entre altres. Malgrat tot, recentment s'ha descobert l'evidència d'una possible causa viral, el SV40. També sembla que existeix una petita relació entre la radiació ionitzant i el glioblastoma. Per últim, s'han associat alguns trastorns genètics, com la síndrome de Turcot o l'esclerosi tuberosa, amb una major incidència de gliomes.

En la seva forma més clàssica, està constituït per una població heterogènia d'astròcits<sup>3</sup> neoplàstics amb atípia nuclear<sup>4</sup> de gran varietat morfològica i amb una alta activitat mitòtica. En bastants ocasions es poden observar cèl·lules gegants i plurinucleades. Tot i això, el que defineix histològicament al glioblastoma és l'augment de vasos sanguinis al voltant de la neoplàsia, procés anomenat angiogènesi i la presència notable de necrosis, la mort d'una o diverses cèl·lules de qualsevol part del cos a causa d'un agent nociu que ha provocat una lesió irreparable.

### 2.2. Classificació

La major part dels casos de glioblastoma s'originen *de novo*, és a dir, apareixen sense la necessitat d'una neoplàsia anterior. Aquests són els denominats glioblastomes primaris (pGB). No obstant això, existeix un petit percentatge de casos en què el glioblastoma es desenvolupa a partir d'un astrocitoma de grau menor, que són els denominats glioblastomes secundaris o progressius (sGB). Els glioblastomes secundaris solen aparèixer en pacients més joves i presentar una major supervivència.

Recentment, s'han trobat diferències a escala molecular entre aquests dos tipus de glioblastomes, fet que, junt amb les similituds histològiques entre les dues classes, ha comportat un canvi en la classificació dels glioblastomes. Així doncs, com que la major part dels casos de pGB corresponen al glioblastoma sense mutació d'IDH (GB-IDHwt) i la major part de casos de sGB corresponen al glioblastoma amb mutació d'IDH (GB-IDHm) aquests

---

<sup>3</sup> La classe més comuna de les cèl·lules de la glia.

<sup>4</sup> Forma anormal del nucli d'una cèl·lula.

dos han canviat de nomenclatura. Així mateix, l'OMS denomina glioblastoma NOS a aquells casos en què una avaluació completa de les IDH no és possible.

Aquestes dues classes de glioblastoma presenten una sèrie de característiques diferents. Els GB-IDHm, com ja hem mencionat abans, apareixen en pacients més joves, afecten preferentment els lòbuls frontals del cervell i presenten un millor pronòstic al de la resta de glioblastomes. Morfològicament els dos tipus de glioblastoma són quasi indistingibles, tot i que, els GB-IDHm solen tenir menys necrosi i presentar en major freqüència elements d'aspecte oligodendroglial<sup>5</sup>. Altres diferències entre aquestes dues classes de glioblastoma queden resumides en la següent taula.

	<b>Glioblastoma sense mutació d'IDH</b>	<b>Glioblastoma amb mutació d'IDH</b>
Sinònim	Glioblastoma primari	Glioblastoma secundari
Lesió precursora	No identificable	Astrocitoma difós Astrocitoma anaplàstic
Proporció de casos de GB	90%	10%
Edat mitjana al diagnòstic	62 anys	44 anys
Relació home/dona	1,42/1	1,05/1
Supervivència (mitjana)	15 mesos	31 mesos
Localització	Supratentorial	Preferentment frontal
Necrosi	Extensa	Limitada
pTERTm	72%	26%
TP53m	27%	81%
ATRXm	Excepcionalment	71%
EGFRa	35%	Excepcionalment
PTENm	24%	Excepcionalment

**Figura 2:** Principals diferències entre els casos de GB-IDHwt i els de GB-IDHm (pTERTm: mutació del promotor de TERT; TP53m: mutació de TP53; ATRXm: mutació d'ATRX; EGFRa: amplificació d'EGFR i PTENm: mutació de PTEN. Totes aquestes molècules esmentades són proteïnes que actuen en el nostre cos amb diverses funcions).

### 2.2.1. Variants histològiques del glioblastoma

L'actual classificació de l'OMS reconeix, a més a més de les tres classes de glioblastoma prèviament esmentades, tres variants morfològiques que s'engloben dintre dels GB-IDHwt: el glioblastoma de cèl·lules gegants, el gliosarcoma i el glioblastoma epitelioides.

<sup>5</sup> L'oligodendroglioma és un glioma que afecta els oligodendrocïts, les cèl·lules que formen la capa de mielina que envolta i protegeix els teixits neuronals.

- El gliosarcoma (GS) representa un 2% del total de casos de glioblastoma i es pot originar *de novo* o després d'un tractament amb radioteràpia. Aquesta variant es caracteritza per tenir un component glial i un sarcomatós i per la seva tendència a la metastasi, envaint sobretot els pulmons i el fetge. El gliosarcoma és un tumor ben delimitat que s'estableix, generalment, als lòbuls temporals. Aquest es caracteritza per la mutació de PTEN i el TP53.
- El glioblastoma de cèl·lules gegants (GBCG) representa un percentatge menor a l'1% del total de casos de glioblastoma. Aquesta variant presenta cèl·lules anormals, plurinucleades i gegants que assoleixen els 400 µm i arriben a tenir més de 20 nuclis. També és una neoplàsia ben delimitada que s'assenta, generalment, als lòbuls temporals o parietals i que afecta una població més jove. El glioblastoma de cèl·lules gegants es caracteritza per una alta proporció de TP53 i PTEN mutant i una baixa freqüència de l'ampliació d'EGFR.
- El glioblastoma epitelioides (GBE) és una variant estranya de glioblastoma introduïda per primera vegada en la recent actualització de la classificació dels gliomes de l'OMS el 2016. Aquest es defineix com un astrocitoma de grau IV amb activitat mitòtica, necrosi i angiogènesi, caracteritzat per una població tumoral d'aspecte uniforme de cèl·lules epitelioides amb una membrana ben definida, escassos processos cel·lulars i un nucli situat al lateral. Aquesta variant sol afectar a una població jove i mostra una alta freqüència de disseminació. El glioblastoma epitelioides presenta un pitjor pronòstic que la resta de variants de glioblastoma, l'ampliació d'EGFR i la pèrdua de PTEN.

### 2.2.2. Patrons histològics de glioblastoma

Els patrons histològics de glioblastoma, a diferència de les seves variants histològiques, no presenten un tractament o una presentació clínica diferenciada, sinó que constitueixen simples variacions en l'aspecte histològic de la neoplàsia. En aquest apartat en destacarem dos: el glioblastoma de cèl·lules petites i el glioblastoma amb component oligodendroglial.

- El glioblastoma de cèl·lules petites (GBCP) és un patró histològic que s'observa en aproximadament un 10% del total de casos de glioblastoma. La característica principal d'aquest és la seva citologia d'aparença benigna. Les cèl·lules tumorals d'aquest patró són monòtones i presenten un nucli amb forma ovalada. La designació de glioblastoma de cèl·lules petites s'aplica a aquells casos en què aquest patró s'observa de manera predominant. La seva similitud amb l'oligodendrogloma de grau III és la importància principal d'aquest patró, tot i que és més agressiu.
- El glioblastoma amb component oligodendroglial (GBCO) és una entitat controvertida perquè presenta un tumor mixt de grau IV on normalment s'identifica un component de glioblastoma i àrees d'aspecte oligodendroglial. Aquest fet ha portat discrepàncies entre els científics a l'hora de classificar-lo com un patró histològic de



glioblastoma. Aquest té, generalment, un pronòstic més favorable que el glioblastoma clàssic.

### **2.2.3. Variants moleculars del glioblastoma**

Després d'analitzar els perfils d'expressió genètica en diversos glioblastomes s'han pogut establir quatre variants moleculars del glioblastoma: proneural, neural, mesenquimàtic i clàssic.

- El glioblastoma proneural es caracteritza per presentar l'amplificació o mutació activadora de PDGF i mutacions en les IDH i en la p53. Aquesta variant apareix en pacients més joves i presenta un millor pronòstic.
- El glioblastoma neural no presenta cap mutació característica o predominant, de fet, s'ha considerat aquesta variant com una mescla d'altres classes de glioblastoma i teixit cerebral normal. Finalment, però s'ha acabat considerat el glioblastoma neural com una altra variant.
- El glioblastoma clàssic presenta les alteracions típiques del glioblastoma com l'amplificació o mutació activadora d'EGFR, la pèrdua del cromosoma 10 i la manca de les altres alteracions (ex, TP53, IDH...).
- El glioblastoma mesenquimàtic és, junt amb el glioblastoma clàssic, el que més s'assimila als astròcits i es caracteritza per la pèrdua de NF1 i mutacions en la p53 i en PTEN.

Emperò, a la pràctica la majoria dels casos de glioblastoma solen estar compostos per diverses d'aquestes variants, estant així compostos per diverses subpoblacions molecularment diferents.

## **2.3. Síntomes**

Els símptomes que presenta el glioblastoma són els d'una massa expansiva a l'interior del crani que augmenta la pressió intracranial. És comú, per tant, patir mal de cap, nàusees, vòmits, convulsions, diplopia<sup>6</sup>, afàsia<sup>7</sup>, hemiparèsia<sup>8</sup> i atacs epilèptics. A més a més, el glioblastoma pot comportar una pèrdua de memòria a causa de la implicació del lòbul temporal o frontal.

Destaquem també símptomes neurològics no específics com la manca de consciència i els canvis sobtats de personalitat o estat d'ànim. El tumor pot començar a produir símptomes ràpidament, però a vegades és una malaltia asimptomàtica fins que arriba a una mida molt gran.

<sup>6</sup> És el terme que s'aplica a la visió doble, la percepció de dues imatges d'un únic objecte.

<sup>7</sup> És una afectació en la capacitat de produir i/o entendre el llenguatge.

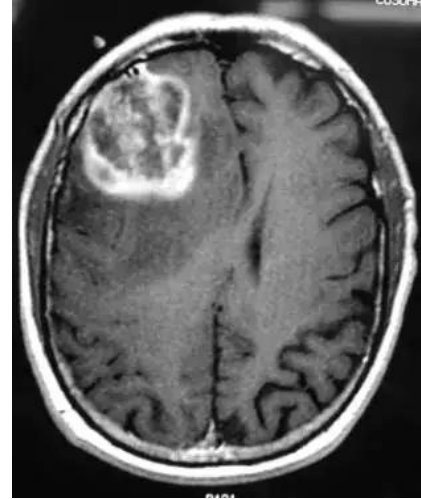
<sup>8</sup> És la pèrdua incompleta de la mobilitat d'una meitat del tronc i les extremitats del mateix costat.



## 2.4. Diagnòstic

Amb l'objectiu de diagnosticar quasi qualsevol tumor cerebral es realitzen normalment tres proves mèdiques. En el cas del glioblastoma, per començar, es realitza un examen neurològic en el qual el metge pregunta al pacient els signes i símptomes que està patint. Addicionalment, aquest pot avaluar la vista, l'oïda, l'equilibri, la coordinació, la força o els reflexos, ja que els problemes en un o més d'aquests punts poden suposar pistes sobre la part del cervell afectada per la neoplàsia.

Després, la realització de proves de diagnòstic per imatges poden ajudar al metge a determinar la ubicació i la mida del tumor. Per aquesta prova mèdica se solen utilitzar ressonàncies magnètiques (MR), en les que els glioblastomes sovint apareixen com lesions en forma d'anell essent similar a altres lesions com un abscess. Per aquest motiu, és necessària la realització d'una biòpsia pel diagnòstic definitiu d'un cas de glioblastoma. Alhora, la mostra de teixit obtinguda és estudiada al laboratori per determinar el tipus de cèl·lules que formen el tumor i el seu nivell d'agressivitat.



**Figura 3:** Cervell d'un pacient amb glioblastoma vist en una imatge de ressonància magnètica

La realització de proves a les cèl·lules tumorals extretes durant el diagnòstic pot donar informació al metge sobre les mutacions que el tumor ha adquirit. Aquesta informació pot ajudar a orientar el tractament per obtenir el millor pronòstic possible.

## 2.5. Tractament

El glioblastoma presenta, com ja s'ha esmentat anteriorment, un pronòstic pobre arribant a una supervivència màxima de cinc anys amb tractament. Aquest pronòstic està fortament relacionat amb una sèrie de circumstàncies que dificulten el tractament d'aquest tumor cerebral.

En primer lloc, el glioblastoma és una neoplàsia localitzada al cervell, una zona susceptible a danys causats per les teràpies convencionals i que consta d'una capacitat mínima per arreglar-los. A més a més, en el glioblastoma trobem una petita proporció de cèl·lules mare tumoral que són resistents a les teràpies convencionals, ja que són capaces d'arreglar els danys causats per aquestes abans que esdevinguin irreversibles i desactivin la cèl·lula. Per últim, molts dels fàrmacs emprats contra el càncer no poden travessar la barrera hematoencefàlica<sup>9</sup> i, per tant, no poden arribar al tumor ni atacar-lo.

<sup>9</sup> És un sistema cel·lular especialitzat present al cervell que gestiona l'entrada i sortida de substàncies.

En el tractament de qualsevol tumor cerebral, inclòs el glioblastoma, diferenciem entre dues classes de tractament dependent de l'objectiu que aquest tingui: tractament pal·liatiu i simptomàtic.

### **2.5.1. Tractament simptomàtic**

El tractament simptomàtic té com a objectiu alleujar els símptomes del pacient i millorar les seves funcions neurològiques en el cas dels tumors cerebrals. Els agents de suport més emprats en el tractament simptomàtic del glioblastoma són els fàrmacs antiepilèptics i els glucocorticoides.

Els fàrmacs antiepilèptics són administrats avui dia després d'un atac epilèptic. La fenitoïna és el fàrmac més utilitzat, tot i que, en pacients tractats amb radioteràpia pot provocar reaccions cutànies greus com la síndrome de Stevens-Johnson. Altres fàrmacs recents com el levetiracetam estan reemplaçant els més tradicionals, ja que presenten menys efectes secundaris de tipus cognitiu i no alteren el metabolisme dels agents quimioterapèutics.

Els glucocorticoides poden reduir un possible edema peritumoral<sup>10</sup>, reduint així l'efecte de la massa tumoral i la pressió intracranial. En el cas del glioblastoma el més comú és la dexametasona. L'ús d'aquests, però ha d'ésser reduït lentament com més aviat possible, ja que l'ús prolongat de glucocorticoides s'associa amb hipertensió, diabetis, augment de pes, insomni o osteoporosis entre altres. La seva administració sol reduir-se un cop començat el tractament pal·liatiu.

### **2.5.2. Tractament pal·liatiu**

El tractament pal·liatiu té com a objectiu millorar la qualitat de vida del pacient tot tenint en compte l'impacte emocional de la malaltia i els símptomes físics que aquesta pugui patir i aconseguir el màxim temps de supervivència. El tractament pal·liatiu del glioblastoma sol incloure quimioteràpia, radioteràpia i cirurgia, ja que la màxima resecció possible del tumor s'assoleix amb cirurgia seguida d'una combinació de radioteràpia i quimioteràpia.

#### **2.5.2.1. Cirurgia**

En el tractament del glioblastoma, la cirurgia consisteix en l'extracció de la quantitat més gran de tumor possible mitjançant una intervenció quirúrgica. La cirurgia és la primera etapa del tractament contra el glioblastoma i un bon resultat en aquesta, eliminant més d'un 98% del tumor, està associat amb una major supervivència i qualitat de vida. A més a més, sol eliminar els símptomes provocats per la pressió intracranial, reduir la necessitat d'esteroides i eliminar una part de la malaltia abans de començar la teràpia secundària.

Les possibilitats de realitzar una extirpació total augmenta si la cirurgia està guiada per un tint fluorescent conegut com a àcid 5-aminolevulínic. Així i tot, les cèl·lules tumorals de

---

<sup>10</sup> Acumulació de líquid produït per la ruptura o la difusió de la barrera hematoencefàlica.

glioblastoma s'infiltra àmpliament a través del cervell, de manera que, en la major part dels casos, es desenvolupen tumors recurrents a prop de la zona original o en zones més distants, produint lesions satèl·lit en el cervell. La realització de tractaments després de la cirurgia busca endarrerir el màxim l'aparició d'aquests tumors recurrents.

En general, està exclosa una segona intervenció quirúrgica pels pacients amb un índex de Karnofsky (KPS) inferior a 60 o aquells pacients que no són vàlids per tractaments posteriors a la cirurgia. L'índex de Karnofsky és la forma típica de mesurar la capacitat dels pacients de executar tasques rutinàries i oscil·la del 0 al 100.

### **2.5.2.2. Radioteràpia**

La radioteràpia és l'aplicació mèdica de radiació ionitzant en humans i animals per tractar malalties oncogèniques com el glioblastoma. És un tractament local que s'aplica en una zona del cos a través de màquines o preparats radioactius que busca produir un dany irreversible en l'ADN de les cèl·lules tumorals per destruir-les bloquejant el cicle cel·lular.

Un assaig clínic realitzat el 1970 va demostrar que les persones tractades amb radiació sobreviuen el doble que les que no varen ser tractades amb ella i, per tant, la radioteràpia ha esdevingut el tractament estàndard per a les persones amb glioblastoma. De fet, la radioteràpia és el tractament més comú després d'una intervenció quirúrgica. Alguns assajos clínics duts a terme pel BTSG (Brain Tumor Study Group) han demostrat que la radioteràpia postoperatoria administrada amb un fraccionament convencional, dosis superiors a 50 Gy<sup>11</sup>, proporciona una millora supervivència que qualsevol altre tractament postoperatori. A més, ha estat demostrat que pels pacients superiors a seixanta anys un fraccionament amb dosis de 40 Gy té la mateixa efectivitat que un amb dosis superiors i, des de llavors, aquest ha esdevingut el tractament estàndard. Tot i això, els casos de curació completa per radioteràpia són molt poc freqüents.

Una classe de radioteràpia no invasiva, la teràpia de captura del neutró de bor, ha estat estudiada com un possible tractament pel glioblastoma. Aquesta teràpia es basa en la introducció de l'isòtop no radioactiu bor-10 a la zona tumoral seguit de l'exposició a energia neutrònica. Llavors, els neutrons són captats per l'isòtop, fet que dona lloc a partícules alfa d'alta energia que maten les cèl·lules tumorals que n'hagin assumit la suficient quantitat. Aquesta tècnica encara ha d'ésser perfeccionada i s'han de dur a terme més assajos clínics per establir-ne el procediment a l'hora de tractar pacients amb glioblastoma, tot i que mostra bons resultats.

### **2.5.2.3. Quimioteràpia**

La quimioteràpia és una tècnica terapèutica que consisteix en l'administració de substàncies químiques pel tractament de diverses malalties, essent associada normalment a la teràpia contra el càncer. Els fàrmacs antineoplàstics administrats durant la quimioteràpia

---

<sup>11</sup> Gray o en la seva forma abreviada Gy és la unitat emprada per mesurar la radiació absorbida per massa de teixit en la radioteràpia.

s'encarreguen de matar o impedir el creixement de les cèl·lules tumorals. La combinació d'aquesta amb radioteràpia sol ser beneficiosa en els càncers en què la radioteràpia pot prolongar la supervivència del pacient.

Es varen dur a terme diversos assajos clínics per comprovar els beneficis de la quimioteràpia en el tractament contra el glioblastoma. No obstant això, no va ser fins a la realització d'un gran assaig clínic, amb 575 pacients, que no es va demostrar que l'addició de quimioteràpia amb temozolomida (TMZ) al tractament estàndard era beneficiosa pels pacients i augmentava la supervivència a una mitjana de 14,6 mesos. La temozolomida és un agent alquilant capaç de travessar la barrera hematoencefàlica de manera efectiva que danya l'ADN de les cèl·lules tumorals i sensibilitza aquestes a la radiació. Des de llavors, la radioteràpia combinada amb temozolomida és el tractament estàndard postoperatori.

S'han observat uns millors resultats en combinar el tractament esmentat anteriorment, a base de radioteràpia i temozolomida, amb la metilació del promotor de MGMT. Aquest, a l'estar metilat, s'inactiva i impedeix la biosíntesi de la metil guanina metil transferasa (MGMT), una proteïna que repara els danys produïts en l'ADN per agents alquilants com la temozolomida. La metilació del promotor de MGMT no és una característica modificable, tot i que, el coneixement de la presència d'aquest pot ajudar a elaborar un pronòstic més realista.

#### **2.5.2.4. Teràpia antiangiogènica**

La teràpia antiangiogènica és una teràpia emprada contra el càncer que es basa en la inhibició del creixement dels vasos sanguinis o limfàtics mitjançant agents antiangiogènics. El bevacizumab, venut sota el nom d'Avastin, és un agent antiangiogènic que actua contra el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), localitzat en les parets dels vasos sanguinis i limfàtics del nostre organisme. El bevacizumab s'uneix a aquest factor de creixement, bloquejant la seva funció i, per tant, inhibeix el creixement dels vasos sanguinis i, en la teràpia contra el càncer, l'angiogènesi.

Des de 2009 el bevacizumab està aprovat com un tractament per glioblastomes recurrents i s'ha trobat que la seva administració evita un ràpid deteriorament neurològic. Ha estat demostrat que l'ús d'aquest fàrmac comporta una millora en supervivència pels pacients amb glioblastomes recurrents, assolint una mitjana de vida de 9,2 mesos. Emperò, aquest sol anar acompanyat d'un altre tractament com quimioteràpia a base de temozolomida o radioteràpia sempre que el tumor respongui.

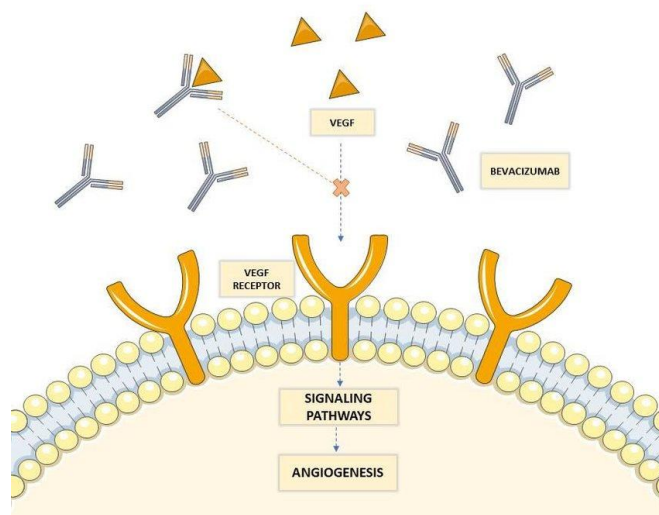


Figura 4: Esquema que mostra el mecanisme d'acció del bevacizumab.

### 2.5.2.5. Immunoteràpia

La teràpia basada en l'administració de substàncies que estimulen el sistema immunitari de l'organisme amb l'objectiu de lluitar contra diferents malalties s'anomena immunoteràpia. En el cas del càncer, la immunoteràpia actua sobre el sistema immunitari, generalment les cèl·lules T, perquè siguin aquestes les que ataquin les cèl·lules tumorals. Per aquest motiu, els efectes d'aquest tractament no són tan ràpids com els d'altres i el tumor pot continuar expandint-se un cop començat per acabar desapareixent anys o mesos després.

Recentment, s'han dut a terme diversos assajos clínics que proposaven la combinació de dos anticossos monoclonals<sup>12</sup>, l'ipilimumab i el nivolumab, com un possible tractament contra el glioblastoma. L'ipilimumab és un anticòs monoclonal que bloqueja el senyal de CTLA-4, que actua com un regulador negatiu de l'activació dels limfòcits T col·laboradors i que, per tant, estimula la polimerització i activació dels limfòcits que ataquen el tumor. Un cop els limfòcits infiltrin tumors aquests expressen alts nivells de PD-1 que, en entrar en contacte amb els lligands 1 de mort programada (PD-L1) de les cèl·lules tumorals provoca la inactivació dels limfòcits. El nivolumab és un fàrmac que s'uneix als PD-L1, permetent així l'actuació dels limfòcits i l'eliminació de les cèl·lules tumorals. Aquest tractament ha mostrat resultats positius, augmentant l'esperança de vida i mantenint un nivell estable de toxicitat i podria esdevenir un mètode clau per tractar el glioblastoma, tot i que encara s'han de realitzar més estudis.

La transferència adoptiva de cèl·lules T és una teràpia de tipus immunitària que s'ha estudiat com un possible tractament del glioblastoma. Aquesta es basa a obtenir limfòcits T del pacient, alterar-los genèticament per augmentar-ne l'activitat antitumoral, produir-los en gran quantitat al laboratori i tornar-los a injectar al pacient. Aquesta teràpia ha mostrat bons resultats en diversos estudis, però encara està en fase experimental.

<sup>12</sup> Anticossos produïts per un sol clon de limfòcit B, anticossos idèntics procedents de la mateixa cèl·lula mare.

A part de les dues teràpies de tipus immunitari esmentades prèviament, altres estudis estan investigant mètodes diferents per tractar el glioblastoma com, per exemple, les vacunes peptídiques, que solen contenir antígens específics enfocats en l'EGFR, o els virus oncolítics com el DNX-2401 que busquen generar una resposta immunitària.

#### **2.5.2.6. Teràpia de camps elèctrics de corrent altern**

Al contrari que les teràpies esmentades anteriorment, la teràpia de camps elèctrics de corrent altern està essent estudiada per tractar únicament tumors cerebrals, entre ells el glioblastoma. Aquesta tècnica es basa en l'aplicació d'un camp elèctric amb una determinada longitud d'ona que destrueix totes les cèl·lules en procés de divisió. D'aquesta manera, aquesta teràpia no danya les cèl·lules cerebrals perquè aquestes no es divideixen.

Els recents resultats publicats mostren que aquest tractament és tan efectiu com la quimioteràpia en els pacients amb glioblastomes recurrents. Actualment s'està estudiant l'eficàcia d'aquesta teràpia en els glioblastomes no recurrents en comparació amb el tractament estàndard de radioteràpia combinada amb temozolomida.

#### **2.5.2.7. Proteïnes terapèutiques**

Les proteïnes terapèutiques han estat rarament utilitzades, però el seu ús ha augmentat exponencialment des de la introducció de la primera, la insulina humana, en els vuitanta. En l'actualitat, aquestes proteïnes juguen un paper important en tots els camps de la medicina, inclosa l'oncologia. Durant el 2010 es va iniciar un estudi que, a hores d'ara, es troba en fase II de desenvolupament i compara l'eficàcia de la radioteràpia combinada amb l'APG101, una proteïna terapèutica emprada en el tractament del glioblastoma administrada per via intravenosa i la radioteràpia sola.

L'APG101 és una proteïna usada en el tractament de malalties malignes i resultant de la fusió del receptor de mort Fas<sup>13</sup>, també anomenat CD95, amb la regió Fc<sup>14</sup> d'un anticòs. Aquesta proteïna té la capacitat d'inhibir el creixement invasiu del tumor, ja que impedeix la unió del lligand CD95 (CD95L) amb el seu receptor afí. Fins ara els estudis han mostrat resultats positius i no s'han descobert efectes secundaris greus.

#### **2.5.2.8. Cannabinoïdes**

Els derivats del cànnabis són eficaços en l'oncologia, per una banda, per combatre les nàusees i els vòmits induïts per la quimioteràpia i, per altra banda, per estimular la gana i disminuir la sensació d'angoixa o el dolor en si mateix. A més a més, està demostrada la seva capacitat d'inhibir el creixement i l'angiogènesi en els gliomes malignes.

---

<sup>13</sup> Proteïna de membrana que activa el procés de mort cel·lular programada (apoptosi) a l'unir-se amb el seu lligand específic.

<sup>14</sup> Regió d'un anticòs que no té la capacitat d'unir-se a cap antigen.



El més interessant d'aquestes substàncies és la capacitat que tenen d'atacar les cèl·lules mare tumorals del glioblastoma, amb el resultat, per una banda, d'induir la seva diferenciació en cèl·lules més madures i, per tant, més tractables i, per altra banda, d'inhibir la progressió del tumor.

### 2.5.3. Recurrència

Tot i l'èxit inicial limitat del tractament contra el glioblastoma, pràcticament tots els pacients reincideixen i apareixen glioblastomes recurrents. En aquesta situació, si les condicions són adequades, es pot tractar al pacient amb diferents tècniques com la radiocirurgia<sup>15</sup> o la quimioteràpia amb un agent quimioterapèutic diferent de la temozolomida, a la qual el pacient ja no respon.

Entre els agents quimioterapèutics més utilitzats trobem la procarbazona i el carboplatí entre altres. Els últims estudis clínics han mostrat una significativa activitat antitumoral amb l'ús de mitoxantrona, un agent antineoplàstic, i la combinació d'hidroxiurea amb mesilat d'imatinib, un fàrmac per tractar el càncer.

Diversos estudis i protocols estan essent avaluats per la comunitat científica, tot i que, l'objectiu principal és la identificació d'un algoritme per poder assignar la teràpia més adequada en cada cas.

### 2.5.4. Pronòstic

La mitjana de supervivència des del moment del diagnòstic, sense tractament, és de tres mesos, tot i que amb aquest pot assolir els dos anys. L'edat avançada és un factor de pitjor pronòstic. La mort sol ser causada per un edema cerebral o per la progressió de la pressió intracranial. Una bona puntuació inicial en l'escala de Karnofsky i la metilació del promotor MGMT estan associats a un millor pronòstic, però aquesta característica és intrínseca de l'ADN del pacient i, en l'actualitat, no és modificable.

Així doncs, el pronòstic pels pacients de glioblastoma és sempre pobre a causa de la dificultat d'eliminar totes les cèl·lules tumorals d'aquest i la seva resistència als tractaments estàndard. No hi ha dubte de què és tot un repte assolir l'objectiu d'arribar a curar aquesta malaltia i eliminar totes les cèl·lules tumorals del cervell. Amb els anys s'han realitzat diversos progressos i els estudis que estan essent realitzats actualment ens permeten tenir una visió esperançadora sobre el futur tractament d'aquest càncer.

---

<sup>15</sup> Radioteràpia focalitzada que obté resultats similars a la cirurgia, però que no implica una intervenció quirúrgica.

## II. LES CÈL·LULES TUMORALS DE GLIOBLASTOMA

### 3. Les cèl·lules tumorals

---

#### 3.1. Definició

Les cèl·lules tumorals, també denominades cèl·lules canceroses o neoplàstiques, són cèl·lules que, entre altres alteracions, han perdut pràcticament la capacitat de morir i es divideixen sense descans. Aquestes formen tumors sòlids o inunden la sang amb cèl·lules anormals. Al contrari que les cèl·lules normals, les tumorals es divideixen sense que una nova cèl·lula sigui requerida i, mentrestant, van acumulant mutacions que augmenten la seva malignitat. Altrament, aquestes cèl·lules són capaces d'escampar-se per l'organisme i produir metàstasi.

Les cèl·lules canceroses solen presentar un nucli gran, de forma irregular, amb nuclèols més prominents situats propers a l'embolcall nuclear i un citoplasma escàs de color intens o, al contrari, pàl·lid. A més a més, aquestes presenten normalment una forma irregular i variable que es torna més anormal com menys diferenciades estan les cèl·lules neoplàstiques.

#### 3.2. Característiques

Les cèl·lules tumorals destaquem per presentar una sèrie de característiques que les diferencien de les cèl·lules normals del nostre cos. Aquestes característiques són les següents: una proliferació cel·lular desregulada, la incapacitat per la diferenciació, la pèrdua de les vies apoptòtiques normals, la inestabilitat genètica, l'angiogènesi, la invasió i metàstasi, l'evasió del sistema immunitari i un metabolisme cel·lular alterat.

##### 3.2.1. Proliferació cel·lular desregulada

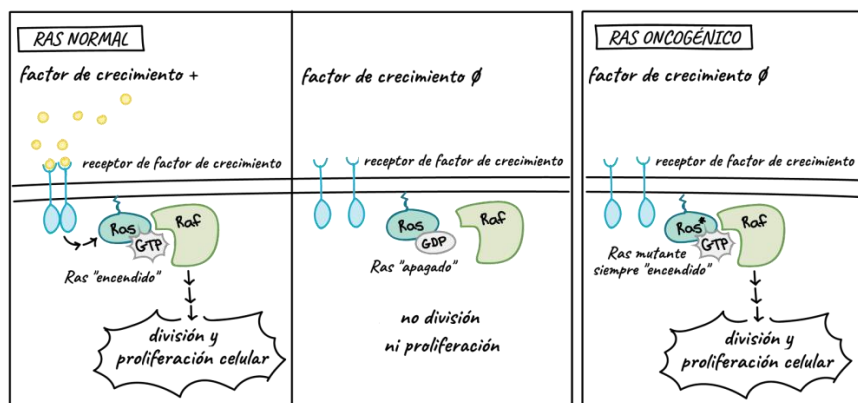
El cicle cel·lular consisteix en una sèrie de rutes de senyalització bioquímica que porten les cèl·lules al creixement i la divisió cel·lular. Tot aquest procés implica la divisió de l'ADN i la seva posterior separació durant la mitosi i la citocinesi, la divisió del citoplasma. En ésser aquest un procés tan complex consta de diversos punts de control que assegurin el bon funcionament del procés i controlen la proliferació, el desenvolupament i el manteniment de les cèl·lules d'un organisme. En canvi, en les cèl·lules tumorals, la mitosi pot produir-se contínuament evadint els punts de control del cicle cel·lular.

Les diferents classes de càncers involucren mutacions diferents que provoquen, entre altres, el descontrol del cicle cel·lular. Emperò, en general aquestes mutacions solen afectar dos tipus de reguladors del cicle cel·lular: els protooncogens, oncògens si ens referim a la seva versió mutada, i els gens supressors de tumors.

Per una banda, els protooncogens són els reguladors positius del cicle cel·lular que, en les cèl·lules tumorals, solen presentar-se més actius, essent així oncògens. D'aquesta manera, un receptor de factors de creixement pot estar actiu permanentment i enviar senyals sense la

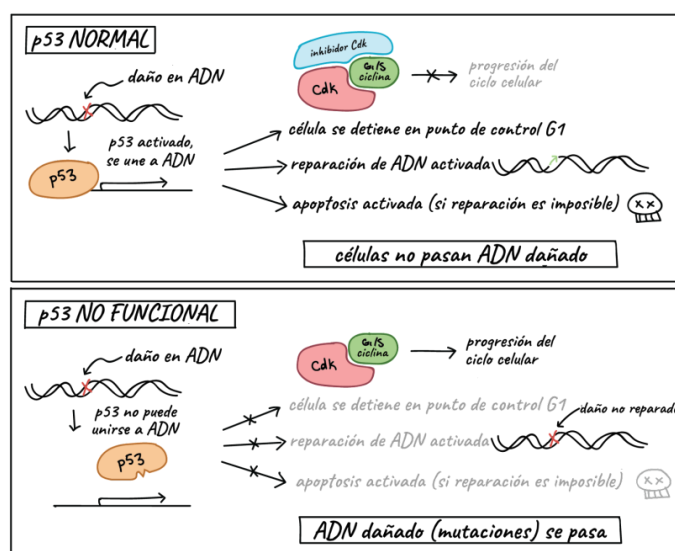


necessitat dels factors de creixement corresponents. A més a més, una ciclina<sup>16</sup> pot expressar-se en nivells anormalment elevats. Les mutacions que provoquen aquests canvis poden implicar un canvi en la seqüència d'aminoàcids i, per tant, en l'estructura de la proteïna o l'amplificació d'un gen creant-ne més còpies. Així doncs, aquesta classe de mutacions presenten un efecte dominant, és a dir, només és necessària l'alteració d'un al·lel per augmentar la seva activitat.



**Figura 5:** Esquema que representa el funcionament del receptor del factor de creixement Ras, que depèn del factor de creixement corresponent i el funcionament de la seva versió oncogènica permanentment activa.

Per altra banda, els gens supressors de tumors són els reguladors negatius del cicle cel·lular que, en les cèl·lules tumorals, solen presentar-se menys actius o completament inactius. Els gens supressors de tumor eviten la formació de neoplàsies malignes quan funcionen correctament, ja que paren la progressió del cicle cel·lular com a resposta a danys en el material genètic de la cèl·lula. Les alteracions en aquests gens posseeixen un efecte recessiu, és a dir, són necessàries mutacions en ambdós al·lells per afectar el seu funcionament.



**Figura 6:** Esquema que mostra el procediment pel qual la p53 no alterada s'assegura que els danys en l'ADN d'una cèl·lula no passen a la seva descendència i com la p53 mutada, al no poder unir-se a l'ADN, és incapaç d'arreglar el dany genètic o d'induir la mort de la cèl·lula.

<sup>16</sup> Família de proteïnes encarregades de regular el cicle cel·lular.

Totes les cèl·lules del nostre organisme poden passar al llarg de la seva vida per un nombre determinat de divisions cel·lulars, conegut com el límit d'Hayflick. Un cop les cèl·lules arriben a aquest límit s'indueix la mort cel·lular programada. En canvi, en el cas de les cèl·lules canceroses, la presència de l'enzim telomerasa, que sintetitza nous telòmers<sup>17</sup>, possibilita que aquestes puguin dur a terme un major nombre de divisions cel·lulars.

Per últim, les cèl·lules normals aturen el seu creixement un cop entren en contacte amb altres cèl·lules en un procés conegut com a inhibició per contacte. Es desconeix com funciona aquest fenomen, però s'ha descobert que les cèl·lules tumorals perden aquesta propietat i, per tant, són capaces d'aglomerar-se i formar tumors.

### **3.2.2. Incapacitat per la diferenciació**

La diferenciació cel·lular és el procés pel qual les cèl·lules canvien i s'especialitzen per a realitzar una determinada funció. Durant aquest procés, canvia l'expressió genètica de la cèl·lula, les seves funcions i la seva morfologia.

En el cas de les cèl·lules tumorals, aquest procés es veu alterat i com més gran és l'anaplàsia<sup>18</sup> major és la malignitat del càncer. Recentment, s'ha descobert la possible implicació dels oncògens en el procés de diferenciació cel·lular i els seus possibles efectes negatius, tot inhibint aquest procés.

### **3.2.3. Pèrdua de les vies apoptòtiques normals**

L'apoptosi és la mort cel·lular programada promoguda per estímuls que poden aparèixer a causa de danys en l'ADN o per formar els dits dels embrions, entre altres. Durant aquest procés, la cèl·lula experimenta diversos canvis morfològics com, per exemple, la condensació de la cromatina fins al seu trencament; la fragmentació del nucli; el trencament del citoesquelet i la pèrdua de la integritat de la membrana plasmàtica, que forma vesícules que posteriorment són ingerides per altres cèl·lules.

Durant l'apoptosi, la cèl·lula també experimenta una sèrie de canvis bioquímics. En primer lloc, la fosfatidilserina, un fosfolípid de membrana, passa a la capa externa de la membrana plasmàtica. Després, es produeix l'activació de les caspases, uns enzims que trenquen o inactiven proteïnes. Per últim, s'activen les DNAases, uns enzims que degraden l'ADN de la cèl·lula.

En els humans es coneixen dues vies d'inducció de l'apoptosi: l'extrínseca i la intrínseca o mitocondrial. La via extrínseca comença quan els receptors de mort s'uneixen a les proteïnes transmembrana dels limfòcits T. Els receptors de mort més freqüents són el receptor de TNF tipus 1 (TNFR1) i la proteïna Fas. Aquests s'uneixen a altres proteïnes i formen el complex de

---

<sup>17</sup> Extrems de l'ADN dels cromosomes que, amb les divisions cel·lulars, es van escurçant fins a arribar a una mida crítica, moment en el qual s'indueix la mort cel·lular.

<sup>18</sup> Manca de diferenciació cel·lular.

senyalització que indueix la mort (DISC de l'anglès *death inducing signaling complex*). Llavors el DISC activa les caspases 8 que, a la vegada, n'activen d'altres i comença el procés d'apoptosi.

La via mitocondrial, en canvi, comença a l'interior de la cèl·lula, concretament en el mitocondri, a causa d'un estímul intern que pot ser dany genètic o hipòxia, entre altres. Aquesta via està quasi íntegrament regulada per les proteïnes de la família Bcl-2. Les proteïnes pertanyents a aquesta família es poden classificar en dos grups: les proapoptòtiques, que promouen l'alliberament de substàncies que indueixen l'apoptosi al citosol, i les antiapoptòtiques, que eviten l'alliberament d'aquestes. L'equilibri entre les proteïnes d'aquests dos grups és el que determina el començament de l'apoptosi. Si l'apoptosi es duu a terme, el mitocondri allibera citocrom c al citosol, que activa les caspases 3 i altres substàncies activen les caspases 9.

L'apoptosi juga un paper molt important en la carcinogènesi, ja que les cèl·lules neoplàstiques adquireixen la capacitat d'evadir-la. Generalment, els mecanismes mitjançant els quals s'evita l'apoptosi són els següents: un balanç alterat entre les proteïnes proapoptòtiques i antiapoptòtiques; una sobreexpressió dels IAPs, és a dir, proteïnes inhibidores de l'apoptosi; una funció reduïda de les caspases o el mal funcionament dels receptors o senyals de mort.

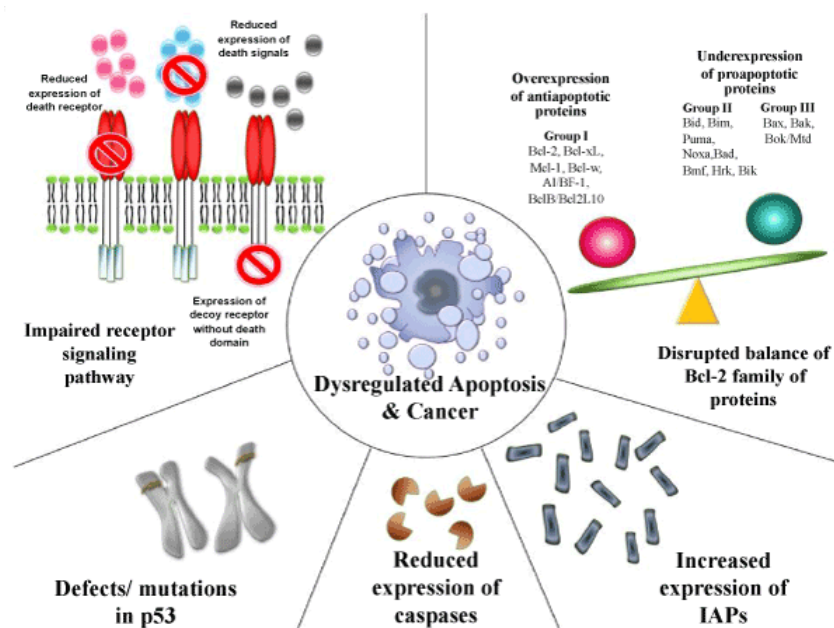


Figura 7: Esquema que mostra les possibles vies per les quals l'apoptosi es pot evadir.

### 3.2.4. Inestabilitat genètica

La combinació de dades epidemiològiques i biologia molecular han demostrat que són necessàries múltiples mutacions en la carcinogènesi. A més a més, arribat aquest punt, les cèl·lules canceroses adquireixen la capacitat de dividir-se contínuament i, per tant, acumulen més mutacions a causa d'una mitosi anormal que evadeix els punts de control.

En les cèl·lules tumorals, es genera una inestabilitat genòmica o genètica a causa d'aquest gran nombre de mutacions que es pot traduir en afectacions al cariotip normal de les cèl·lules. Aquestes afectacions solen ser translocacions, inversions, delecions<sup>19</sup>, duplicacions, intercalacions de substàncies externes en l'ADN i pèrdues de fragments o cromosomes sencers, entre altres. Les mutacions que afecten les vies de reparació de l'ADN afavoreixen aquesta inestabilitat genòmica i l'heterogeneïtat tumoral. L'heterogeneïtat tumoral fa referència al fet que dins d'un mateix tumor poden haver-hi diferents perfils moleculars o genètics i, per tant, les cèl·lules tumorals poden presentar fenotips diferents.

La inestabilitat genòmica i sobretot l'heterogeneïtat tumoral dificulten el tractament contra certs càncers com les leucèmies, alguns carcinomes o el mieloma múltiple. A més a més, aquest fet té el potencial de guiar la creació d'estratègies de tractament més acurades que incorporin el coneixement d'aquesta heterogeneïtat tumoral per augmentar-ne l'eficàcia.

### **3.2.5. Angiogènesi**

L'angiogènesi és la formació de vasos sanguinis a partir de vasos sanguinis ja existents. Aquesta està estretament lligada amb el creixement tumoral, tot i que també posseeix aplicacions positives com, per exemple, a l'hora de reparar teixits greument ferits. Emperò, en el cas del creixement tumoral, arriba un moment en què en el tumor es genera una situació d'hipòxia i una manca de nutrients que impedeixen la progressió tumoral. Llavors, les cèl·lules tumorals indueixen l'angiogènesi per obtenir recursos i seguir amb la progressió tumoral.

Les cèl·lules tumorals alliberen factors de creixement que promouen la creació de nous vasos sanguinis, entre els quals el més estudiat és el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), que s'uneix al seu receptor específic, VEGF-R. Llavors, quan els diferents factors de creixement alliberats s'uneixen als seus receptors corresponents, les cèl·lules epitelials alliberen proteïnes que fan més permeable el vas sanguini, trencant la seva membrana primària. Aleshores, es forma un nou vas sanguini amb noves cèl·lules epitelials i el tumor posa en marxa de nou el seu creixement.

L'angiogènesi és també una de les circumstàncies necessàries perquè es produeixi la metastasi d'un càncer, ja que es creen vasos sanguinis que s'aproximen al tumor i llavors es permet el traspàs de les cèl·lules tumorals a l'interior d'aquests i, per tant, arreu del cos.

### **3.2.6. Invasió i metastasi**

Les cèl·lules tumorals perden la seva capacitat d'adhesió a causa de certes mutacions que alteren la seva morfologia i les seves proteïnes de membrana. Entre aquestes, la més estudiada és la pèrdua de la proteïna de membrana E-cadherina. A més d'això, s'ha descobert recentment que la manca d'adhesió repercuteix negativament en la diferenciació de les cèl·lules tumorals. A causa d'aquesta menor adhesió les cèl·lules són capaces d'abandonar un

---

<sup>19</sup> Mutació genètica en la qual una part d'una seqüència de nucleòtids s'ha perdut.

teixit, envair la matriu extracel·lular i, després, migrar a altres parts del cos a través dels vasos sanguinis o limfàtics.

La metastasi és la invasió de les cèl·lules tumorals de teixits llunyans a través dels vasos limfàtics o sanguinis. Aquesta es duu a terme a través d'una sèrie complexa de passos anomenats la cascada metastàtica, que s'inicien amb la ruptura dels límits naturals del teixit mitjançant la invasió de la matriu extracel·lular, gràcies a l'alliberació d'enzims, per part de les cèl·lules canceroses, que la degraden. A la invasió, la segueix la intravasació, fenomen pel qual la cèl·lula tumoral s'introdueix en un vas sanguini o limfàtic i comença la seva circulació per l'organisme. Llavors, processos inflamatoris i de restricció d'elasticitat provoquen la detenció de la cèl·lula. En aquest moment, la cèl·lula tumoral surt del vas sanguini i s'endinsa en el seu nou teixit durant l'extravasació.

Recentment, l'any 2004, investigadors de l'Institut Tecnològic de Massachusetts (MIT) varen descobrir un gen que pot tenir un paper important en la metastasi. Els primers estudis realitzats van donar suport a aquesta hipòtesi, demostrant que l'activació d'aquest gen promovia la metastasi. El gen en qüestió està situat en el cromosoma 7 i és l'encarregat de sintetitzar la proteïna *twist*, que s'encarrega de la diferenciació en el procés embrionari i que, després, roman inactiva. Els experts afirmen que hi ha més proteïnes amb les propietats d'aquesta que també podrien estar involucrades en la metastasi dels càncers.

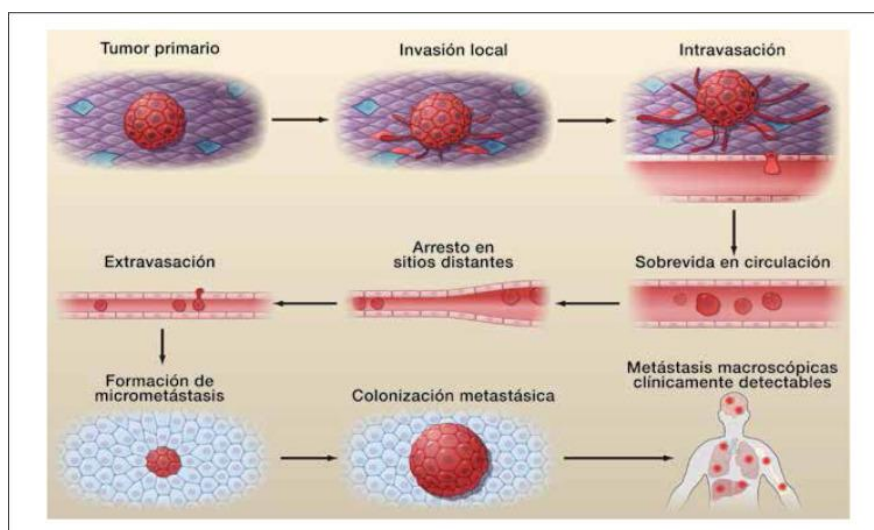


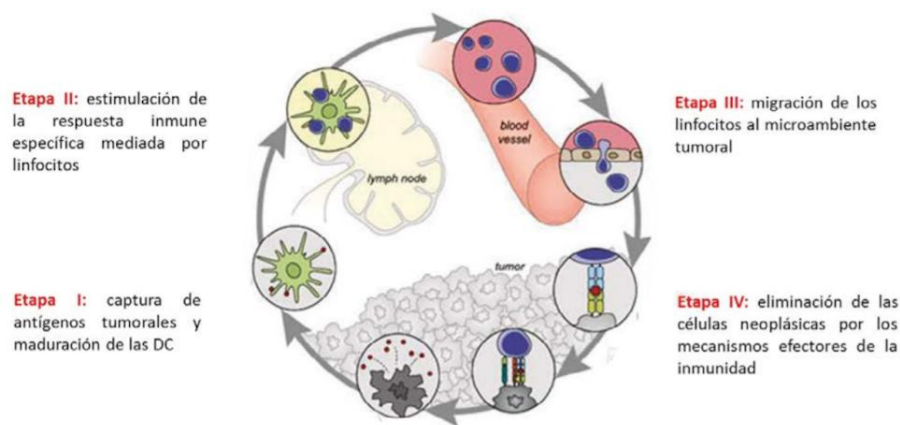
Figura 8: Esquema que mostra els passos de la cadena metastàtica.

### 3.2.7. Evasió del sistema immunitari

La immunovigilància és la capacitat del sistema immunitari (SI) de detectar i eliminar cèl·lules en qualsevol de les múltiples fases del procés de carcinogènesi. Aquest fenomen ha estat comprovat en diversos estudis amb animals i pacients amb trastorns en el sistema immunitari i s'ha demostrat que la presència de cèl·lules immunitàries amb activitat citotòxica en el microambient tumoral comporta un millor pronòstic pel pacient.



La immunovigilància és un procés que es duu a terme en quatre etapes principals. Aquesta comença amb la detecció d'antígens específics o associats al tumor per part de les cèl·lules presentadores d'antígens<sup>20</sup>. En aquesta etapa les cèl·lules dendrítiques (DC, de l'anglès *dendritic cells*) són protagonistes a causa de la seva localització i el seu perfil d'expressió de receptors d'antígens. Finalment, la primera etapa finalitza amb la maduració de les cèl·lules dendrítiques i la seva migració als ganglis limfàtics més propers al tumor. Llavors, la segona etapa implica l'activació de la resposta antitumoral, fonamentalment, promoguda pels limfòcits T col·laboradors CD4+ i els citotòxics CD8+. Aquests reben senyals d'activació, polimerització i diferenciació funcional en interactuar amb les cèl·lules dendrítiques. La migració efectiva d'aquests limfòcits i la seva extravasació per interactuar contra les cèl·lules tumorals constitueix la tercera etapa. Per últim, la quarta i última etapa consisteix en l'eliminació de les cèl·lules tumorals gràcies als limfòcits. En aquesta s'indueix la mort de les cèl·lules canceroses implicant l'alliberació d'antígens tumorals en un context inflamatori, fet que promou l'estimulació de les cèl·lules dendrítiques, reiniciant aquest procés.



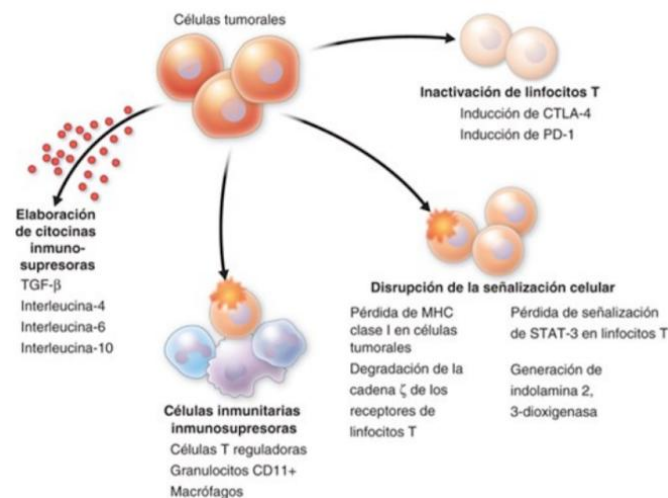
**Figura 9:** Esquema de les diferents etapes de la immunovigilància.

Tot i això, la inestabilitat genètica que caracteritza el procés de carcinogènesi afavoreix l'aparició de clons cel·lulars resistents a l'activitat del sistema immunitari. Aquesta resistència al control del sistema immunitari involucra diversos mecanismes que limiten l'efectivitat d'una o diverses fases del cicle de relació entre els tumors i el sistema immunitari.

Entre aquests mecanismes d'evadir el sistema immunitari trobem una regulació a la baixa de les proteïnes de superfície cel·lular que participen en el reconeixement immunitari, incloent-hi les proteïnes del complex d'histocompatibilitat principal (MHC) que participen en la presentació d'antígens als limfòcits, i els antígens específics del tumor. A més a més, les cèl·lules tumorals expressen proteïnes de superfície cel·lular que inhibeixen el procés immunitari, com la CTLA-4 i el PD-1, i segreguen proteïnes i altres molècules immunosupressores, com el factor de creixement transformant beta (TGF- $\beta$ ) i les

<sup>20</sup> Cèl·lules del sistema immunitari capaces d'activar els limfòcits T en presentar molècules d'antígens unides a macromolècules de la seva membrana

interleucines 4, 6 i 10. Per últim, les cèl·lules canceroses són capaces d'activar cèl·lules immunitàries immunosupressores, com els limfòcits T reguladors o els macròfags.



**Figura 10:** Mecanismes pels quals les cèl·lules tumorals són capaces d'evadir el sistema immunitari.

El coneixement d'aquests mecanismes a fons és clau per la realització de noves teràpies que els contrarestin i permetin l'actuació del sistema immunitari. Aquests descobriments podrien donar lloc a noves teràpies que oferissin uns pronòstics més favorables per càncers que, actualment, en posseeixen de molt desfavorables com, per exemple, el glioblastoma que és el tema d'aquest treball.

### 3.2.8. Metabolisme cel·lular alterat

Les cèl·lules obtenen energia per poder realitzar les seves funcions vitals mitjançant l'oxidació de compostos orgànics. Aquest procés s'anomena respiració aeròbica, ja que necessita oxigen per dur-se a terme. Els sucres són els principals elements emprats per les cèl·lules per obtenir energia, destacant entre ells la glucosa. En la degradació total per respiració de la glucosa fins a l'aprofitament complet de tota l'energia alliberada, es distingeixen dues fases: la glicòlisi i la respiració. En la respiració es diferencien dos processos: el cicle de Krebs i el transport d'electrons en la cadena respiratòria.

La glicòlisi consisteix en una cascada bioquímica en la qual intervenen diversos enzims i el coenzim  $\text{NAD}^+$ . En aquesta, a partir d'una molècula de glucosa, se n'obtenen dues de piruvat. Aquest procés consta de dues fases: la primera, la fase de consum d'energia, en la que es gasten dues molècules d'ATP i la segona, la fase de producció d'energia, en la que es produeixen quatre molècules d'ATP, deixant així un benefici de dues molècules d'ATP. En la fase de producció d'energia també obtenim dos NADH i dos protons ( $\text{H}^+$ ).

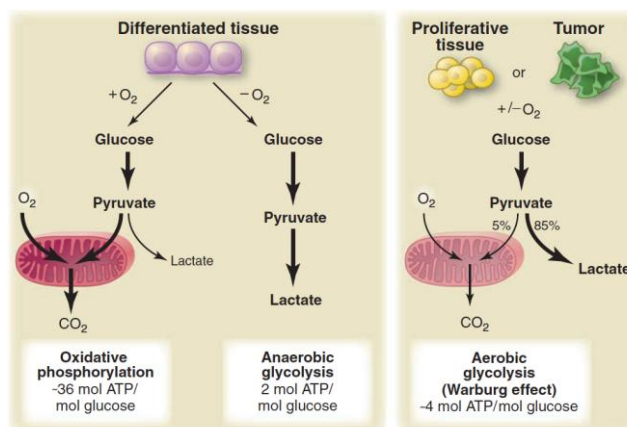
Llavors, en la cèl·lula eucariota, el piruvat entra al mitocondri a través d'una proteïna transportadora i, allà, el conjunt d'enzims i coenzims denominat piruvat-deshidrogenasa el transformen en l'acetil-CoA. En aquest moment comença el cicle de Krebs, que és una via metabòlica descoberta per Hans Krebs el 1930 en què es succeeixen vuit compostos diferents.

Perquè el cicle de Krebs es dugi a terme necessita els coenzims oxidats  $\text{NAD}^+$  i  $\text{FAD}$ , que transforma en els coenzims reduïts. Per a la degradació total de la glucosa són necessàries dues voltes del cicle de Krebs, ja que aquesta s'havia escindit en dues molècules de piruvat. El benefici energètic total d'aquesta fase és pobre, essent així dues molècules d'ATP, perquè la resta de l'energia s'utilitza per produir 3  $\text{NADH}$  i 1  $\text{FADH}_2$ , que en la cadena respiratòria alliberen molta energia.

Per últim, es duu a terme la cadena transportadora d'electrons a les crestes mitocondrials. Aquesta està constituïda per una sèrie de molècules, bàsicament proteïques, que accepten els electrons de l'anterior. Això dona lloc a l'oxidació dels coenzims reduïts en les fases anteriors i el bombeig de protons a l'exterior gràcies a l'energia produïda durant el procés. Aleshores, els protons tornen a entrar per gradient gràcies a uns canals que presenten uns enzims també englobats en la membrana, anomenats ATP-sintetases. Aquests enzims produeixen molècules d'ATP en un procés anomenat fosforilació oxidativa. Finalment, l'organisme aconsegueix un benefici de 38 molècules d'ATP.

En les cèl·lules tumorals se solen augmentar els nivells de glucosa a causa d'una transcripció major dels transportadors de glucosa 1 i 3 (GLUT1 i GLUT3) promoguda per la situació d'hipòxia en el microambient tumoral. Això, juntament amb altres mutacions genètiques i la deterioració dels mitocondris, afavoreix un canvi en el metabolisme de les cèl·lules tumorals que dona lloc a l'efecte Warburg. L'efecte Warburg és l'obtenció d'energia de les cèl·lules tumorals mitjançant altes tasses de glicòlisi seguides de fermentació làctica. Així, un cop finalitzada la glicòlisi en les cèl·lules tumorals el piruvat és reduït a lactat mitjançant l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) en un procés en què es redueix el coenzim  $\text{NAD}^+$ , permetent així que es pugui tornar a dur a terme la glicòlisi. Finalment, el lactat és secretat fora la cèl·lula a través de proteïnes transmembrana.

Aquest procés d'obtenció d'energia acaba acidificant el medi extracel·lular en comparació amb l'intracel·lular, fet que afavoreix la progressió tumoral. Altrament, s'han descobert els efectes immunosupressors del lactat que, en trobar-se en el microambient tumoral, afavoreix l'evasió del sistema immunitari. Tanmateix, s'ha trobat que no totes les cèl·lules canceroses presenten aquests canvis en el metabolisme, fet que s'ha atribuït a l'heterogeneïtat tumoral.



**Figura 11:** Esquema que mostra els canvis en el metabolisme cel·lular en les cèl·lules tumorals



## 4. Les cèl·lules mare tumorals

---

### 4.1. Les cèl·lules mare

Les cèl·lules mare, també denominades cèl·lules troncales de l'anglès *stem cells*, són cèl·lules no diferenciades o parcialment diferenciades que posseeixen la capacitat de diferenciar-se en diverses classes de cèl·lules i de proliferar, per produir noves cèl·lules mare, indefinidament. Aquestes són el tipus de cèl·lula més antic en el llinatge cel·lular i, en els organismes adults, actuen com a un sistema de reparació o renovació dels teixits del cos, ja que són capaces de substituir altres cèl·lules danyades mentre l'organisme és viu.

Les cèl·lules mare posseeixen la capacitat de dividir-se de forma asimètrica, donant lloc a dues cèl·lules filles diferents, una d'elles amb la capacitat de diferenciar-se si les condicions són favorables i l'altre amb les mateixes propietats que l'original. Aquesta propietat és coneguda com a autorenovació. A més a més, la presència de l'enzim telomerasa possibilita un augment del límit d'Hayflick en les cèl·lules mare. Per últim, les cèl·lules mare són potents, és a dir, poden diferenciar-se en cèl·lules més o menys especialitzades.

Aquesta classe de cèl·lules podria tenir una gran quantitat d'usos clínics i podrien ser emprades en camps com la medicina regenerativa, la immunoteràpia o la teràpia gènica. Les teràpies que usen cèl·lules mare aporten una visió esperançadora per moltes malalties que, avui dia, suposen un repte. Els investigadors veuen les cèl·lules mare com un objecte clau pel desenvolupament de futurs tractaments per malalties que, actualment, presenten uns pronòstics pobres o la incapacitat d'ésser curades, com la leucèmia limfoblàstica aguda o la diabetis de tipus 1.

#### 4.1.1. Classificació

Les cèl·lules mare es poden classificar en diversos subgrups tenint en consideració la seva potència. D'aquesta manera, obtenim cinc tipus diferents.

- Les cèl·lules mare totipotents, també denominades cèl·lules mare omnipotents, tenen la capacitat de generar tot un organisme i les estructures de suport extraembrionàries durant la gestació. Aquestes sorgeixen de la fusió de l'òvul i l'espermatozoide i, per tant, la més coneguda és el zigot. A més a més, també són considerades cèl·lules totipotents les produïdes durant les primeres divisions del zigot.
- Les cèl·lules mare pluripotents són les descendents de les cèl·lules totipotents i són capaces de diferenciar-se en quasi qualsevol classe de cèl·lules. Aquestes no podem formar tot un organisme complet, però sí qualsevol llinatge cel·lular. Les cèl·lules pluripotents més estudiades són les embrionàries, que es troben a l'interior del

blastocist<sup>21</sup>, envoltades per una capa externa formada per unes setanta cèl·lules. Aquestes són emprades com a model per estudiar el desenvolupament embrionari.

- Les cèl·lules mare multipotents posseeixen la capacitat de diferenciar-se en un nombre determinat de tipus cel·lulars. De fet, només tenen la capacitat de diferenciar-se en cèl·lules del seu propi llinatge cel·lular. En són un exemple les cèl·lules mare neurals (CMN), que poden donar lloc només a neurones, astròcits i oligodendròcits.
- Les cèl·lules mare oligopotents tenen la capacitat de generar exclusivament alguns tipus cel·lulars. Aquestes són menys potents que les cèl·lules multipotents i en són un exemple les cèl·lules mare limfoides.
- Les cèl·lules mare unipotents són capaces de generar un únic tipus cel·lular. Aquestes es diferencien de les cèl·lules progenitores, ja que tenen la capacitat d'autorenovar-se, al contrari que aquestes últimes. En són un exemple les cèl·lules mare musculars.

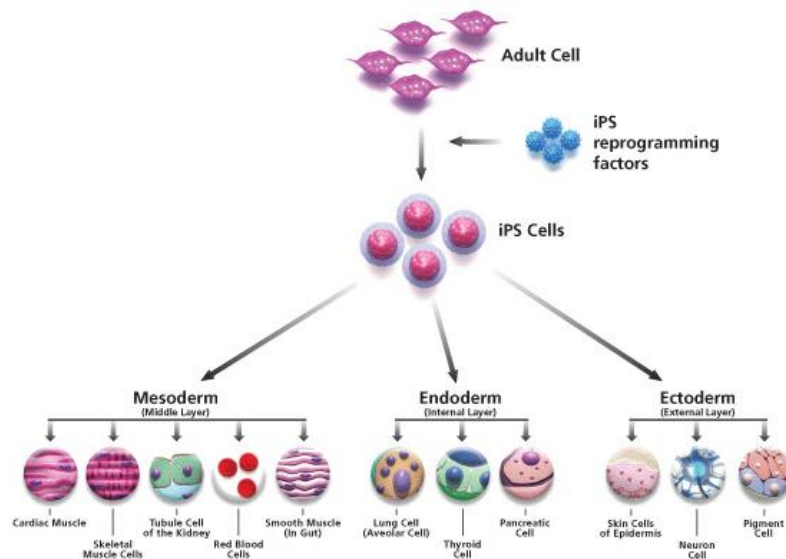
A més a més, les cèl·lules mare també es poden classificar segons el seu origen, és a dir, la seva font. D'aquesta manera, obtenim tres classes diferents de cèl·lules mare.

- Les cèl·lules mare adultes, també denominades cèl·lules mare somàtiques, es localitzen als teixits i òrgans dels individus pluricel·lulars adults. Aquestes tenen la capacitat de diferenciar-se i donar lloc, només, a cèl·lules del mateix teixit on es troben. Aquestes permeten la renovació periòdica de determinats teixits i també possibiliten processos de regeneració com, per exemple, en el cas del fetge.
- Les cèl·lules mare embrionàries provenen, com indica el seu nom, de l'embrió i formen part de la massa cel·lular interna d'un embrió d'uns cinc dies d'edat aproximadament. En el cas particular dels humans, una vegada produïda la fecundació, el zigot comença un procés de divisió cel·lular que tarda, més o menys, uns tres dies. Llavors, l'embrió passa a estar format per vuit cèl·lules, que comencen un procés de compactació en el qual es perd la definició entre les cèl·lules i es forma la mòrula, el primer estat de desenvolupament de l'embrió. Posteriorment, es crea una cavitat buida a l'interior de l'embrió i es forma el blastocist. En aquest moment s'estableixen dues poblacions diferenciades: per una banda, les cèl·lules que es queden a l'exterior i formen el trofocoderm, del qual sorgirà la part extraembrionària de la placenta i, per altra banda, les cèl·lules que es queden a l'interior i formaran el fetus i el cordó umbilical.
- Les cèl·lules mare de pluripotència induïda (iPS) són cèl·lules adultes que han estat convertides en cèl·lules mare pluripotents al laboratori, mitjançant enginyeria genètica

---

<sup>21</sup> Segon estat en el desenvolupament embrionari dels animals.

en un procés denominat reprogramació. Les cèl·lules obtingudes mitjançant aquest procés es poden mantenir i cultivar i donen lloc a més de dos-cents tipus cel·lulars.



**Figura 12:** Esquema que mostra el procés pel qual una cèl·lula adulta és convertida en una cèl·lula mare de pluripotència induïda

#### 4.2. Les cèl·lules mare tumorals

Les cèl·lules mare tumorals, també denominades cèl·lules iniciadores del tumor (CSCs de l'anglès *Cancer Stem Cells*), són la subpoblació de cèl·lules d'una neoplàsia maligna encarregada de produir un nou teixit cancerós. Aquestes serien el motor que impulsa el creixement de noves cèl·lules tumorals i, probablement, l'origen del procés cancerós. Les CSCs es caracteritzen per presentar tres propietats: en primer lloc, la capacitat d'iniciar un tumor i de conduir la progressió tumoral; la capacitat de produir un nombre il·limitat de còpies d'elles mateixes mitjançant l'autorenovació i, per últim, el potencial per donar lloc a qualsevol cèl·lula present en el tumor.

Les cèl·lules mare tumorals presenten característiques similars a les cèl·lules mare, com la capacitat d'autorenovar-se i de diferenciar-se. A causa d'aquestes dues propietats el nom més emprat i acceptat per aquesta subpoblació tumoral és, avui dia, cèl·lules mare tumorals. Aquestes representen, de la mateixa manera que les cèl·lules mare, una minoria dins la població tumoral, però són les encarregades d'iniciar i liderar el creixement tumoral. Aquesta particularitat les ha portat a ser el centre d'atenció a l'hora de desenvolupar nous tractaments contra el càncer i un objectiu clau per assolir millors pronòstics.

Tot i la seva nomenclatura, les cèl·lules mare tumorals posseeixen dos possibles orígens. Per una banda, les CSCs poden procedir de cèl·lules mare que han patit mutacions oncogèniques, inactivant d'aquesta manera els controls que restringeixen la seva expansió. Per altra banda, observacions recents han demostrat que, en algunes neoplàsies malignes, les CSCs s'originen a partir de cèl·lules progenitores que adquireixen la capacitat d'autorenovar-se. Aquest



teixit. Aquest fet augmenta les possibilitats d'adquirir més mutacions al llarg de totes les seves divisions cel·lulars.

- Les dificultats a l'hora de reproduir un tumor. La necessitat d'injectar milions de cèl·lules tumorals en un ratolí per poder produir un tumor va fer considerar la idea que només hi havia un nombre limitat de cèl·lules capaces d'originar i mantenir un tumor en la població tumoral.
- Ineficàcia de la metàstasi. La metàstasi és un procés complex, lent i poc eficient. De fet, només una petita quantitat de cèl·lules tenen la capacitat d'instal·lar-se en una nova regió del cos i formar una nova neoplàsia. Això suggereix que la capacitat de generar nous tumors és present només en algunes cèl·lules. Aquesta mateixa evidència s'observa també en els tumors recurrents, com el glioblastoma.

### 4.3. Implicacions clíniques

L'evidència que molts càncers són originats i promoguts per les CSCs té importants implicacions clíniques. Els tractaments convencionals operen sota el supòsit que totes les cèl·lules en la població tumoral posseeixen el mateix potencial maligne i, per tant, manquen d'especificitat contra les cèl·lules mare tumorals. La majoria d'aquests tractaments redueixen la mida dels tumors, però no eliminen les CSCs, fet que condueix a la reaparició del tumor.

Les cèl·lules mare tumorals posseeixen una resistència, bé intrínseca o adquirida, als agents citotòxics i la radiació ionitzant. Per aquest motiu, aquestes són resistents a la quimioteràpia i la radioteràpia. Les CSCs presenten una proliferació més lenta que les cèl·lules diferenciades i, per tant, les teràpies dirigides a atacar les cèl·lules en divisió no eliminen la totalitat de les CSCs. Addicionalment, les cèl·lules mare tumorals presenten més mecanismes de reparació de l'ADN, una expressió de proteïnes antiapoptòtiques i de fluxos de sortida de drogues.

A causa d'aquesta resistència a les teràpies convencionals, s'han començat a estudiar teràpies dirigides contra les CSCs. Aquests tractaments podrien incrementar l'eficàcia de les teràpies, ja que atacarien les cèl·lules culpables de la iniciació i la progressió del tumor. A més a més, reduirien el risc de recurrència i metàstasi. Aquesta teràpia dirigida, fins avui dia, s'ha centrat en la inducció de la diferenciació de les CSCs; la reversió de la resistència a les teràpies convencionals; el bloqueig dels mecanismes operatius en les CSCs i l'eliminació d'aquestes cèl·lules gràcies a la immunoteràpia.

#### 4.3.1. Cèl·lules mare i el tractament del glioblastoma

En el glioblastoma, el tractament convencional, cirurgia seguida de radioteràpia combinada amb temozolomida, ha demostrat ésser ineficaç. Aquest tractament redueix fortament la mida del tumor, però amb el temps acaba reapareixent. S'ha atribuït aquest desafortunat fet a la presència de CSCs en el tumor de glioblastoma. La presència d'aquestes cèl·lules i

l'heterogeneïtat molecular i genètica en aquests suposa un gran repte a l'hora de tractar aquesta neoplàsia maligna.

Les teràpies dirigides contra les CSCs s'han estudiat també per tractar el glioblastoma. Una possible teràpia dirigida que s'està estudiant és l'ús d'inhibidors de PARP (poli ADP ribosa polimerasa) per augmentar l'apoptosi a causa de dany genètic. Quan es va emprar l'inhibidor de PARP, ABT-888, en combinació amb temozolomida i radiació, varen augmentar els nivells d'apoptosi i la sensibilitat al tractament. Un altre enfocament diferent per la teràpia dirigida és el bloqueig de GLUT3, per reduir els nivells de glucosa que poden agafar les CSCs, reduint així també la seva activitat. Per últim, en el cas de la immunoteràpia, el desenvolupament de vaccins basats en cèl·lules dendrítiques ha mostrat uns resultats esperançadors en els assajos clínics. L'ús del vaccí de cèl·lules dendrítiques derivades del pacient desenvolupada contra sis antígens altament expressats en les CSCs del glioblastoma està actualment sota assaig clínic.

Tot i això, alguns problemes a l'hora d'elaborar aquestes teràpies dirigides són la manca d'informació sobre els marcadors de les CSCs i les vies que comparteixen amb altres cèl·lules més a baix en la jerarquia del tumor. La comprensió de la biologia cel·lular de les CSCs és crucial a l'hora de tractar càncers com el glioblastoma i una fita necessària per a la millora de molts tractaments contra aquests.

### III. LA MESURA DE L'ACIDESA, EL CONCEPTE DEL pH

#### 5. El pH

Per mesurar l'acidesa d'una substància en dissolució aquosa podem determinar la concentració d'ions oxoni ( $H_3O^+$ ), i per mesurar l'alcalinitat o basicitat, la concentració d'ions hidroxil ( $OH^-$ ). Com més grans siguin aquestes concentracions més àcida o més bàsica serà la dissolució. Tanmateix, per mesurar l'acidesa o alcalinitat d'una dissolució aquosa només és necessari determinar la seva concentració d'ions oxoni.

Com que les concentracions es tracten, en general, de nombres molt petits, es fa servir la notació científica. Llavors, el químic danès S. Sørensen va suggerir, el 1909, una nova manera d'expressar la concentració d'ions oxoni mitjançant la utilització de l'escala del pH, una escala logarítmica que oscil·la entre el zero i el catorze. D'aquesta manera, el químic va descriure el pH amb la següent fórmula:  $pH = -\log [H_3O^+]$ .

Es pot demostrar que a l'aigua o a qualsevol dissolució aquosa el producte de la concentració dels dos ions és de  $10^{-14}$ . Per tant, sabem que una dissolució aquosa és neutre quan la concentració d'ions oxoni equival a  $10^{-7}$ , ja que llavors és igual a la concentració d'ions hidroxil. A més a més, sabem que una dissolució és àcida si la concentració d'ions oxoni suposa valors superiors a  $10^{-7}$  i bàsica si suposa valors inferiors. D'aquesta manera es pot establir que en l'escala de pH el 7 correspon a una dissolució neutra, mentre que els valors inferiors a aquest corresponen a una dissolució àcida i els superiors a una dissolució bàsica.

És important considerar que en ser el pH una escala logarítmica, una variació en una unitat correspon a un gran canvi en la concentració d'ions oxoni. Així, una unitat de pH correspon a deu vegades la concentració d'oxonis.

##### 5.1. Àcids i bases

Els àcids i les bases són presents en el nostre dia a dia. Alguns àcids d'interès són l'àcid clorhídric (conegut com a sulfumant si es troba molt concentrat) o l'àcid acètic (present al vinagre), mentre que algunes bases d'interès són l'amoníac (conegut com a productes de neteja) o l'hidròxid de sodi (usat per desembussar canonades). Aquestes substàncies presenten unes propietats particulars resumides en la següent taula.

Característiques dels àcids	Característiques de les bases
<ul style="list-style-type: none"><li>• Posseeixen un gust agre</li><li>• Són corrosius: reaccionen amb metalls desprenent hidrogen i amb carbonats desprenent diòxid de carboni</li><li>• Les seves dissolucions concentrades destrueixen la matèria orgànica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Posseeixen un gust amarg i són untuoses al tacte</li><li>• Reaccionen amb els greixos formant sabons.</li><li>• Danyen la capa greixosa de la pell.</li><li>• Les seves dissolucions concentrades destrueixen la matèria orgànica.</li></ul>



<ul style="list-style-type: none"><li>• Són electròlits, és a dir, en dissoldre's en aigua deixen passar el corrent elèctric.</li><li>• Neutralitzen les bases</li><li>• Produeixen sals en reaccionar amb les bases</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Són electròlits, és a dir, en dissoldre's en aigua deixen passar el corrent elèctric.</li><li>• Neutralitzen els àcids</li><li>• Produeixen sals en reaccionar amb els àcids.</li></ul>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Figura 14: Principals propietats dels àcids i les bases.

Els àcids són, segons la teoria àcid-base de G. N. Lewis, substàncies capaces d'acceptar i de compartir un parell d'electrons, substàncies que posseeixen un orbital buit per allotjar els electrons. En canvi, les bases són substàncies capaces de cedir i compartir un parell d'electrons, substàncies que posseeixen un parell d'electrons lliures per cedir. Segons aquesta teoria, els àcids i les bases són substàncies capaces de reaccionar entre elles formant enllaços covalents datius<sup>22</sup> i neutralitzar-se mútuament.

Com ja ha estat prèviament esmentat, els àcids i les bases són electròlits. Aquesta propietat dona lloc a dues classes d'àcids i bases. Els àcids i les bases fortes són les que, en una dissolució aquosa, es dissocien totalment, mentre que els àcids i les bases febles són les que, en una dissolució aquosa, es dissocien parcialment. Per aquest motiu, l'efecte corrosiu dels electròlits és major com més forts siguin aquests.

## 5.2. Mesura del pH

Les variacions en el pH o intervals de pH es poden mesurar amb els indicadors àcid-base, que poden ésser substàncies químiques o paper, o amb el pH-metre (vegeu fig. 19 pàgina 45).

Els indicadors àcid-base són substàncies que modifiquen el color de les dissolucions en variar el pH, a causa de canvis produïts en la seva estructura química. Aquestes substàncies solen ser orgàniques, com per exemple, l'ataronjat de metil, que es torna groc si la dissolució és bàsica o vermell si és àcida. Un altre exemple n'és la fenolftaleïna, que es torna transparent si la dissolució és àcida o fúcsia si és bàsica.



Figura 15: Paper indicador de pH

Tot i això, per conèixer el pH de manera exacta es fa servir un instrument que consisteix en un elèctrode de vidre sensible als canvis en la concentració de protons amb el nom de pH-metre. Per poder efectuar una mesura precisa és necessari calibrar l'elèctrode primer amb unes dissolucions estàndard abans d'introduir-lo en la dissolució problema. Aquest instrument és l'utilitzat en el laboratori a causa de la seva precisió.

<sup>22</sup> Enllaç covalent en què una de les dues espècies, el donador, aporta el parell d'electrons a l'acceptor.

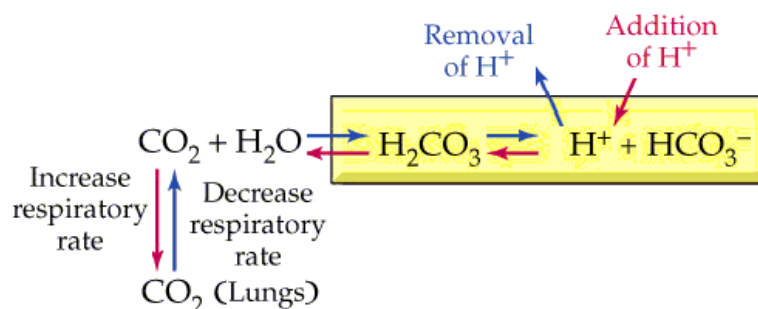


### 5.3. La importància del pH en l'organisme

En el cos humà trobem diferents valors de pH en diverses parts del cos, trobant, per exemple, un pH lleugerament alcalí en la sang i un pH altament àcid a l'interior de l'estómac. Aquests determinats valors d'acidesa són crucials perquè es duïen a terme els processos biològics necessaris per a la vida.

Per exemple, el pH àcid del suc gàstric de l'estómac és fonamental per la descomposició de la matèria orgànica i per l'activació dels enzims que duen a terme aquest procés. A l'interior de les cèl·lules, els canvis de pH afecten processos bioquímics com la glucòlisi o la síntesi d'ADN. A la sang, els grans canvis de pH provoquen la mort de l'ésser humà.

Gràcies a la seva importància, trobem en el nostre cos diferents mecanismes mitjançant els quals es regula el pH del nostre cos. A la sang trobem el sistema tampó bicarbonat, pel qual els protons que alliberen l'àcid formen àcid carbònic, que ràpidament es descompon en diòxid de carboni i aigua. En canvi, si el medi és bàsic, el procés es realitza a l'inrevés.



**Figura 16:** Esquema del sistema tampó bicarbonat que controla el pH en la sang

En les cèl·lules trobem el sistema tampó fosfat que funciona amb la següent reacció química, que pot anar a ambdues direccions:  $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{HPO}_4^{2-} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$ . En conclusió, mantenir els nivells de pH relativament constants en les diferents parts del cos és crucial per tenir una bona salut.

## **PART PRÀCTICA**

---

### **PROBLEMA**

Les cèl·lules neoplàstiques presenten, com ja s'ha esmentat prèviament, un metabolisme alterat caracteritzat per una predominança metabòlica de la glicòlisi seguit de l'obtenció de lactat (àcid làctic) per fermentació. L'àcid làctic acidifica massa el citoplasma de la cèl·lula i aleshores s'optimitzen molt els mecanismes d'alliberació a l'exterior. Aquest procés acidifica el medi extern de les cèl·lules canceroses que alliberen àcid làctic al medi extracel·lular. A més a més, aquest tret també converteix el medi intracel·lular d'aquestes cèl·lules tumorals més alcalí respecte l'exterior en comparació amb les cèl·lules normals. Aquestes dues característiques promouen la proliferació de les cèl·lules neoplàstiques i la progressió tumoral.

En aquesta part pràctica, he estudiat els efectes que pot tenir la variació del pH extracel·lular sobre la proliferació de les cèl·lules neoplàstiques, ja que aquestes s'adapten a un medi extracel·lular àcid. Ho he estudiat amb un pH del seu medi de cultiu amb un valor superior i inferior al pH estàndard, i he comprovat els canvis a les vint-i-quatre, quaranta-vuit i setanta-dues hores. Aquestes valoracions les he realitzat en cèl·lules tumorals de Glioblastoma U87-MG diferenciades (FBS) que representen la major part de la massa tumoral, i en cèl·lules mare tumorals (STEM), causants de l'aparició del tumor i recidiva.

### **OBJECTIUS**

El principal objectiu d'aquesta part pràctica és determinar els efectes que té la variació del pH extracel·lular en la proliferació i progressió tumoral en les cèl·lules diferenciades i les cèl·lules stem de Glioblastoma.

A més a més, aquest experiment persegueix altres objectius secundaris. En primer lloc, tenir un primer contacte amb el material, les instal·lacions i els procediments del laboratori. Alhora, dur a terme alguns processos de laboratori com, per exemple, el comptatge de cèl·lules amb la cambra de Neubauer i aprendre a emprar els instruments bàsics del laboratori com la cabina de flux laminar. També, tenir un primer contacte i aprendre a manipular i cultivar línies cel·lulars.

Per últim, aprendre a fer servir el pH-metre, elaborar solucions amb un valor de pH determinat, fotografiar cèl·lules amb un microscopi i extreure conclusions de les possibles diferències morfològiques causades pels diferents nivells de pH.

### **MATERIALS**

- Línia cel·lular: U87 glioblastoma
- Medi FBS
- Pipetes de 5 i 10 mL
- Incubadora

- Medi stem
- Solució PBS 10x
- Aigua MilliQ
- Tripsina
- Solució d'àcid clorhídric 1 M
- Solució d'hidròxid sodi 1 M
- pH-metre
- Falcons<sup>23</sup> de 15 i 50 mL
- Centrifugadora
- Plaques de petri
- Autoclau
- Cabina de flux laminar
- Sistema del buit
- Cambra de Neubauer
- Micropipetes
- Filtre
- Plaques amb sis pouets
- Eppendorfs
- Microscopi

## PROCEDIMENT

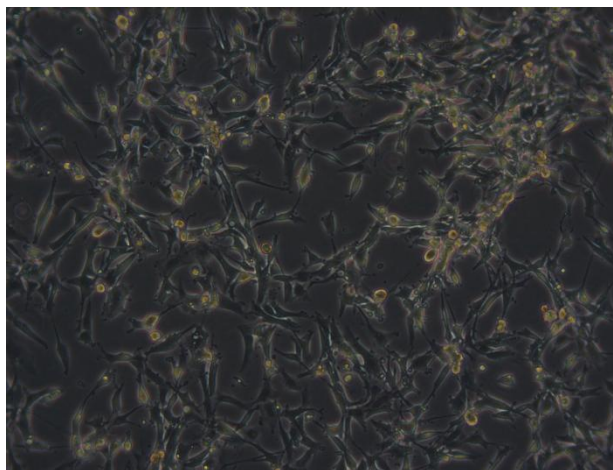
1. Calibrem el pH-metre i, després, mesurem el pH d'ambdós medis per saber-ne l'estàndard a l'hora d'elaborar els medis amb valors d'acidesa diferents. El pH del medi stem és de 8,64, mentre que el pH del medi FBS és de 7,62. Posteriorment, filtrem els dos medis a la cabina de flux laminar per esterilitzar-los.

2. Descongelem dos criovials amb cèl·lules de glioblastoma i les temperem afegint medi prèviament escalfat. Llavors, les traspassem a dos falcons de 15 mL, un per a les cèl·lules FBS i l'altre per les stem. Després, centrifuguem per eliminar el DMSO, un crioprotector que és tòxic a temperatura ambient, i eliminem el medi per decantació. Suspenem les cèl·lules en un mil·lilitre del seu medi corresponent i passem el contingut a dues plaques de petri diferents, a les quals afegim 6 mL més del seu medi. Per últim, deixem les cèl·lules a la incubadora, a 37 °C.

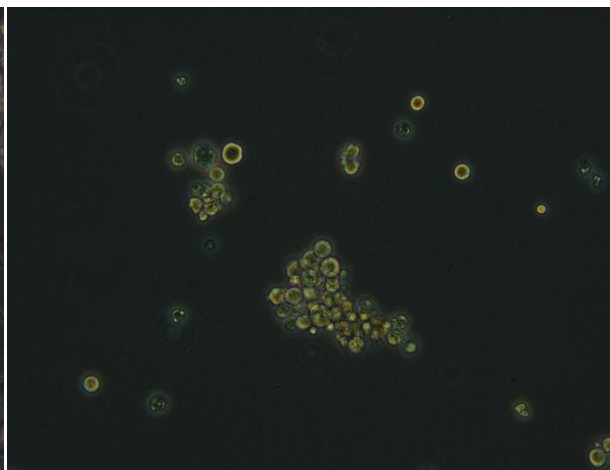
3. Al cap de dos dies, extraïem les dues plaques de la incubadora i observem els dos cultius al microscopi per observar-ne el creixement. Els dos tipus cel·lulars presenten una estructura diferent: les cèl·lules stem creixen formant grans esferes, mentre que les FBS són adherides i formen una estructura similar a una xarxa.

---

<sup>23</sup> Material de laboratori similar als tubs d'assaig de determinades quantitats.



**Figura 17:** Cèl·lules FBS de la línia cel·lular U87.



**Figura 18:** Cèl·lules stem de la línia cel·lular U87

Un cop fet això, retornem les cèl·lules a la incubadora, descongelem la tripsina i l'escalfem juntament amb els dos medis. Llavors, preparam una solució de PBS 1x. Per fer-ho, agafem 25 mL d'una solució de PBS 10x i hi afegim 250 mL d'aigua Milli-Q<sup>24</sup>.

Després, extraïem el medi FBS de la placa de petri amb el sistema del buit, ja que com que es troben adherides a la placa, no les perdem. Hi afegim, posteriorment, 2 mL de la solució de PBS per acabar d'eliminar les restes de medi i ho tornem a aspirar amb el sistema del buit. Aleshores, afegim 1,5 mL de tripsina, un enzim que trenca enllaços extracel·lulars i que, per tant, desenganxa les cèl·lules adherides, i deixem la placa dos minuts a la incubadora perquè aquesta actuï. Un cop passats els dos minuts, afegim 4 mL de medi FBS a la placa per inactivar la tripsina i, llavors, passem tot el contingut a un falcon de 15 mL. A més a més, recollim tot el contingut de la placa de petri amb les cèl·lules stem i el col·loquem en un altre falcon.

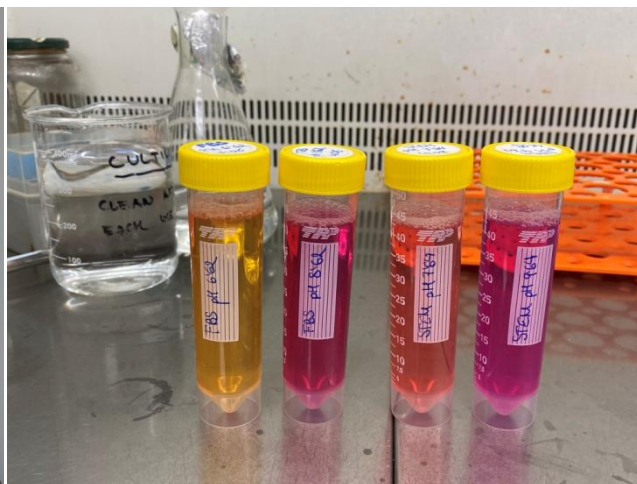
Llavors, centrifuguem els dos falcons i eliminem els medis per decantació. Seguidament, suspenem les cèl·lules en 1 mL del seu medi amb una micropipeta, fent passar el *pellet* diverses vegades per aquesta fins a fer-lo desaparèixer. Separem les cèl·lules FBS en tres plaques de petri grans, a les quals afegim 10 mL de medi i 330  $\mu$ L de la solució del falcon. Les stem, com que proliferen més lentament, les separem en només dues plaques, a les quals afegim 7 mL de medi i 120  $\mu$ L del contingut del falcon. Finalment, col·loquem totes les plaques a la incubadora perquè les cèl·lules creixin i es divideixin.

4. Al cap d'uns dies, extraïem a la cabina de flux laminar 100 mL de cadascun dels dos medis i els distribuïm en dos falcons de 50 mL. Després, calibrem el pH-metre i amb una solució 1 M d'àcid clorhídric elaborem dues solucions un punt més àcides que els medis estàndard. Igualment, però amb una solució 1 M d'hidroxid de sodi, elaborem dues solucions un punt més bàsiques que els medis estàndard.

<sup>24</sup> L'aigua Milli-Q és una aigua ultrapura que ha estat filtrada diverses vegades, la qual s'obté amb una màquina especial.



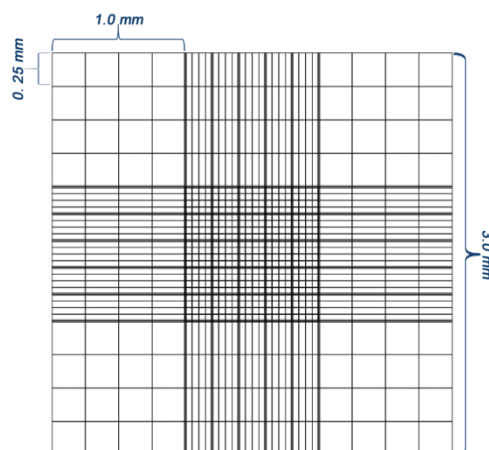
**Figura 19:** Elaborant una solució d'un pH determinat amb el pH-metre.



**Figura 20:** Imatge dels quatre falcons amb els medis amb pH diferents de l'estàndard.

5. Per analitzar si l'inici de l'experiment és viable procedim a comptar les cèl·lules de què disposem. Per les cèl·lules FBS, retirem el medi amb el sistema del buit, després, hi afegim 7 mL de PBS i tornem a retirar el medi amb el sistema del buit. Aleshores, afegim 5 mL de tripsina, ho deixem reposar a la incubadora i afegim 5 mL de medi FBS. Col·loquem tot dins d'un falcon i ho centrifuguem. Eliminem el medi per decantació i suspenem les cèl·lules en 1 mL de medi. Posteriorment, afegim tres mil·lilitres més.

A continuació, procedim a comptar les cèl·lules amb la cambra de Neubauer, que és un instrument emprat en medicina i biologia molecular per realitzar el comptatge de cèl·lules en un medi líquid, com pot ser un cultiu cel·lular. Està composta per un portaobjectes amb dues zones lleugerament inferiors que han estat marcades amb un diamant, deixant el dibuix d'una quadrícula que consta de quatre quadrants de 16 quadrats cadascun. Aquest portaobjectes es cobreix amb el cobreobjectes i després s'introdueix la mostra per capil·laritat entre la cambra i el cobreobjectes. La cambra té dues zones i, per tant, es pot realitzar el comptatge de dos cultius simultàniament. A partir del nombre de cèl·lules comptades en els quatre quadrants de la cambra que no toquin cap línia es calcula la concentració de cèl·lules, ja que



**Figura 21:** Esquema que mostra la quadrícula que hi ha en la cambra de Neubauer.

es coneix el volum que cap dins la cambra. Llavors, obtenim el nombre de cèl·lules per mil·lilitre multiplicant per  $10^4$  el nombre obtingut.

En el cas de les cèl·lules FBS, la mitjana del nombre de cèl·lules per quadrant ha estat de 75,5.

$$75,5 \cdot 10^4 \cdot 4 = 3.020.000 \text{ cèl·lules FBS}$$

Com que treballem amb una solució de 4 mL de volum, hem de multiplicar per quatre el nombre de cèl·lules per mil·lilitre. Amb aquests càlculs sabem que dins del falcon hi ha 3.020.000 cèl·lules FBS. Hi ha, per tant, cèl·lules suficients per repartir-ne 50.000 a cada pouet.

Per les cèl·lules stem, recollim tot el contingut de les plaques de petri en un falcon i després ho centrifuguem. Llavors, eliminem el medi per decantació i suspenem les cèl·lules en 3 mL del medi corresponent. Aleshores, comptem les cèl·lules amb la cambra de Neubauer. En el cas de les cèl·lules stem, la mitjana del nombre de cèl·lules per quadrant ha estat de 32.

$$32 \cdot 10^4 \cdot 3 = 960.000 \text{ cèl·lules stem}$$

Com que treballem amb una solució de 3 mL de volum, aquesta vegada cal multiplicar per tres el nombre de cèl·lules per mil·lilitre. Amb aquests càlculs sabem que tenim dins del falcon 960.000 cèl·lules stem. Igual que abans, són suficients per repartir 50.000 cèl·lules a cada pouet.

6. A continuació, realitzem els càlculs necessaris per saber quina quantitat de medi hem d'agafar dels dos falcons per omplir les quatre plaques de sis pouets amb 50.000 cèl·lules a cada pouet.

$$50.000 \text{ cells} \cdot \frac{4 \text{ mL}}{3.020.000 \text{ cells}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 66 \mu\text{L}$$

En el cas de les cèl·lules FBS, afegim 66  $\mu\text{L}$  de la solució del falcon en tots els pouets de dues plaques, una per observar els canvis en vint-i-quatre hores i l'altre per observar-los quan n'hagin passat quaranta-vuit. Després, afegim 2 mL del medi FBS més àcid als pouets de la dreta, 2 mL del medi FBS estàndard als pouets del mig i, per últim, 2 mL del medi FBS més bàsic als de l'esquerra.

$$50.000 \text{ cells} \cdot \frac{3 \text{ mL}}{960.000 \text{ cells}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 156 \mu\text{L}$$

En el cas de les cèl·lules stem, afegim 156  $\mu\text{L}$  de la solució del falcon en tots els pouets de les altres dues plaques. Després, afegim 2 mL del medi stem més àcid als pouets de la dreta, 2 mL del medi stem estàndard als pouets del mig i, per últim, 2 mL del medi stem més bàsic als de l'esquerra. Llavors deixem les plaques a la incubadora i tornem a col·locar la resta de cèl·lules FBS en una placa que col·loquem també a la incubadora per utilitzar-les posteriorment.





**Figura 22:** Imatge de les plaques de sis pouets de les cèl·lules FBS per 24 i 48 hores.



**Figura 23:** Imatge de les plaques de sis pouets de les cèl·lules stem per 24 i 48 hores.

7. Al cap de vint-i-quatre hores, observem dues plaques de sis pouets, una amb cèl·lules stem i l'altra amb cèl·lules FBS, amb el microscopi. Realitzem també fotografies per observar les possibles diferències morfològiques causades pel canvi del pH extracel·lular.

Després, disposem la placa amb les cèl·lules stem a la incubadora, ja que començarem treballant amb les FBS. Aspirem amb el sistema del buit el medi dels sis pouets, després afegim 1 mL de PBS a cadascun i tornem a aspirar amb el sistema del buit. A continuació, afegim 0,5 mL de tripsina, deixem reposar mig minut a la incubadora, ho traiem i afegim 1 mL de medi FBS a cada pouet. Recollim tot el contingut de cada pouet i el col·loquem en falcons de 15 mL. A continuació, centrifuguem tots els falcons, eliminem el medi per decantació i suspenem les cèl·lules en 0,5 mL de medi FBS. Per acabar, duem a terme el comptatge amb la cambra de Neubauer per a cada pouet i anotem els resultats.

Un cop fet això, traiem la placa amb les cèl·lules stem de la incubadora i recollim el contingut dels sis pouets en sis eppendorfs diferents. Centrifuguem els eppendorfs, suspenem les cèl·lules en 0,5 mL de medi stem, duem a terme el comptatge amb la cambra de Neubauer per a cada pouet i anotem els resultats.

8. L'endemà, observem les dues plaques restants i realitzem fotografies tenir constància de possibles canvis morfològics causats pel pH. Com que començarem treballant amb les cèl·lules FBS, retornem la placa amb les cèl·lules stem a la incubadora. Repetim el procés realitzat al cap de vint-i-quatre hores per realitzar el comptatge de les cèl·lules FBS amb la cambra de Neubauer i anotar els resultats. Després d'això, repetim també el procés per comptar les cèl·lules stem descrit prèviament i anotar igualment els resultats obtinguts.

9. Descongelem un altre criovial amb cèl·lules stem de glioblastoma per poder realitzar una altra vegada l'experiment a setanta-dues hores. Per fer-ho, temperem les cèl·lules mesclant-les amb medi prèviament escalfat. Col·loquem tot el contingut del criovial en un falcon de 15 mL i centrifuguem. Després, eliminem el medi i el DMSO per decantació, suspenem les cèl·lules en 1 mL de medi stem, les recollim i les col·loquem en una placa de petri, a la qual



afegim 7 mL més de medi stem. Per últim, recollim les cèl·lules FBS de la placa de petri on les vam deixar. Aspirem amb el sistema del buit, afegim 7 mL de PBS, tornem a aspirar amb el sistema del buit, afegim 5 mL de tripsina, deixem reposar a la incubadora, després afegim 5 mL de medi FBS, ho recollim tot en un falcon de 15 mL, centrifuguem i eliminem el medi per decantació. Llavors, suspenem les cèl·lules en 1 mL de medi FBS i col·loquem mig mil·lilitre en dues plaques de petri. Finalment, afegim 7 mL més de medi a cada placa de petri.

10. Al cap d'uns dies, comprovem si podem començar la segona part de l'experiment. En aquesta depenem del nombre de cèl·lules inicials i la disponibilitat de dies a l'hora de decidir cada quantes hores comprovem l'evolució del cultiu.

En el cas de les FBS, traiem les plaques de petri de la incubadora i, després, a la cabina de flux laminar, retirem el medi amb el sistema del buit, afegim 7 mL de PBS a cada placa i tornem a aspirar amb el sistema del buit. Llavors, afegim 5 mL de tripsina i les deixem reposar a la incubadora durant dos minuts. Al cap d'aquest temps, traiem les plaques de la incubadora, afegim 5 mL de medi FBS i el col·loquem tot dins d'un falcon de 15 mL. Centrifuguem, eliminem el medi per decantació i suspenem les cèl·lules en 1 mL de medi. Després afegim quatre mil·lilitres més i duem a terme el comptatge amb la cambra de Neubauer.

En el cas de les cèl·lules FBS, la mitjana del nombre de cèl·lules per quadrant ha estat de 101.

$$101 \cdot 10^4 \cdot 5 = 5.050.000 \text{ cèl·lules FBS}$$

Com que treballem amb una solució de 5 mL de volum, hem de multiplicar per cinc el nombre de cèl·lules per mil·lilitre. Amb aquests càlculs sabem que dins del falcon hi ha 5.050.000 cèl·lules FBS. Hi ha, per tant, cèl·lules suficients per repartir-ne 50.000 a cada pouet.

En el cas de les cèl·lules stem, recollim tot el contingut de la placa de petri en un falcon i després ho centrifuguem. Llavors, eliminem el medi per decantació i suspenem les cèl·lules en 1 mL de medi. Aleshores, comptem les cèl·lules amb la cambra de Neubauer.

En el cas de les cèl·lules stem, la mitjana del nombre de cèl·lules per quadrant ha estat de 26,5.

$$26,5 \cdot 10^4 = 265.000 \text{ cèl·lules stem}$$

Com que treballem amb una solució d'1 mL de volum, aquesta vegada cal multiplicar per 1 el nombre de cèl·lules per mil·lilitre. Amb aquests càlculs sabem que tenim dins del falcon 265.000 cèl·lules stem. En aquest cas, decidim omplir la placa de setanta-dues hores amb 50.000 cèl·lules, en lloc d'omplir la de quaranta-vuit i setanta-dues amb la meitat de cèl·lules, ja que aquest és un cultiu lent i volem observar clarament si segueix el patró que hem observat prèviament.

11. Realitzem els càlculs necessaris per saber quina quantitat de medi hem d'agafar dels dos falcons per omplir les quatre plaques de sis pouets amb 50.000 cèl·lules FBS a cada pouet.

$$50.000 \text{ cells} \cdot \frac{5 \text{ mL}}{5.050.000 \text{ cells}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 49,5 \mu\text{L}$$

En el cas de les cèl·lules FBS, afegim 49,5  $\mu\text{L}$  de la solució del falcon en tots els pouets de dues plaques, una per observar els canvis en quaranta-vuit hores i l'altre per observar-los quan n'hagin passat setanta-dues. Després, afegim 2 mL del medi FBS més àcid als pouets de la dreta, 2 mL del medi FBS estàndard als pouets del mig i, per últim, 2 mL del medi FBS més bàsic als de l'esquerra.

En el cas de les cèl·lules stem, repartim el mil·lilitre sencer entre el sis pouets i, per tant, col·loquem 166  $\mu\text{L}$  de la solució del falcon en tots els pouets de l'altre placa. Després, afegim 2 mL del medi stem més àcid als pouets de la dreta, 2 mL del medi stem estàndard als pouets del mig i, per últim, 2 mL del medi stem més bàsic als de l'esquerra

12. Finalment, recollim les cèl·lules FBS restants de la placa de petri i les col·loquem en un falcon de 15 mL. Centrifuguem, eliminem el medi per decantació i suspenem les cèl·lules en 0,9 mL de FBS. Després, col·loquem la solució de FBS amb cèl·lules en un criovial i l'omplim amb 0,1 mL de DMSO, un crioprotector. En acabar, col·loquem el criovial al congelador a  $-80^\circ\text{C}$ , on es conservaran per a ésser utilitzades en futurs experiments.

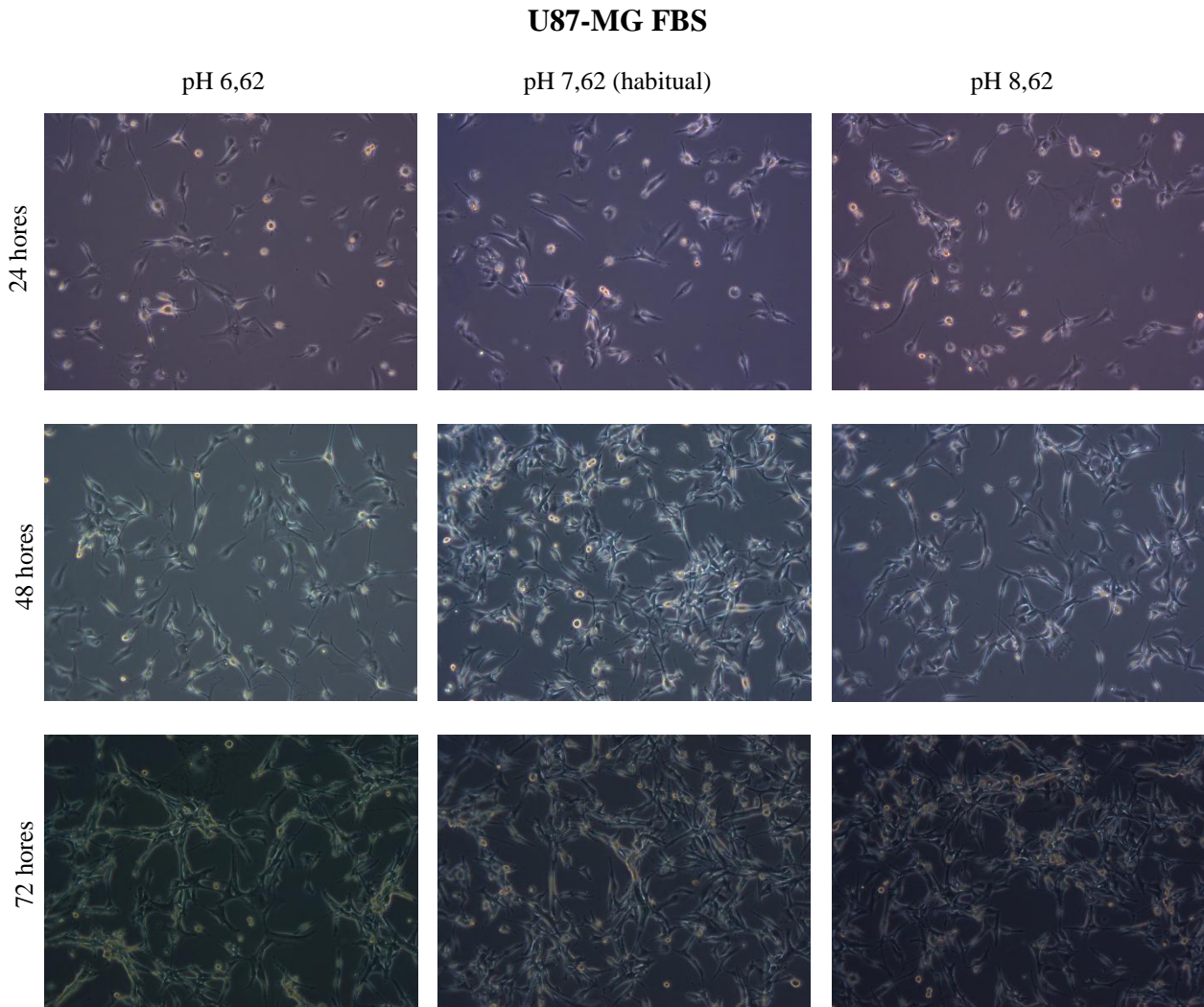
13. Al cap de dos dies, traiem la placa de quaranta-vuit hores de la incubadora i, a la cabina de flux laminar, aspirem el medi amb el sistema del buit. Després, afegim 1 mL de PBS a cada pouet i tornem a aspirar amb el sistema del buit. Afegim 0,5 mL de tripsina, deixem reposar la placa mig minut a la incubadora, la traiem i afegim 1 mL de medi a cada pouet. Recollim el contingut en sis falcons diferents, centrifuguem, eliminem el medi per decantació i suspenem les cèl·lules en mig mil·lilitre de medi FBS. Llavors, duem a terme el comptatge de cèl·lules amb la cambra de Neubauer i anotem els resultats.

14. L'endemà, observem les dues plaques al microscopi i realitzem fotografies per observar els possibles canvis morfològics provocats pels canvis de pH. Seguidament, col·loquem la placa amb les cèl·lules stem a la incubadora per treballar-hi més tard i, a la cabina de flux laminar, aspirem el medi de les cèl·lules FBS amb el sistema del buit. Després, afegim 1 mL de PBS a cada pouet, tornem a aspirar amb el sistema del buit, afegim 0,5 mL de tripsina, ho deixem reposar mig minut a la incubadora, traiem la placa i afegim 1 mL de medi FBS a cada pouet. Recollim el contingut de cada pouet en sis falcons de 15 mL i centrifuguem. A continuació, eliminem el medi per decantació, suspenem les cèl·lules en mig mil·lilitre, duem a terme el comptatge amb la cambra de Neubauer i anotem els resultats.

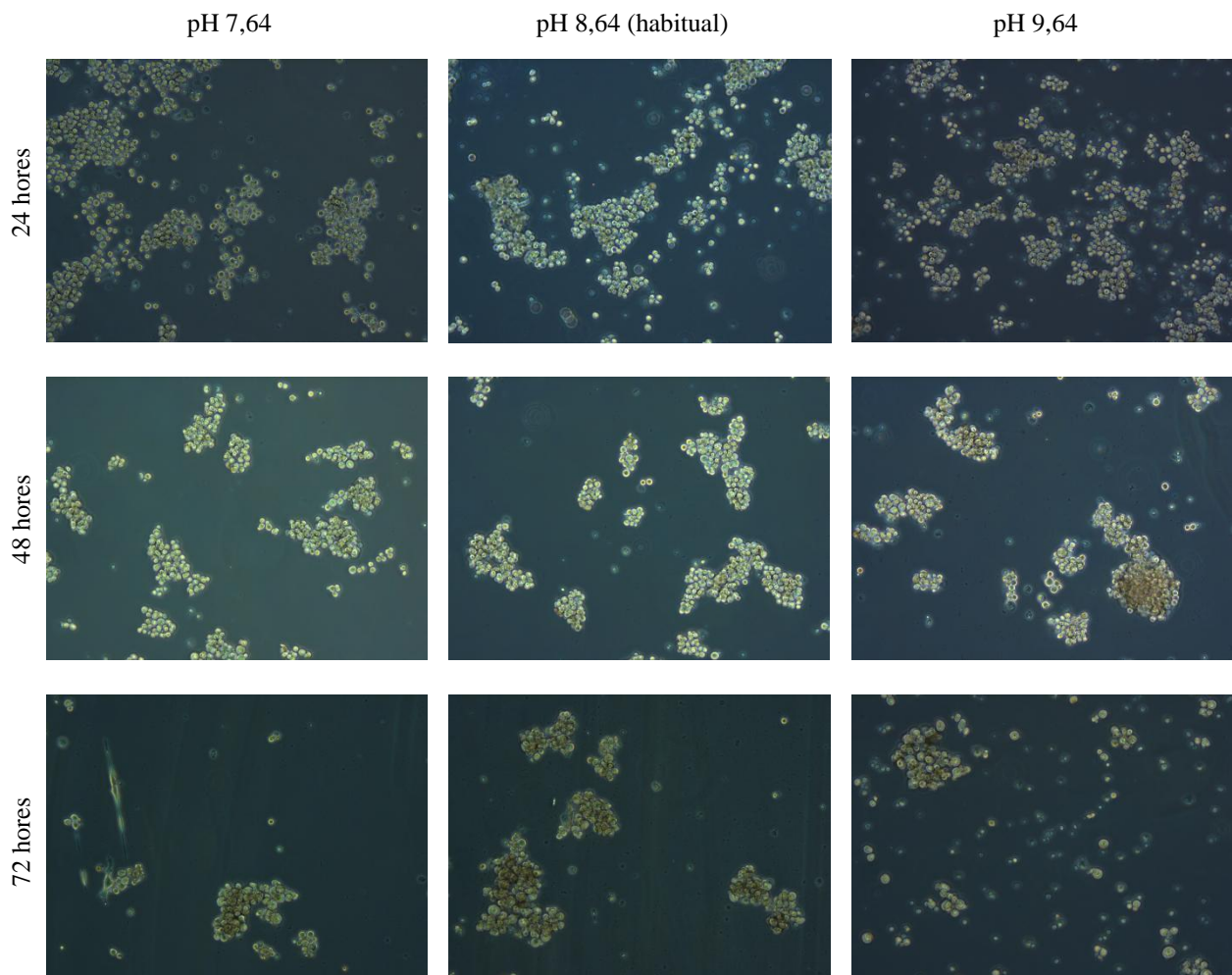
Després, traiem de la incubadora la placa amb les cèl·lules stem i recollim el contingut de cada pouet en sis eppendorfs. Centrifuguem i eliminem el medi per decantació. Per últim, suspenem les cèl·lules en mig mil·lilitre de medi stem, duem a terme el comptatge amb la cambra de Neubauer i anotem els resultats.

## RESULTATS

Els resultats d'aquesta part experimental s'expressen en tres parts diferents. En primer lloc, hi ha les fotografies realitzades als dos tipus cel·lulars en els tres intervals de temps estudiats. Després, observem dues taules en les quals veiem els resultats del comptatge de cèl·lules en cada pouet de les plaques de sis pouets on es va realitzar l'experiment. Per últim, consta de dues gràfiques on veiem com varia la proliferació segons el pH extracel·lular amb les mitjanes dels resultats observats a les taules anteriors.

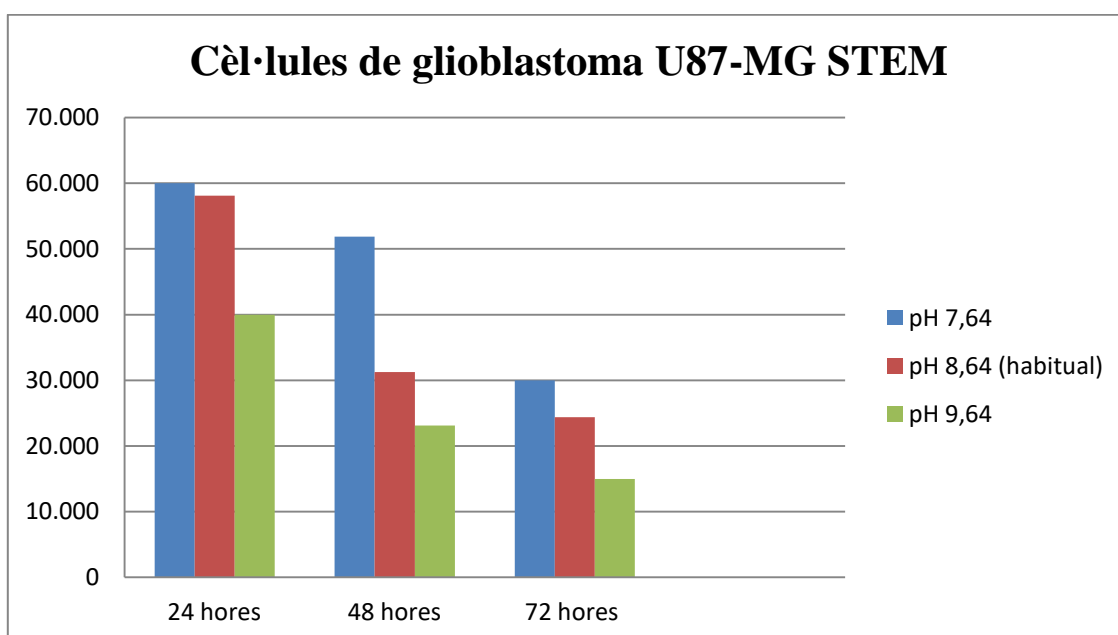
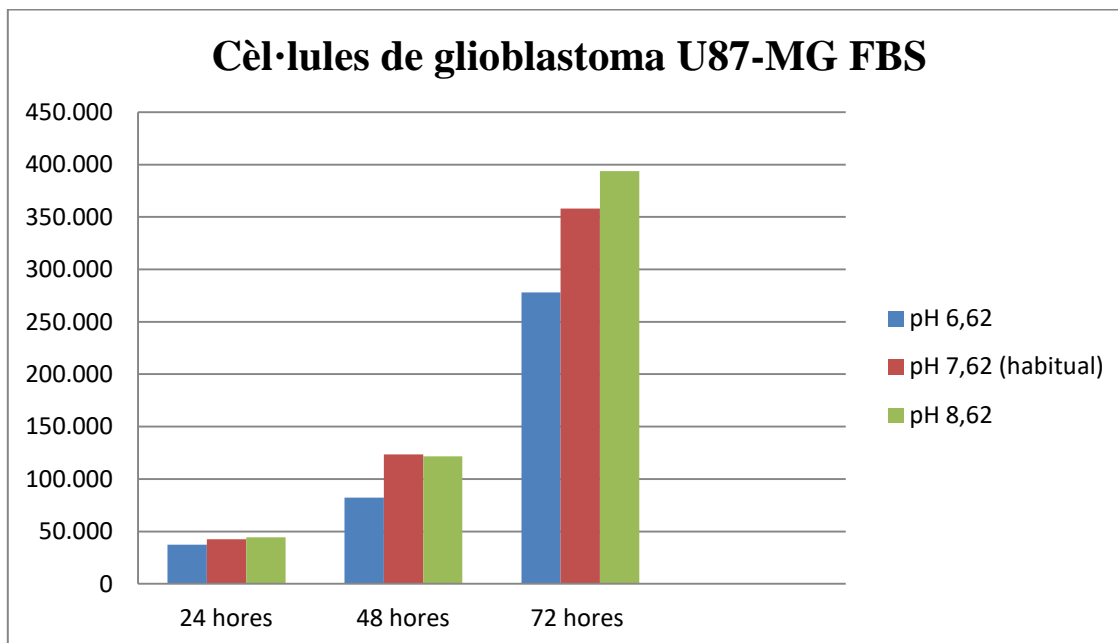


### U87-MG STEM



<b>U87-MG FBS</b>	
<b>pH extracel·lular</b>	<b>Nombre de cèl·lules</b>
<b>Vint-i-quatre hores</b>	
pH 6,62 (N1)	31.250
pH 6,62 (N2)	43.750
pH 7,62 (N1)	42.500
pH 7,62 (N2)	42.500
pH 8,62 (N1)	33.750
pH 8,62 (N2)	55.000
<b>Quaranta-vuit hores</b>	
pH 6,62 (N1)	83.750
pH 6,62 (N2)	77.500
pH 7,62 (N1)	60.000
pH 7,62 (N2)	80.000
pH 8,62 (N1)	78.750
pH 8,62 (N2)	71.250
<b>Quaranta-vuit hores (rèplica)</b>	
pH 6,62 (N1)	93.750
pH 6,62 (N2)	73.750
pH 7,62 (N1)	170.000
pH 7,62 (N2)	183.750
pH 8,62 (N1)	165.000
pH 8,62 (N2)	171.259
<b>Setanta-dues hores</b>	
pH 6,62 (N1)	276.250
pH 6,62 (N2)	280.000
pH 7,62 (N1)	367.500
pH 7,62 (N2)	348.750
pH 8,62 (N1)	385.000
pH 8,62 (N2)	402.500

<b>U87-MG STEM</b>	
<b>pH extracel·lular</b>	<b>Nombre de cèl·lules</b>
<b>Vint-i-quatre hores</b>	
pH 7,64 (N1)	56.250
pH 7,64 (N2)	63.750
pH 8,64 (N1)	71.250
pH 8,64 (N2)	45.000
pH 9,64 (N1)	40.000
pH 9,64 (N2)	40.000
<b>Quaranta-vuit hores</b>	
pH 7,64 (N1)	55.000
pH 7,64 (N2)	48.750
pH 8,64 (N1)	33.750
pH 8,64 (N2)	28.750
pH 9,64 (N1)	23.750
pH 9,64 (N2)	22.500
<b>Setanta-dues hores</b>	
pH 7,64 (N1)	31.250
pH 7,64 (N2)	28.750
pH 8,64 (N1)	21.250
pH 8,64 (N2)	27.500
pH 9,64 (N1)	17.500
pH 9,64 (N2)	12.500



## ANÀLISI DELS RESULTATS

Per una banda, hem observat com en el cas de les cèl·lules FBS no hi ha hagut cap canvi representatiu al cap de vint-i-quatre hores. No obstant això, sí que hem observat canvis notoris després de quaranta-vuit i setanta-dues hores. De fet, en ambdós casos pH més àcid ha suposat un menor nombre de cèl·lules i un pH més bàsic no ha frenat la proliferació cel·lular.

Per altra banda, hem observat com en el cas de les cèl·lules stem ja hi ha hagut una clara diferència al cap de vint-i-quatre hores. El pH més bàsic ha suposat per aquestes una disminució del nombre de cèl·lules que s'ha mantingut a les quaranta-vuit i setanta-dues hores. En canvi, un el pH àcid ha suposat un augment en el nombre de cèl·lules respecte del



pH habitual que s'ha fet evident a les quaranta-vuit i setanta-dues hores. Així doncs, el pH àcid ha donat un medi òptim per a la proliferació cel·lular de les cèl·lules stem, però no de les FBS.

A més a més, hem pogut observar com la taxa de divisió cel·lular de les cèl·lules FBS és clarament superior a la de les cèl·lules stem, un tret característic d'aquestes que explica la seva resistència a les teràpies convencionals com la radioteràpia o la quimioteràpia. Hem vist també com un pH més àcid ha disminuït la proliferació en el cas de les cèl·lules FBS, mentre que l'ha augmentat en el cas de les stem. A més, hem observat que les cèl·lules FBS sembla que proliferin més en un pH bàsic, un tret curiós, ja que el comportament esperat hagués estat justament el contrari. En canvi, hem vist que en un pH bàsic, les cèl·lules stem es comporten diferent i la seva taxa de proliferació disminueix.

Les cèl·lules stem són les causants de la reincidència de la malaltia i, sovint, de la fallida dels tractaments contra aquesta. Així doncs, atacar-les s'ha convertit en l'objectiu de molts dels qui estudien possibles nous tractaments contra el càncer i els resultats obtinguts evidencien que el pH podria ser un mecanisme per actuar contra aquestes cèl·lules stem.

## **CONCLUSIONS DE LA PART PRÀCTICA**

Tot i que caldrien més experiments per comprovar les tendències observades en aquest on els resultats ja són les mitjanes de diversos casos, hem pogut extreure una sèrie de conclusions:

- La taxa de proliferació de les cèl·lules FBS és menor que la de les cèl·lules stem.
- Un pH més bàsic a l'habitual no altera la taxa de divisió cel·lular de les cèl·lules FBS.
- Un nivell de pH més àcid a l'habitual frena lleugerament la proliferació de les cèl·lules FBS.
- La taxa de divisió cel·lular de les cèl·lules stem augmenta en ambients més àcids.
- Un nivell més bàsic que l'habitual de pH disminueix la proliferació de les cèl·lules stem.

## CONCLUSIONS I AVALUACIÓ FINAL DEL TREBALL

---

Després de finalitzar el Treball de Recerca, intentaré explicar i avaluar breument els aspectes més destacables que es mostren al llarg de la memòria escrita. En primer lloc, seran analitzats els dos grans blocs en què es divideix el treball; la part teòrica i l'experimental, argumentant els objectius inicials i els resultats obtinguts. Per acabar, també analitzaré i comentaré de manera personal el què aquest treball ha significat per mi i els aspectes positius i negatius que m'emporto d'aquesta experiència.

En referència a la part teòrica, s'ha realitzat una petita aproximació al món del càncer, explicant les seves característiques fonamentals així com el seu origen i les seves possibles causes. Després d'aquesta introducció s'ha desenvolupat àmpliament el tema del glioblastoma i, especialment, els possibles tractaments contra aquest, l'apartat de més rellevància avui dia. A partir d'aquest eix central, s'ha aprofundit en les cèl·lules tumorals i les seves característiques distintives, així com en les cèl·lules mare tumorals, el possible origen de la malaltia i la seva recurrència. Aquesta part s'ha tancat amb una breu explicació del concepte de l'acidesa i l'escala del pH, necessària per a la comprensió de la part experimental del treball.

Per altra banda, s'ha realitzat un segon bloc, la part pràctica, basada en la comprovació dels possibles efectes de la variació del pH extracel·lular en la proliferació de les cèl·lules tumorals. Aquesta comprovació s'ha dut a terme en cèl·lules tumorals diferenciades, ja que constitueixen la major part del tumor i la capacitat d'eliminar-les, en el cas del glioblastoma, suposa l'eliminació també dels possibles símptomes de la malaltia. A més a més, s'han comprovat els efectes també en les cèl·lules mare tumorals, un punt a l'ordre del dia en el món de l'oncologia, ja que es considera que podrien ser les causants de la reincidència, la metàstasi i l'origen del càncer, així com la clau a l'hora de tractar-lo. S'han obtingut uns resultats que mostren clarament un tret característic de les cèl·lules tumorals, la seva capacitat de proliferar en un medi àcid provocat pel seu metabolisme alterat. També, s'ha observat una disminució en la proliferació de les cèl·lules mare tumorals en medis alcalins, que podria ser un tret a tenir en compte a l'hora de plantejar les teràpies contra aquestes.

Pel que fa a la meua experiència personal, puc dir que en general tots els aspectes que comentaré són positius i, és que, la realització d'aquest treball ha estat un procés costós però molt gratificant. En primer lloc, m'agradaria esmentar que la realització de la part teòrica, tot i ser la més pesada pel que fa al nombre d'hores invertides, m'ha aportat una gran quantitat de coneixements que són d'una gran rellevància avui dia i tenen, sota el meu parer, un gran interès. En segon lloc, voldria destacar que el fet d'haver pogut fer la part pràctica en un laboratori d'investigació científica professional ha estat sense cap mena de dubte, la millor experiència que m'emporto d'aquest treball. Això m'ha permès adquirir molts coneixements sobre processos i materials emprats en el laboratori així com la possibilitat d'analitzar el món de la recerca científica des de dins.

En resum, tot i que alguns apartats del Treball de Recerca han estat més difícils de desenvolupar en ésser temes d'actualitat, no aparèixer en llibres i estar únicament divulgats entre la comunitat científica, considero que la realització del treball m'ha aportat molts aspectes enriquidors i positius tant pel meu desenvolupament acadèmic com pel personal.

## BIBLIOGRAFIA

---

### PÀGINES WEB

- Hospital clínic de Barcelona. (2018). *Què és el càncer?* Recuperat de <https://www.clinicbarcelona.org/ca/asistencia/malalties/cancer/que-es> - [consulta 29.4.2021]
- Puente, J. i Velasco, G. (2019). *¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla?* Recuperat de <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla> - [consulta 1.5.2021]
- Generalitat de Catalunya. (2018). *El sistema limfàtic i l'LNH*. Recuperat de <https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer/tipus-de-cancer/limfoma-no-hodgkin-lnh/el-sistema-linfatic-i-lnh/> - [consulta 1.5.2021]
- Asociación Española Contra el Cáncer. *¿Qué es el cáncer?* Recuperat de <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/origen> - [consulta 11.6.2021]
- Cancer Research UK. (2019). *Causes of cancer and reducing your risk*. Recuperat de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/causes-of-cancer> - [consulta 11.6.2021]
- American Cancer Society. (2014). *Oncogenes and tumor suppressor genes*. Recuperat de <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html> - [consulta 11.6.2021]
- Mandal, A. (2019). *Cancer classification*. Recuperat de <https://www.news-medical.net/health/Cancer-Classification.aspx> - [consulta 12.6.2021]
- UC Health. (2021). *Glioblastoma*. Recuperat de <https://www.uhealth.com/en/conditions/glioblastoma> - [consulta 15.6.2021]
- Johnson, J. (2019). *What is glioblastoma? Everything you need to know*. Recuperat de <https://www.medicalnewstoday.com/articles/glioblastoma> - [consulta 15.6.2021]
- Cedars Sinai. (2021). *Glioblastoma Multiforme*. Recuperat de <https://www.cedars-sinai.org/health-library/diseases-and-conditions/g/glioblastoma-multiforme.html> - [consulta 15.6.2021]
- Farrar Stoakes, S. (2021). *Metodología adoptiva de la terapia del linfocito T*. Recuperat de [https://www.news-medical.net/health/Adoptive-T-Cell-Therapy-Methodology-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Adoptive-T-Cell-Therapy-Methodology-(Spanish).aspx) - [consulta 26.7.2021]
- Elizabeth Mason, L. (2020). *Cancer cells vs Normal cells*. Recuperat de <https://www.technologynetworks.com/cancer-research/articles/cancer-cells-vs-normal-cells-307366> - [consulta 3.8.2021]

Eldrige, L. (2021). *Cancer cells: How they start and characteristics*. Recuperat de <https://www.verywellhealth.com/what-are-cancer-cells-2248795> - [consulta 3.8.2021]

Khan Academy. *El cáncer y el ciclo celular*. Recuperat de <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/regulation-of-cell-cycle/a/cancer> - [consulta 8.8.2021]

## ARTICLES I ESTUDIS

Sociedad Española de Oncología Médica. (2020). *Las cifras del cáncer en España 2020*. Recuperat de [https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras\\_del\\_cancer\\_2020.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf) - [consulta 10.6.2021]

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P i Ellison DW. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131(6), 803-20. doi: [10.1007/s00401-016-1545-1](https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1) - [consulta 15.6.2021]

Karsy M, Gelbman M, Shah P, Balumbu O, Moy F, Arslan E. (2012). Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: review of morphological and molecular features. *Folia Neuropathologica*, 50(4), 301-321. doi: [10.5114/fin.2012.32361](https://doi.org/10.5114/fin.2012.32361) - [consulta 17.6.2021].

Miller, CR, i Perry, A. (2007). Glioblastoma: Morphologic and Molecular Genetic Diversity. *Arch Pathol Lab Med*, 131(3), 397-406. doi: [10.5858/2007-131-397-G](https://doi.org/10.5858/2007-131-397-G) - [consulta 7.7.2021]

Castañeda CA, Cascavila S, Orrego E, García-Corrochano P, Deza P, Heinike H, Castillo M, Belmar-López C, Ojeda L. (2015). Glioblastoma: análisis molecular y sus implicancias clínicas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 32(2), 316-325. Recuperat de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342015000200017](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000200017) - [consulta 14.7.2021]

Swanson KD, Lok E, Wong ET. (2016). An overview of alternating electric fields therapy for the treatment of malignant glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 16(1). doi: [10.1007/s11910-015-0606-5](https://doi.org/10.1007/s11910-015-0606-5) - [consulta 27.7.2021]

Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. (2017). Glioblastoma multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Current Medicinal Chemistry*, 24, 3002-3009. doi: [10.2174/0929867324666170516123206](https://doi.org/10.2174/0929867324666170516123206) - [consulta 29.7.2021]

Sánchez, C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. *Med. Clin. Condes*, 24(4), 553-562. doi: [10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X) - [consulta 5.8.2021]

Maria, V. Liberti, Jason W. Locasale. (2016). The Warburg Effect: How does it benefit cancer cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211-218. doi: [10.1016/j.tibs.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001) - [consulta 12.8.2021]

Herrera-González NE, Martínez-García F, Mejía-Jiménez E. (2015). El efecto Warburg: la mano derecha en el desarrollo del cáncer. *Rev Esp Med Quir*, 20(2), 171-177. Recuperat de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=59278> - [consulta 20.8.2021]

John B. Spillane, Michael A. Henderson (2007). Cancer stem cells: a review. *ANZ Journal of Surgery*, 77(6), 464-468. doi: [10.1111/j.1445-2197.2007.04096.x](https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.2007.04096.x) - [consulta 21.8.2021]

Zuoren Yu, Timothy G. Pestell, Michael P. Lisanti, Richard G. Pestell. (2012). Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(12), 2144-2151. doi: [10.1016/j.biocrel.2012.08.022](https://doi.org/10.1016/j.biocrel.2012.08.022) - [consulta 21.8.2021]

G.A. Pimentel-Parra, B. Murcia-Ordoñez. (2017). Células madre, una nueva alternativa médica. *Peinatología y Reproducción Humana*, 31(1), 28-33. doi: [10.1016/j.rprh.2017.10.013](https://doi.org/10.1016/j.rprh.2017.10.013) - [consulta 22.8.2021]

Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 7;100(1), 57-70. doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9) - [consulta 26.8.2021]

Justin D. Lathia, Stephen C. Mack, Erin E. Mulkearns-Hubert, Claudia L.L. Valentim, Jeremy N. Rich. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*, 29(12), 1203-1217. doi: [10.1101/gad.261982.115](https://doi.org/10.1101/gad.261982.115) - [consulta 30.8.2021]

## ALTRES

Rugnetta, M. (2008). Neural stem cell. *Encyclopedia Britannica*. Recuperat de <https://www.britannica.com/science/neural-stem-cell> - [consulta 20.8.2021]

Thouvenoy-Nitzan E. (2016). “What is Apoptosis?” The Apoptotic Pathways and the Caspase Cascade [vídeo]. Recuperat de <https://www.youtube.com/watch?v=-vmtK-bAC5E> - [consulta 30.7.2021]

Carrato Moñino, C. (2017). *Nuevo algoritmo molecular para la clasificación del glioblastoma: correlato con los perfiles de expresión génica* (Tesi doctoral). Recuperat de <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/405474/ccm1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y> - [consulta 18.6.2021]

Alazzouzi H. (2006). *La inestabilidad genómica en cáncer* (Tesi doctoral). Recuperat de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3560/ha1de1.pdf;jsessionid=727E43411BCB077E791A8E4C5D369565?sequence=1> - [consulta 25.7.2021]

Baba AI, Cătoi C. (2007). Tumor cell morphology, *Comparative oncology*. Recuperat de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/> - [consulta 7.8.2021]

## **ANNEX 1. MOLÈCULES RELLEVANTS ESMENTADES**

---

La isocitrat deshidrogenasa (IDH) és un enzim important en el catabolisme dels carbohidrats, ja que participa en el cicle de Krebs. La seva mutació implica una reducció de la seva activitat enzimàtica, fet que disminueix la degradació del factor induïble d'hipòxia (HIF) i, per tant, promou el creixement tumoral i l'angiogènesi. A més a més, la seva mutació altera la metilació de l'ADN i indueix així l'expressió d'oncògens i la inactivació de gens supressors de tumors.

La telomerasa transcriptasa inversa (TERT) és una subunitat catalítica de l'enzim telomerasa, el qual s'encarrega de reparar els telòmers que es desgasten amb cada divisió cel·lular. La mutació del promotor de la telomerasa transcriptasa inversa (pTERT) sol implicar una major expressió del gen en qüestió, fet que afavoreix la immortalitat pròpia de les cèl·lules tumorals.

La proteïna p53, també denominada la guardiana del genoma, és una proteïna supressora tumoral que, en els humans, és codificada pel gen TP53. Aquesta regula el cicle cel·lular i indueix l'apoptosi quan detecta errors irreparables en l'ADN de la cèl·lula. La mutació d'aquest gen, suposant una menor expressió de la p53 és present en molts càncers, ja que permet que les mutacions adquirides passin a les cèl·lules filles i, per tant, permet l'acumulació de mutacions que donen lloc al càncer.

L'ATRX és una proteïna que en els humans està codificada pel gen ATRX i ajuda a mantenir la integritat dels telòmers durant la síntesi d'ADN. Les seves mutacions s'associen al denominat allargament alternatiu dels telòmers, un dels mecanismes emprats per les cèl·lules tumorals per assegurar la seva immortalitat.

El receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) és una proteïna transmembrana i el receptor específic dels factors de creixement epidèrmics (EGF). La seva amplificació o mutació (EGFRvIII) podrien donar lloc a la seva activació constant i, per tant, a la divisió constant pròpia de les cèl·lules tumorals.

PTEN és un enzim que actua com un supressor tumoral a l'estar involucrat en la regulació del cicle cel·lular, prevenint el creixement i la divisió descontrolada de les cèl·lules. La seva mutació en el glioblastoma és freqüent, afavorint el creixement tumoral.

El factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) és un dels nombrosos factors de creixement que regulen el creixement i la divisió cel·lular. Aquest juga un paper significatiu en l'angiogènesi i la seva mutació la promou.

La neurofibromina 1 (NF1) és un gen en els humans que codifica una neurofibromina, les mutacions en la qual són capaces d'alterar el cicle cel·lular i promoure el creixement tumoral en certs càncers com el glioblastoma.

La metil guanina metil transferasa (MGMT) és una proteïna que reconeix i elimina lesions en l'ADN que consisteixen en la presència d'una guanina metilada. La metilació del promotor de



la metil guanina metil transferasa (pMGMT) redueix la concentració d'aquest enzim i augmenta la sensibilitat de les cèl·lules a la quimioteràpia.

L'antigen 4 del limfòcit T citotòxic (CTLA-4) és un receptor proteic situat a la membrana cel·lular dels limfòcits T que actua com a un regulador negatiu de l'activació d'aquests. Avui dia, ja hi ha fàrmacs que bloquegen la seva activitat i afavoreixen la resposta immunitària davant d'un càncer.

La e-cadherina és una proteïna transmembrana que juga un paper important dins l'adhesió de la cèl·lula, ja que forma unions adherents per unir les cèl·lules dins dels teixits. La manca d'aquestes o la seva alteració promou la manca d'adhesió de les cèl·lules tumorals i, per tant, la metastasi del càncer.

El factor de creixement transformant beta ( $TGF-\beta$ ) pertany a una família de factors de creixement que estan involucrats en processos cel·lulars com la proliferació cel·lular, l'angiogènesi o la diferenciació cel·lular. Aquesta molècula presenta també la capacitat d'ésser immunosupressora, així com les interleucines, un grup de citocines expressades pels glòbuls blancs.

La poli ADP ribosa polimerasa (PARP) és una proteïna que es troba al nucli de la cèl·lula encarregada d'iniciar una resposta cel·lular immediata davant danys en l'ADN induïts per químics o radiació. El seu bloqueig ha estat investigat com una possible millora dels efectes de la quimioteràpia en el glioblastoma.