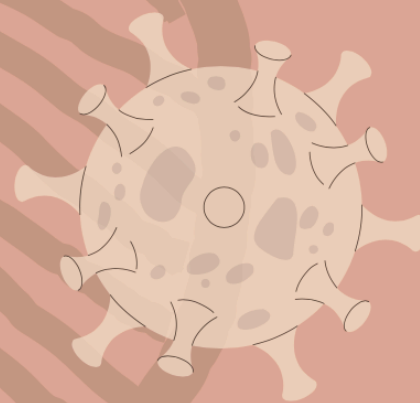
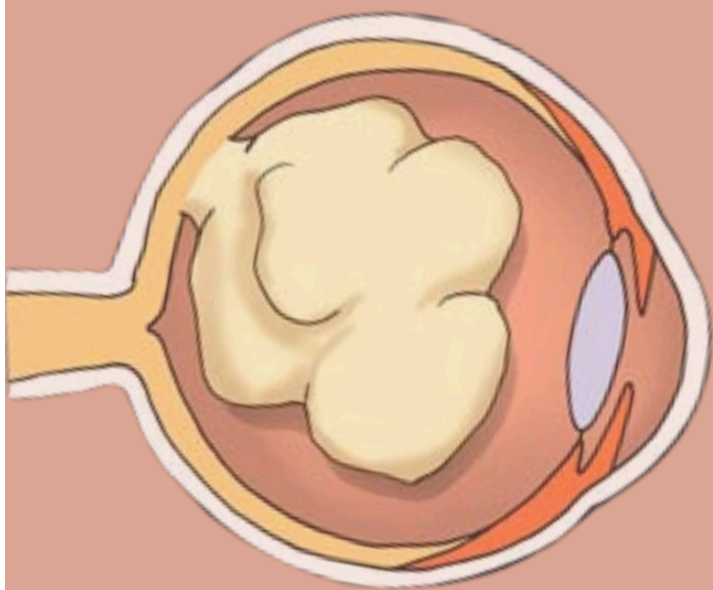


Modificació genètica d'un virus per al tractament del retinoblastoma



DESEMBRE 2021

ÍNDEX

1. ABSTRACT	pàg. 1
2. INTRODUCCIÓ	pàg. 3
3. HIPÒTESI	pàg. 6
4. OBJECTIUS	pàg. 7
5. METODOLOGIA	pàg. 8
6. HISTÒRIA DEL CÀNCER	pàg. 10
7. QUÈ ÉS EL CÀNCER?	pàg. 14
8. RETINOBLASTOMA	pàg. 17
8.1. Què és un retinoblastoma?.....	pàg. 17
8.2. Diagnòstic	pàg. 18
8.3. Tractaments convencionals.....	pàg. 19
9. TRACTAMENTS UTILITZATS	pàg. 21
9.1. Quimioteràpia.....	pàg. 21
9.1.1. Duració del tractament	pàg. 22
9.1.2. Preparació prèvia del pacient	pàg. 23
9.1.3. Tipus de quimioteràpia	pàg. 23
9.1.4. Eficàcia de la quimioteràpia	pàg. 24
9.1.5. Efectes secundaris de la quimioteràpia	pàg. 25
9.2. Radioteràpia.....	pàg. 26
9.2.1. Funcionament	pàg. 27
9.2.2. Administració	pàg. 27
9.2.3. Efectes secundaris de la radioteràpia	pàg. 31
9.2.4. Eficàcia i seguretat del tractament	pàg. 31
9.3. Cirugia.....	pàg. 32
9.3.1. Què és la cirugia oncològica?	pàg. 32
9.3.2. Tipus de cirurgia	pàg. 33
9.3.3. Tipus de cirurgia invasiva	pàg. 35
9.3.4. Tipus de cirurgia mínimament invasiva	pàg. 38
9.4. Trasplantament de cèl·lules.....	pàg. 40
9.4.1. Cèl·lules mare	pàg. 40
9.4.2. On i com s'obtenen les cèl·lules mare?	pàg. 41

9.5.	Teràpia Gènica.....	pàg. 43
9.5.1.	Mètodes	pàg. 44
10.	TERÀPIA GÈNICA.....	pàg. 46
10.1.	Història de la teràpia gènica.....	pàg. 46
10.2.	Arribada al pacient.....	pàg. 48
10.3.	Administració al pacient.....	pàg. 49
10.4.	Protocol inicial al pacient	pàg. 50
10.5.	Possibles efectes secundaris.....	pàg. 55
11.	VIRUS.....	pàg. 56
11.1.	Història del virus.....	pàg. 56
11.2.	Tipus de virus.....	pàg. 57
11.3.	Adenovirus oncolítics	pàg. 59
12.	TREBALL DE CAMP.....	pàg. 60
12.1.	VCN Bioscience com a empresa.....	pàg. 60
12.2.	Missió.....	pàg. 60
12.3.	Tecnologies	pàg. 61
12.4.	Hyaluronidase.....	pàg. 62
12.5.	VCN-01.....	pàg. 62
12.6.	Funcionament del virus	pàg. 65
12.6.1.	Albúmina	pàg. 66
12.6.2.	Immunoshift	pàg. 67
12.6.3.	T1 Bioselecció	pàg. 68
12.6.4.	VCN-01 en retinoblastoma	pàg. 69
12.7.	Laboratory experience at VCN Biosciences	pàg. 74
12.7.1.	Descongelació de cèl·lules.....	pàg. 74
12.7.2.	Extracció del plasmidi bacterià.....	pàg. 75
12.7.3.	Citotoxicitat.....	pàg. 77
13.	CONCLUSIONS	pàg. 82
14.	AGRAÏMENTS	pàg. 83
15.	BIBLIOGRAFIA	pàg. 85

1. ABSTRACT

Català

Avui dia, la teràpia gènica és un dels tractaments menys comuns, atès que és una de les tecnologies més innovadores fins ara. Aquesta teràpia es caracteritza per ser una tècnica experimental per tractar malalties mitjançant la modificació del material genètic del pacient. En aquest treball estudiem la modificació genètica d'un virus contra el retinoblastoma infantil, un càncer que afecta la retina. El nostre objectiu és investigar el procés i els caràcters que són modificats del virus per tal d'aconseguir-ne l'ús mèdic. Per poder assolir el nostre objectiu busquem i investiguem informació del funcionament dels virus utilitzats i de la manera com interactuen amb la cèl·lula. Per aprofundir vam obtenir l'ajuda de VCN bioscience, empresa que ens va mostrar alguns dels protocols i procediments que es duen a terme durant el procés de modificació. Finalment, aconseguim tots els objectius proposats, saber la manera la qual cal modificar el virus perquè faci la seva funció, descobrir els tipus de virus que cal fer servir i quins són els més eficaços. Arribant a la conclusió que les proteïnes E1F amb el gen RB1 són realment les que fan possible que el virus no es reproduïxi a les cèl·lules sanes i que tecnologies que s'usen com la hialuronidasa o l'albumina entre d'altres són essencials per poder dur a terme el tractament.

Castellano

Hoy en día, la terapia génica es uno de los tratamientos menos comunes, dado que es una de las tecnologías más innovadoras hasta el momento. Esta terapia se caracteriza por ser una técnica experimental para tratar enfermedades mediante la modificación genética del material genético del paciente. En este trabajo estudiamos, la modificación genética de un virus contra el retinoblastoma infantil, un cáncer que afecta a la retina. Nuestro objetivo es investigar el proceso y los caracteres que son modificados del virus para poder lograr su uso médico. Para poder lograr nuestro objetivo buscamos e investigamos información del funcionamiento de los virus utilizados y de la manera en la que interactúan con la

célula. Para profundizar obtuvimos la ayuda de VCN bioscience, empresa la cual nos mostró algunos de los protocolos y procedimientos que se llevan a cabo durante el proceso de modificación. Finalmente, logramos todos los objetivos propuestos, saber la manera la cual hay que modificar el virus para que haga su función, descubrir los tipos de virus que hay que usar y cuáles son los más eficaces. Llegando a la conclusión que las proteínas E1F con el gen RB1 son realmente las que hacen posible que el virus no se reproduzca en las células sanas y que tecnologías como la hialuronidasa o la albúmina entre otras son esenciales para poder llevar a cabo el tratamiento.

Anglès

Nowadays, gene therapy is one of the least common treatments, given that it is one of the most innovative technologies to date. This therapy is characterized as an experimental technique to treat diseases by genetic modification of the patient's genetic material. In this research project, we study the genetic modification of a virus against child retinoblastoma, a cancer that affects the retina. Our objective is to investigate the process and the characters that are modified in the virus in order to achieve its medical use. In order to achieve our objective, we searched for and investigated information on the functioning of the viruses used and the way in which they interact with the cell. In order to go deeper, we were assisted by VCN bioscience, a company that showed us some protocols and procedures that are carried out during the modification process. Finally, we achieved all the proposed objectives: to know the way in which the virus has to be modified to do its function, to find the types of virus to use and which are the most effective. We reach the conclusion that the E1F proteins with the RB1 gene are really the ones that make possible that the virus does not reproduce in healthy cells and that technologies such as hyaluronidase or albumin, among others, are essential to be able to carry out the treatment.

PARAULES CLAU: Medicina, Càncer, Retinoblastoma, Virus, VCN-01, Modificació genètica, E1A, E2F i Teràpia.

2. INTRODUCCIÓ

El càncer avui dia continua sent una de les principals causes de mort en el món. Segons les estadístiques en 2018 18,1 milions de persones van ser diagnosticades amb la malaltia i 9,5 milions de pacients van morir per càncer al món dels quals 500.000 eren nens i adolescents. A priori, no es pot ni prevenir ni curar, però la desigualtat econòmica entre països fa que això s'agreugi, dificultant la probabilitat de supervivència. Les dades mostren que els països de rendes altes, on la població sol disposar d'accés a serveis integrals, més del 80% dels nens afectats de càncer es curen, però en molts països de rendes mitjanes i baixes la taxa de curació és del 15% al 45%.

La teràpia gènica s'està mostrant en l'actualitat com una de les grans candidates per a adoptar el rol de teràpia convencional del futur. Obtenint grans resultats en els assajos clínics que s'estan duent a terme. Prenent com a precedent el recent resultat obtingut a l'Hospital Sant Joan de Déu de la mà de VCN bioscience els quals van aconseguir obtenir un meravellós resultat utilitzant aquesta tècnica contra un retinoblastoma.

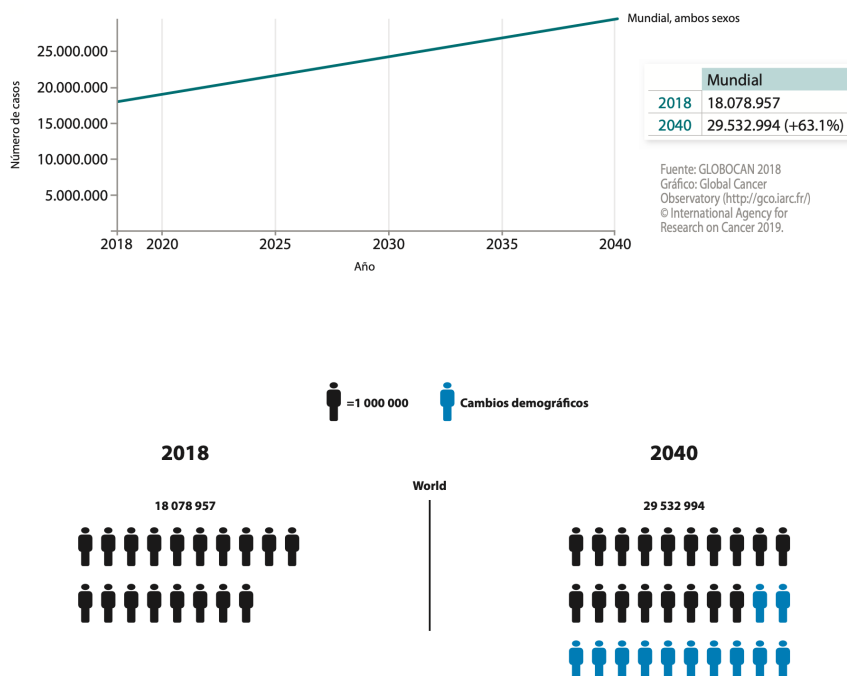


Figura 1: Incidència estimada de tumors en la població mundial per al període 2018-2040, ambdós sexes.

(Extret del National Geographic)

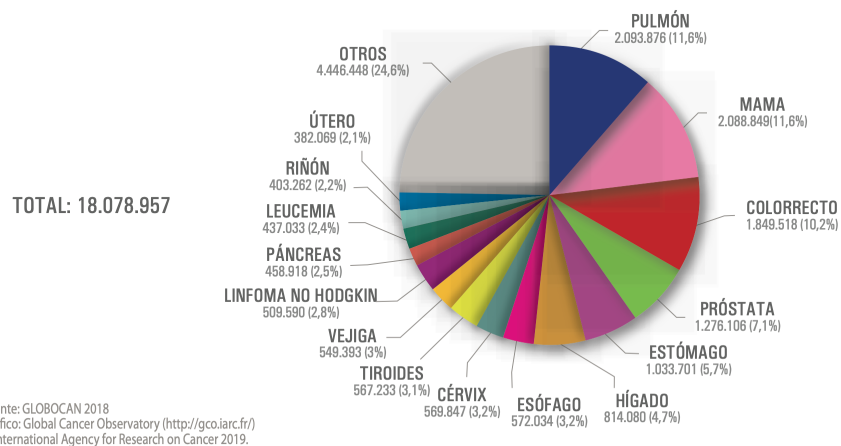


Figura 2: Tumors més freqüentment diagnosticats al món. Estimació per a l'any 2018, tots dos sexes.
<http://www.farmaciasantamaria.com/bloq/wp-content/uploads/2020/02/c%3%A1ncer.pna?x98370>

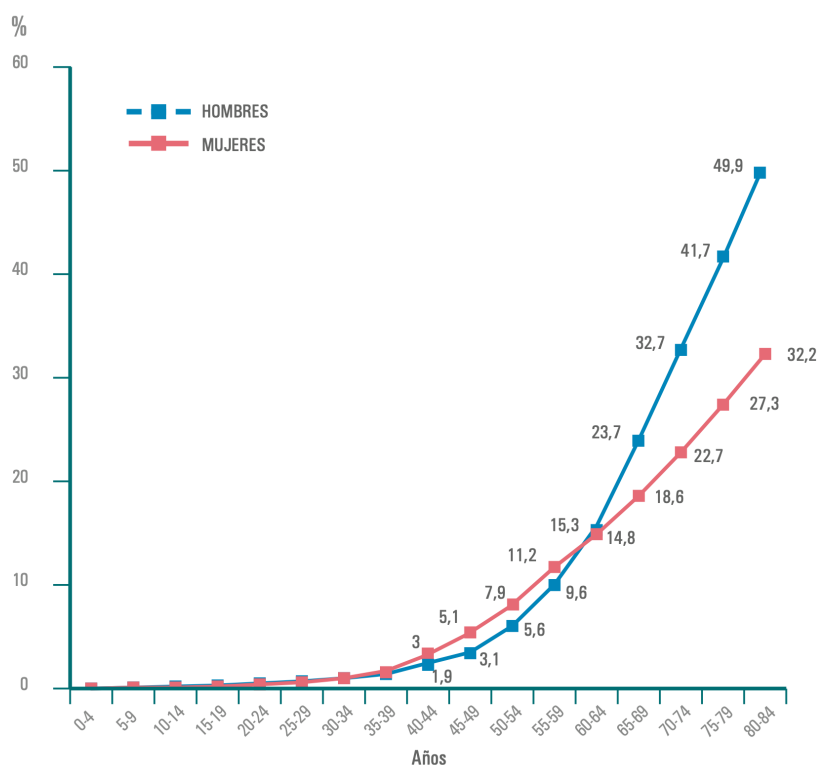


Figura 3: Probabilitat (%) de desenvolupar un càncer (exclosos els tumors cutanis no melanoma) per sexes a Espanya l'any 2020.
<https://www.doctologia.es/wp-content/uploads/2020/02/probabilidad-cancer-2020-espa%C3%B1a.png>

Aquestes diferències entre els dos sexes semblen relacionar-se amb l'exposició a diferents factors de risc (tant ambientals com endògens). Estudis recents suggereixen que les diferències hormonals podrien tenir un paper en la diferent reacció immunològica als tumors.

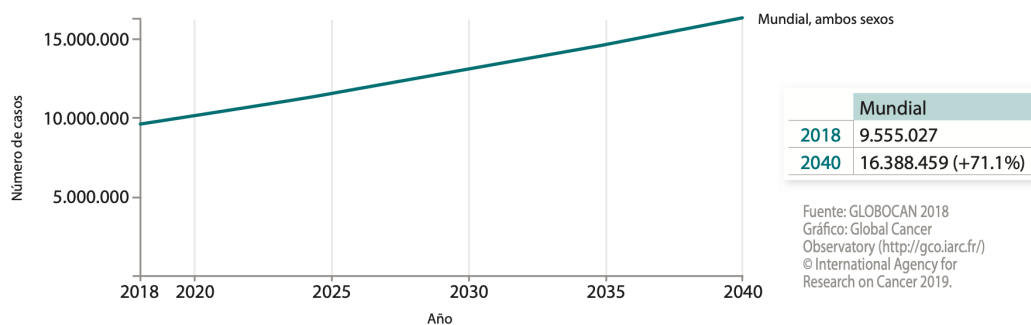


Figura 4: Nombre de defuncions per tumors en la població mundial per al període 2018-2040, ambdós sexes. (Extret del National Geographic Statistics)

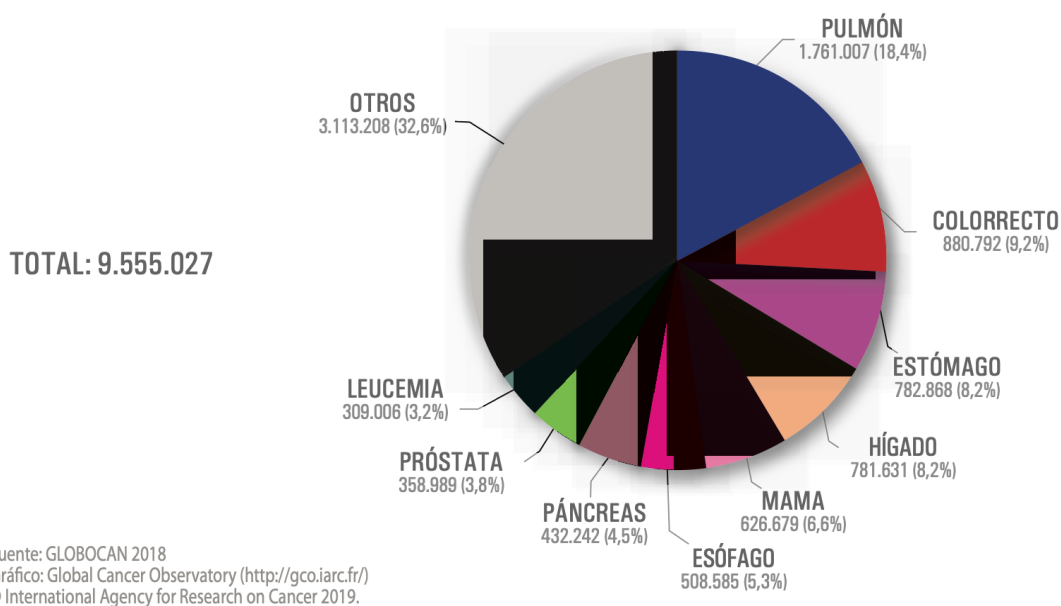


Figura 5: Estimació de el nombre de defuncions per tumors en el món en l'any 2018, tots dos sexes. (Extret del National Geographic Statistics)

3. HIPÒTESI

La teràpia gènica és la teràpia de futur per alguns tipus de càncer. Creiem que utilitzant aquest tipus de teràpia, utilitzant virus modificats genèticament serem capaços de curar pacients amb diferents tipus de càncer. Per tant, creiem que poden eliminar i acabar amb tumors en especial amb el retinoblastoma i més endavant si se segueix investigant, amb altres tipus de tumors, emprant com a principal cura aquest virus genèticament modificat en comptes d'altres tractaments més invasius i agressius.

4. OBJECTIUS

Conceptuals:

En l'àmbit conceptual, ens havíem plantejat com a objectius la investigació i aprenentatge sobre la nova teràpia gènica, que en aquests últims anys ha destacat per la seva innovació i resultats obtinguts. També hem volgut indagar en el procés de modificació genètic del virus i el seu funcionament. D'altra banda, per poder entendre la teràpia gènica hem volgut estudiar un cas recent de tractament de *Retinoblastoma infantil* a Sant Joan de Déu i com ha estat el procés de curació. Donat que el nostre interès en el camp de la medicina és gran, a escala procedimental ens ajudarà a entendre la manera d'actuació del sistema sanitari actual. A més n'ajudarà a veure la cooperació entre l'empresa privada i la pública. Durant el desenvolupament d'adquisició d'informació intentarem treballar: causes, efectes secundaris, com arriba al pacient, la inoculació...

Procedimentals:

Procedimentalment, vam començar amb algunes complicacions, ja que el nostre objectiu era posar-nos en contacte amb laboratoris i l'hospital Sant Joan de Déu per poder aconseguir la informació necessària per al nostre projecte. Però atès a la situació actual ens ha estat difícil contactar amb els centres. Finalment, hem aconseguit poder fer una estada al laboratori que va col·laborar amb l'hospital Sant Joan de Déu en el tractament contra el Retinoblastoma infantil per comprendre i especialitzar-nos més sobre la malaltia i com es desenvolupa la teràpia gènica.

Actitudinals:

Pel que fa a l'àmbit actitudinal, la motivació serà el més important, ja que serà un treball que realitzarem durant molt de temps. Per això hem escollit aquest tema, que ens motiva i agrada a totes tres. A més la cohesió de grup jugarà un fonamental paper per a obtenir el resultat desitjat. En tot moment serà de vital importància mantenir l'estil científic amb rigorositat.

5. METODOLOGIA

Investigació documental:

Ens hem documentat principalment a través d'internet, articles, investigacions recents, diverses plataformes científiques... A més a més hem adquirit més informació a través de llibres de text científics universitaris i algunes tesis doctorals. D'altra banda, hem rebut ajuda d'un actiu professional de laboratori que treballa diàriament en la modificació de virus.

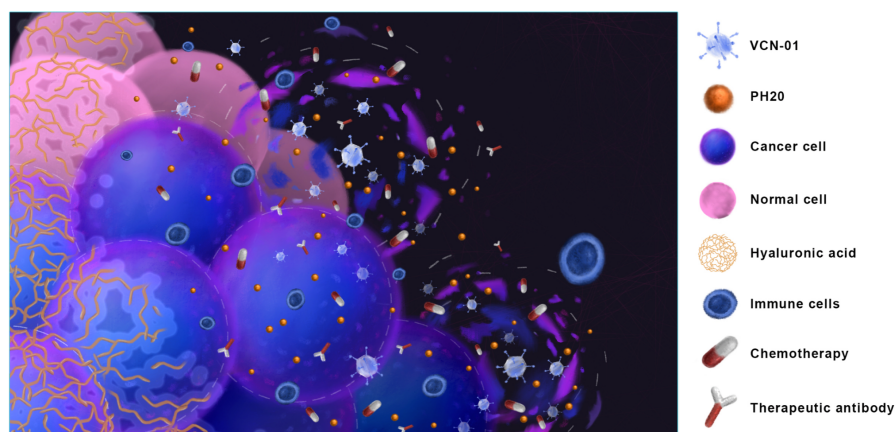


Figura 6: Simulació del funcionament del virus que utilitzen al laboratori VCN Biosciences. (Extret de VCN Bioscience web)

Experimentació i observació:

Gràcies a que vam trobar un article de Retinoblastoma infantil, vam poder recercar i trobar que l'Hospital de Sant Joan de Déu va treballar en col·laboració amb un laboratori privat, VCN bioscience. Ens vam posar en contacte amb la companyia, i gràcies a Miriam Bazan-Peregrino (PhD, R&D director de la corporació) ens va posar a disposició els seus laboratoris i ens va proporcionar tota la informació necessària en tot moment.

Treball de camp:

Gràcies al fet que VCN bioscience ens va donar la mà en forma d'ajuda, hem pogut anar als seus laboratoris i viure en persona alguns dels processos pels quals passen els virus i les cèl·lules abans que es duguin a terme els assajos clínics. El

fet d'haver presenciat part del desenvolupament del seu producte ens ha proporcionat un coneixement i enteniment de la modificació genètica del virus de manera teòrica. El fet d'haver assistit a un laboratori i veure com es desenvolupen els experiments ens ha aportat molta informació de la manera com treballen i l'estructura de les grans empreses i com es duu a terme el desenvolupament del producte.

6. HISTÒRIA DEL CÀNCER

Origen de la paraula "càncer":

Va ser Hipòcrates, qui és considerat com a pare de la medicina, el primer a donar-li nom a la malaltia que coneixem avui dia com càncer. Va ser el primer a utilitzar el terme "karkínos" per fer referència als carcinomes o úlceres malignes. La paraula del qual deriva de "cranc", donada la semblança de la duresa entre els tumors i una closca.

Origen del càncer:

Una recent troballa en The Lancet Oncology, ens mostra com fa 76 milions d'anys un dinosaure herbívor de l'espècie *Centrosaurus apertus*, comunament coneguda com a triceratops, caminava amb dificultat. Va morir al costat del seu ramat. A causa d'una malaltia que portava temps matant-li: osteosarcoma, càncer d'ossos, en un estat greu.

Algunes de les proves trobades, considerades com les primeres en humans, van ser els tumors fossilitzats de l'os trobats en les mòmies de l'Egipte antic i referències en els papirs.



Figura 7: Papir d'Edwin Smith adquirit l'any 1862. (<https://www.mediagraphic.com/pdfs/abc/bc-2005/bc051i.pdf>)

Un dels papirs més importants data de l'any 1600 aC, conegut com a Edwin Smith, on detallen els primers casos de càncer. Anomenat així pel comerciant que el va adquirir en 1862. El papir George Ebers, és un altre que destaca per ser considerat com un dels tractats mèdics més antics. En el qual recopila detalls de possibles casos de càncer de mama i úter, fent-nos saber que ja realitzaven algun tipus de

proves, apuntant les referències en els papirs. Descriuen 8 caixes de tumors o úlceres del pit que van ser tractades mitjançant la tècnica de cauterització¹¹.



Figura 8: Papir d'Ebers trobat Luxor l'any 1534 a.C. (<https://www.medigraphic.com/pdfs/abc/bc-2005/bc051i.pdf>)

Algunes de les primeres proves del càncer es troben entre tumors fossilitzats de l'os en mòmies humanes a l'Egipte antic, i les referències s'han trobat en manuscrits antics. Com és el cas del papir d'Ebers que va ser trobat a la necròpolis d'Assasif situada a la ciutat de Luxor datat l'any 1534 a.C. I el papir d'Edwin Smith que també va ser adquirit a la ciutat de Luxor el 1862.

Edat mitjana

La investigació d'aquesta malaltia i els seus tractaments i teràpies remunten a temps com l'edat mitjana. Tenint com a important exemple el conegut cas de Clara Jacobi. Una jove holandesa que patia el creixement anormal de teixit al coll, resultant ser un tumor. Va ser en el 1689 quan de manera rudimentària amb els coneixements limitats de l'època que van aconseguir extirpar-li l'enorme massa que li havia aparegut al coll.

Van ser 100 anys el que es va trigar a arribar a la comprensió completa d'una extirpació quirúrgica tumoral. Encara que el cas de la Clara Jacobi va ser una "excepció" en ser una gran massa visible.

Giovanni Battista Morgagni, rellevant anatomista, metge i patòleg⁶² que va regularitzar l'any 1761 la realització de les autòpsies per a trobar la causa de la mort i malalties de manera més exhaustiva, millorant el diagnòstic de moltes de les

malalties causants de la mort.

En John Hunter el famós anatomista i cirurgià escocès va ser qui va suggerir de manera innovadora l'extirpació del càncer dins l'organisme. Va ser el cirurgià escocès qui va plantejar l'extirpació tumoral d'aquelles masses que es desenvolupaven a l'interior de l'organisme. Ell va ser qui va proposar la cirurgia com a nou tractament contra el càncer.

Origen cel·lular

Rudolf Virchow, metge i polític alemany considerat el fundador de la patologia cel·lular, va ser el fundador de la base per a l'estudi patològic de càncers sota el microscopi. Virchow va ser qui va relacionar la patologia microscòpica a la malaltia. També va desenvolupar l'estudi dels teixits que van ser trets després de cirurgia. El patòleg⁶² podria també informar el cirurgià si l'operació havia fet desaparèixer totalment el càncer.

1r Guerra Mundial

Durant la Primera Guerra Mundial es va observar que centenars soldats exposats al gas mostassa patien greus efectes. Aquesta arma química utilitzada per l'exèrcit alemany provocava la supressió de medul·la òssia. La quimioteràpia va ser desenvolupada gràcies a la investigació del gas mostassa.

Poc després es va descobrir un gas mostassa de nitrogen que mantenia les condicions ideals per tal de lluitar contra el càncer dels ganglis limfàtics³³ anomenats limfoma.

Va ser l'any 1942 quan investigadors de la Universitat de Yale van comprovar que el gas usat pels nazis, compost emprat per a matar els jueus durant la Segona Guerra Mundial, posseeix la capacitat de modificar genèticament les nostres cèl·lules.

Nadó curat amb radioteràpia

Agafem com a exemple el cas de Gordon Isaacs, un nadó de set mesos

diagnosticat amb retinoblastoma doble (*tipus de tumor que afecta els teixits oculars de la retina*) en el seu cas, en ambdós ulls. Tot això tenia lloc l'any 1955, amb Henry Kaplan com a metge pioner en la radiobiologia. Va ser qui va suggerir a la mare Helen la utilització d'acceleradors lineals¹ per atacar els tumors del seu fill Gordon. El tractament va tenir una durada de sis setmanes, consistia en la sedació diària del nadó per obtenir la seva dosi diària. Aquest va ser el naixement de la radioteràpia.

7. QUÈ ÉS EL CÀNCER?

El càncer és una alteració biològica i genètica de les cèl·lules que componen els teixits dels nostres òrgans. Més concretament, una patologia en què les cèl·lules d'un teixit o òrgan perden la seva funció especialitzada i deixen de respondre als senyals que limiten el seu creixement. El creixement descontrolat de cèl·lules pot donar lloc a un tumor o nòdul. Quan es tracta d'una massa de teixit no necessari parlarem d'un tumor benigne si no envaeix ni destrueix altres òrgans. Aquest tipus, en general, sol extirpar-se sense complicacions i no es torna a reproduir. Si les cèl·lules que es divideixen descontroladament, a més muten, es produeix la carcinogènesi¹⁰. Llavors, poden adquirir la capacitat d'envair teixits i òrgans al voltant o de traslladar-se a través dels vasos sanguinis o el sistema limfàtic i proliferar⁶⁸ en altres parts de l'organisme el que es denomina metàstasi. En qualsevol d'aquests casos, el tumor serà maligne i estarem davant un càncer.

Podem detectar les neoplàsies⁵⁵ benignes o malignes. En el cas de les neoplàsies⁵⁵ benignes, són tumoracions en les quals el creixement no envaeix els òrgans o teixits adjacents, ni s'estén a altres zones del cos. Per contra, les neoplàsies⁵⁵ malignes, a més de presentar un creixement cel·lular no regulat es caracteritzen per la invasió dels teixits circumdants i metàstasi (*propagació a un altre òrgan diferent del d'origen per via limfàtica o sanguínia*).

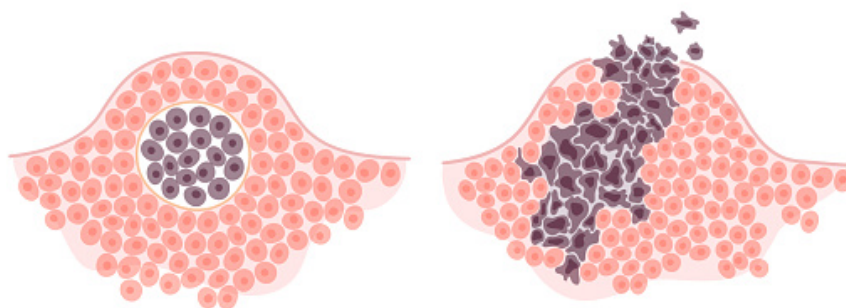


Figura 9: Diferència entre les neoplàsies⁵⁵ benignes i malignes. A l'esquerra la benigna i a la dreta la maligna.

(https://media.istockphoto.com/vectors/vector-illustration-of-malignant-and-benign-tumor-vector-id1168015787?k=20&m=1168015787&s=612x612&w=0&h=TKbqo6zKS6_80aA1iSfrEqkaWz04t-3VHawKEIOoZBU=)

Segons dades de l'Associació Espanyola Contra el Càncer, entre el 75 i 80% de les afeccions cancerígenes tenen la seva causa en agents externs que alteren

l'organisme. Solen ser hàbits de vida que poden modificar-se, com el consum de tabac i alcohol o la dieta, per a reduir les probabilitats d'emmalaltir. Cal tenir en compte que només un 5-10% de les afeccions oncològiques es deuen a la predisposició genètica. És a dir, al fet que s'heretin gens ja alterats que actuaran sobre les cèl·lules distorsionant la seva divisió. En aquests casos, hi ha més probabilitats i és necessari menys temps d'exposició a factors de risc perquè es desenvolupi un càncer.

Entorn del 20-25% restant de les malalties oncològiques té un origen desconegut. Es creu que són degudes a mutacions espontànies dels gens o l'acció d'agents carcinògens. Generalment, han d'estar en contacte durant anys amb l'organisme perquè es produeixin les mutacions cel·lulars necessàries (entre 4 i 6) que deriven en el càncer. D'aquí ve que, a major edat, augmenti el percentatge de malalts oncològics. Poden ser agents físics, químics o biològics:

- Els **agents físics** poden venir d'accidents nuclears, radiacions ionitzants (Raigs X), radiacions no ionitzants (raigs ultraviolats del sol)...
- Els **agents químics** són molècules que poden entrar en contacte amb l'individu en activitats industrials. Algunes substàncies cancerígenes són l'amiant, arsènic, benzè, cadmi, mercuri, níquel, plom, hidrocarburs clorats i naftilamina.
- Respecte als **agents biològics**, s'estima que el 18% d'afeccions oncològiques es deuen a infeccions persistents per virus, bacteris i paràsits. Això ocorre en el cas del virus del papil·loma humà i el càncer del coll uterí, en el del virus de l'hepatitis B i el càncer de fetge, així com en el de l'helicobacter pylori i el càncer d'estómac.

Les afectacions oncològiques, al principi, no causen cap dolor. Un diagnòstic amb temps, pot evitar el desenvolupament d'aquest. El càncer el podem detectar nosaltres mateixos amb aquests símptomes:

- Un engruiximent o embalum en qualsevol part del cos
- Una piga nova o canvi en l'aspecte d'algun preexistent
- Una nafra que no sana

- Ronquera o tos que no cessa
- Canvis en els seus hàbits urinaris o intestinals
- Malestar després de la ingestió d'aliments
- Dificultat per a empassar els aliments
- Augment o pèrdua de pes sense raó coneguda
- Sagnat o secreció inusual
- Feblesa o cansament

Existeixen molts tipus de càncer perquè no és una sola malaltia. El càncer pot originar-se en els pulmons, en el còlon o fins i tot en la sang. Els diferents tipus de càncer tenen algunes similituds, però són diferents en la manera en què creixen i es propaguen. Cada cas és únic. Cada any es diagnostiquen aproximadament a Espanya 20.000 casos de càncer de pulmó, 26.000 de càncer de mama i 25.000 de càncer de còlon.

Alteracions amb les quals s'origina el càncer:



Figura 10: Propietats que caracteritzen els tumors cancerosos proposades per R. A. Hanahan i R. A. Weinberg l'any 2000 amb les quatre més que aquests mateixos autors van afegir. (<https://cienciaaflora.org/quimica-medica/>)

8. RETINOBLASTOMA

8.1. Què és un retinoblastoma?

El retinoblastoma és un dels càncers més comuns en infants, afecta 1/15.000-1/30.000 de nounats vius i representa al voltant del 3% dels càncers pediàtrics.

El retinoblastoma és un càncer situat en l'ull, en la retina immadura. Comença en la retina, a la capa de cèl·lules nervioses que recobreix la part posterior de l'ull. Ocorre quan les cèl·lules nervioses en la retina creixen en grandària i quantitat. Les cèl·lules, eventualment, formen un tumor. En general, les cèl·lules solen disseminar-se en l'ull i al voltant d'aquest. Encara que també poden propagar-se cap a altres parts del cos, incloent-hi el cervell i la columna vertebral.

El retinoblastoma és un tipus de càncer que pot ser hereditari. El retinoblastoma s'associa amb una mutació genètica que passa en totes les cèl·lules de l'organisme, es coneix com a retinoblastoma germinal, la seva herència és autosòmica dominant. Segons les estadístiques i estudis es parla que al voltant d'un 25% dels pacients tenen la malaltia bilateral hereditària (pare i mare), un 15% dels pacients tenen la malaltia unilateral hereditària (pare o mare) i un 60 % tenen l'etiologia esporàdica en el 60% dels casos.

El retinoblastoma hereditari és causat per canvis en un gen conegut com a RB1. Els gens contenen informació important que s'indica a les cèl·lules del nostre cos com han de funcionar.

El gen RB1 controla la forma en què les cèl·lules creixen i es divideixen. Una de les seves principals funcions és prevenir la formació de tumors, en particular de retinoblastoma. Normalment, les seves cèl·lules contenen dues còpies funcionals de RB1. Una és heretada de la seva mare i l'altra, del seu pare.

La presència de retinoblastoma ens mostra una simptomatologia que podria passar desapercebuda. En general, els pacients presenten leucocòria (*reflex blanc en la pupil·la*) o estrabisme. Existeix una petita part dels pacients que tenen inflamacions oculars o la seva vista es veu afectada. Aquest tipus de càncer es pot percebre per

les sembres tumorals al vitri, on es pot observar a la retina múltiples reflexos de color gris-blanquinós.

En escasses ocasions, el càncer una vegada disseminat pel nervi òptic o via hemàtica causa dolor ossi local, cefalea (mal de cap), anorèxia o vòmits.



Figura 11: Leucocòria de l'ull dret indicant la presència de tumor. (<https://es.wikipedia.org/wiki/Retinoblastoma>)

8.2. Diagnòstic

En cas que existeixi una sospita que es pugui donar aquest diagnòstic, s'ha de dur a terme un exhaustiu examen ocular de tots dos ulls mitjançant oftalmoscòpia indirecta, amb la pupil·la dilatada i el pacient sedat.

L'ecografia, Tc⁷³ o RM orbitàries⁷¹ acostumen a ser el diagnòstic de confirmació de neuroblastomes. Gairebé tots els càncers poden ser detectats mitjançant TC⁷³ pel fet que es pot detectar la calcificació d'aquest. En canvi, en el cas que el nervi òptic tingui un aspecte anormal durant l'oftalmoscòpia, l'opció més encertada es tractarà de la RM per a descobrir la grandària del càncer al nervi o coroides.

En el cas que es cregui que existeix un perill coroidal extens, serà necessària la punció lumbar i ressonància magnètica cerebral per a detectar la metàstasi. Encara així per precaució aquells pacients que tinguin simptomatologia òssia⁷², encara que sigui poc comuna, se'ls avaluarà de la medul·la òssia i una gammagrafia òssia³².

En aquells casos en els quals els pacients nounats tinguin antecedents familiars, hauran de ser examinats per un oftalmòleg i cada quatre mesos fins al compliment dels quatre anys. De la mateixa manera ells i els pares hauran de ser sotmesos a una recerca genètica, on s'identificarà la línia germinal per a investigar la mutació. Si en els estudis realitzats s'identifica la mutació del gen, s'haurà de realitzar els mateixos estudis genètics i exploració oftalmològica regular. Una de les tècniques de gran efectivitat per a detectar aquells pacients portadors asimptomàtics són les sondes de DNA recombinant.

8.3. Tractaments convencionals

El tractament del retinoblastoma es basa en el tipus de càncer que presenta el pacient en qüestió. Existeixen dos tipus de càncer l'unilateral i el bilateral. L'unilateral es caracteritza per afectar un sol globus ocular mentre que el bilateral afecta a tots dos. En tot moment, l'objectiu principal del tractament es concentra en la curació del càncer, i com a objectiu secundari la preservació més gran de visió possible.

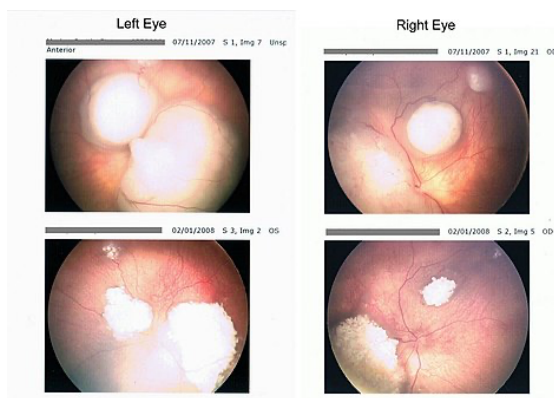


Figura 12: Tumors del retinoblastoma presos amb un "retinoscan" abans i durant la quimioteràpia.

(<https://es.wikipedia.org/wiki/Retinoblastoma>)

Quan es tracta d'un càncer unilateral avançat s'acostuma a tractar amb la tècnica de l'enucleació²⁴.

L'enucleació²⁴ consisteix en l'extirpació completa del globus ocular preservant els continguts orbitaris: músculs, parpelles, glàndula lacrimal.

En canvi, la varietat de tractaments per a un càncer bilateral és bastant més àmplia comptant amb fins a 6 diferents teràpies: fotocoagulació, quimioteràpia intraarterial o enucleació²⁴ unilateral amb fotocoagulació, crioteràpia, irradiació de l'altre ull o quimioteràpia sistèmica.

Fotocoagulació: Es tracta d'una tècnica utilitzada en malalties retinals, la qual consisteix en la generació d'una cicatriu a la retina mitjançant una cremada terapèutica realitzada amb un làser. La cicatriu obtinguda permetrà detenir la reproducció d'altres malalties retinals.

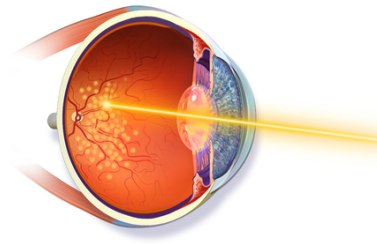


Figura 13: Procediment de fotocoagulació

https://www.wikiwand.com/ca/Fotocoagulació_retina

)

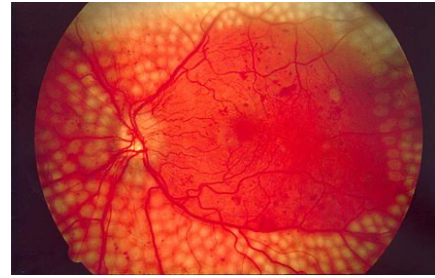


Figura 14: Fons d'ull que mostra les cicatrius dels molts impactes de fotocoagulació en un pacient amb retinopatia diabètica

https://www.wikiwand.com/ca/Fotocoagulació_retinal

Quimioteràpia intraarterial: El tractament consisteix en la subministració directa de la medicació en l'artèria principal que abasteix de sang al tumor maligne.

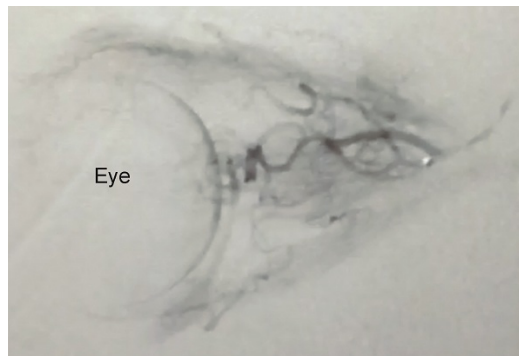


Figura 15: Vista sagital de la fluoroscòpia durant el procediment intraarterial. (Extreta d'una tesis doctoral)

Quimioteràpia sistèmica: El tractament consisteix en la subministració de la medicació injectada a una vena o subministrada a via oral. La medicació passarà per tot el torrent sanguini de l'organisme.

Crioteràpia: És l'aplicació de fred a una superfície, produint una destrucció local del teixit que ha estat en contacte de manera eficaç i controlada. En l'àmbit microscòpic provoca la ruptura de les membranes cel·lulars, desnaturalitza les lipoproteïnes i produeix alteracions metabòliques.

9. TRACTAMENTS UTILITZATS

9.1. Quimioteràpia:

La quimioteràpia és un conjunt de fàrmacs que s'utilitza per destruir cèl·lules. Actua evitant que aquestes cèl·lules creixin i es divideixin en més cèl·lules canceroses. La quimioteràpia té major efecte en les cèl·lules canceroses que en les normals, ja que les canceroses solen créixer i dividir-se més ràpid. Però aquesta teràpia en ser tan forta i invasiva pot atacar i afectar també a les cèl·lules normals. Aquesta té efectes secundaris en major o menor mesura perquè actuen en les cèl·lules malignes i en les sanes, indistintament. Els tumors malignes es caracteritzen perquè les seves cèl·lules estan alterades, modificant el mecanisme habitual de divisió, començant a dividir-se descontroladament i envair i afectar els òrgans veïns i a distància.

El tractament quimioteràpic està destinat a eliminar les cèl·lules mentre estan en procés de divisió; com més gran sigui la velocitat de divisió de les cèl·lules, més sensibles seran al tractament. Els diferents agents quimioteràpics actuen parant el cicle de vida de les cèl·lules en les diferents fases, generant un efecte cito-tòxic que frena la replicació cel·lular i provoca la mort de la cèl·lula. A mesura que passa el temps, el tumor disminueix de mida gràcies a l'ús d'aquests fàrmacs. En els casos de càncer de mama, el tractament de quimioteràpia se sol iniciar després d'una intervenció quirúrgica com a tractament complementari, per prevenir metàstasi.

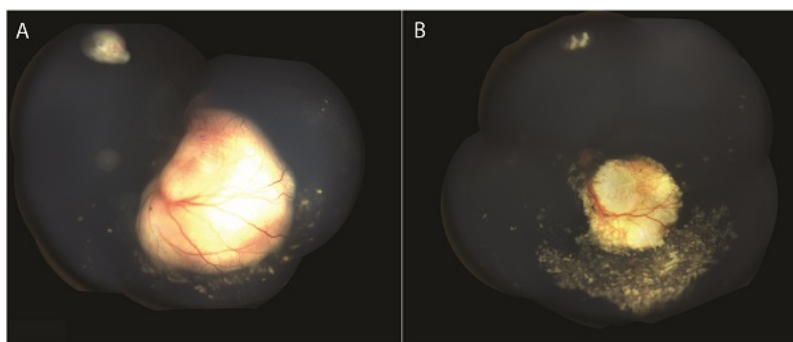


Figura 16: Fotografies del fons de l'ull abans (A) i després (B) del tractament per a retinoblastoma amb quimioteràpia intraarterial. (Extret d'Asociació Uruguaya d'oftalmòlegs)

9.1.1. Duració del tractament

La durada del tractament depèn del tipus de càncer que pateixi el pacient i la medicació que se li subministri; també entra en joc si el càncer està localitzat, localment avançat o disseminat. Si està localment avançat, se sol aplicar el tractament durant dos mesos, després se sol operar i després es donen tres o quatre mesos més de quimioteràpia. Si està disseminat, la quimioteràpia es dona mentre segueixi la malaltia i el pacient ho toleri. La quimioteràpia se sol administrar per via intravenosa.

Management Guidelines for Childhood Screening for Retinoblastoma Families									
Risk Category	% risk	Eye examination schedule based upon age of unaffected child							
		Birth to 8 weeks*	>8 weeks to 12 weeks	>3 months to 12 months	>12 months to 24 months	>24 months to 36 months	>36 months to 48 months	>48 months to 60 months	5-7 years
High Risk	> 7.5	Every 2-4 weeks	Monthly	Every 2 months	Every 3 months	Every 4 months	Every 6 months	Every 6 months	Every 6 months
Intermediate Risk	1 - 7.5	Monthly	Every 2 months	Every 3 months	Every 4-6 months	Every 6 months	Every 6 months	Every 6 months	Every 6 months
Low Risk	< 1	Monthly	Every 3 months	Every 4 months	Every 6 months	Every 6 months	Annually	Annually	Annually
General population	0.007	Screening with pediatrician							
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 10px; background-color: #c6e0b4; border: 1px solid black;"></div> Non-sedated office examination preferred by most centers <div style="width: 15px; height: 10px; background-color: #a6c9ec; border: 1px solid black;"></div> Examination under anesthesia preferred by most centers </div>							

Figura 17: Pautes d'abordatge per als exàmens de detecció de retinoblastoma de sortida en nens. Els programes escrits són pautes generals que reflecteixen una programació d'exàmens quan no s'observen lesions o indicis preocupants. És possible que sigui apropiat examinar alguns nens de manera més freqüent. Les decisions sobre els mètodes d'exploració, l'examen amb anestèsia de sortida (EUA) versus l'examen sense sedació al consultori, són complexes i és millor prendre les decisions després d'una conversa amb la família del pacient. Es reflecteix la preferència de la majoria dels centres mèdics que van participar en la formulació d'aquesta declaració per consens, però és possible que determinats centres decideixin sobre les directrius a partir dels recursos disponibles i la preferència dels professionals de la salut experts. És molt recomanable l'ús dels EUA per a qualsevol nen que no es pugui sotmetre a un examen al consultori que permeti examinar tota la retina. <https://www.researchgate.net/profile/Brenda-Gallie/publication/320492435/figure/fig3/AS:552948963790848@150884471440/6/Management-guidelines-for-childhood-screening-for-retinoblastoma-The-presented-schedules.png>

La teràpia se subministra en diversos cicles combinats amb períodes de descans i la seva durada dependrà del medicament utilitzat i del pacient. Per no punxar repetidament, se li implanta al pacient un dispositiu porta-cath o reservori, que és un disc de metall o plàstic rodó que s'instal·la en una vena central amb un calibre gruixut, subministrant el medicament directament al torrent sanguini. Sol col·locar-se en llocs discrets com el tòrax o el braç. Aquest porta-cath es retira quan el pacient acaba el tractament. Aquest reservori es col·loca en una intervenció quirúrgica breu, generalment amb anestèsia local.

9.1.2. Preparació prèvia del pacient

Estar ben nodrit és fonamental, a més d'evitar una sèrie de fàrmacs que poden ocasionar efectes adversos en l'organisme si es prenen mentre s'està sotmetent a un tractament de quimioteràpia. A més és important que el pacient entengui el tractament al qual s'està sotmetent, la seva durada aproximada i quan tindrà lloc, perquè pugui modificar correctament les seves rutines diàries i amollar-se a les circumstàncies".

9.1.3. Tipus de quimioteràpia

La quimioteràpia sol combinar-se amb la cirurgia i altres tècniques com la radioteràpia per poder abordar d'aquesta manera la malaltia amb més eficàcia. La teràpia pot presentar diverses tipologies segons diversos factors.

Segons la finalitat de l'administració:

Quimioteràpia adjuvant: Sol administrar després d'un tractament principal, generalment una intervenció quirúrgica. Aquest procediment sol ser l'habitual per a tumors com el de mama o el càncer de còlon.

Quimioteràpia neoadjuvant: S'administra abans del tractament principal de cirurgia o radioteràpia per avaluar els efectes d'aquest tractament. Pot disminuir l'estadi tumoral i millorar els resultats dels tractaments posteriors.

Quimioteràpia d'inducció o conversió: S'usa abans de qualsevol altre tractament de la malaltia amb l'objectiu d'aconseguir que el tumor sigui operable o reduir la quantitat d'aquesta patologia.

Radioquimioteràpia concomitant: Se sol utilitzar al mateix temps que la radioteràpia per augmentar els efectes de la radiació emprada i potenciar-la.

Quimioteràpia paliativa: En pacients que ja no hagin de ser intervinguts quirúrgicament per l'existència de metàstasi. En aquest cas la finalitat de la quimioteràpia ja no és curativa sinó reduir efectes de la patologia.

Segons la manera d'administració:

Monoteràpia: Se subministra un sol fàrmac al pacient.

Poliqumioteràpia: Solen administrar diversos fàrmacs amb diferents mecanismes d'acció per reduir d'aquesta manera les quantitats de cada medicament emprat.

Poliqumioteràpia combinada: S'administren diversos fàrmacs de forma combinada.

La quimioteràpia se sol administrar per via intravenosa. De vegades, per evitar haver de punxar al pacient cada vegada que se li subministra, s'instal·la un mecanisme porta-cath. Es pot subministra la quimioteràpia al pacient via oral, que no implica la reducció de la toxicitat. També es pot aplicar quimioteràpia regional, que està indicada per augmentar la incidència en una àrea determinada. Els tipus més comuns de quimioteràpia regional són:

- Intracavitària.
- Intraarterial.

9.1.4. Eficàcia de la quimioteràpia

"El tractament de quimioteràpia és molt eficaç per tractar el càncer en humans quan s'utilitza de forma preventiva, quan s'utilitza per evitar metàstasi i en pacients d'alt risc de malaltia micrometàstica". Hi ha alguns tumors que, encara que estiguin disseminats, es poden arribar a curar amb la quimioteràpia com passa amb els limfomes, els tumors de testicle o el càncer d'ovari germinal. Hi ha altres tumors que ja s'han disseminat i que la quimioteràpia el que fa és induir millora, en alguns casos per augmentar la possibilitat d'operar el tumor i extreure'l.

En cures pal·liatives, aquest tractament busca bàsicament intentar estalviar patiments als malalts de càncer. Si el tumor està oprimint un nervi, aconsegueix que es redueixi la mida i generi menys dolor.

9.1.5. Efectes secundaris de la quimioteràpia

Els fàrmacs utilitzats en el tractament de quimioteràpia es denominen agents biològics diana-específics i aquests actuen directament sobre les proteïnes i els

mecanismes usats en el creixement de les cèl·lules afectades pel càncer. Els efectes secundaris més freqüents són:

1. Alteracions en l'aparell digestiu:

Nàusees i vòmits: Apareixen habitualment una o dues hores després de l'administració del fàrmac.

Diarrea: és un efecte secundari freqüent, a causa de l'alteració de cèl·lules que componen l'intestí. Aquestes deixen d'absorbir aigua i nutrients ocasionant diarrea.

Restrenyiment: la quimioteràpia, juntament amb la reducció de l'activitat física i la variació en l'alimentació, pot ocasionar aquest restrenyiment.

2. Alteracions en la percepció dels aliments:

S'ocasiona pel dany del tractament sobre les papil·les gustatives, que es tradueix en una reducció del sabor dels menjars o percepció d'un sabor amarg o metàl·lic. Aquesta transformació sol anar acompanyada d'una falta de gana i consegüentment de pes.

3. Alteracions de la medul·la òssia:

Es tradueix en una disminució dels glòbuls vermells i desemboca a anèmia. Per intentar millorar aquesta situació és aconsellable descansar correctament, evitar grans esforços i portar una dieta sana i equilibrada.

4. Alteracions de cabells, ungles i pell:

Alopècia: Caiguda de cabells és una conseqüència bastant freqüent en tractaments de quimioteràpia. Sol caure en diversos cicles, encara que també pot succeir en el primer cicle.

Canvis en les ungles: S'enfosqueixen i es tornen més fràgils.

Pell: Solen aparèixer picors, eritemes, descamació i sequedat.

5. Efectes en la fertilitat:

La quimioteràpia pot ocasionar infertilitat en dones en edat reproductora. No tots els medicaments citotòxics emprats en quimioteràpia afecten de la mateixa manera a l'aparell reproductor femení i la seva funció depèn de l'edat de la dona. Com més gran sigui la dona, més possibilitats que s'avanci la menopausa. La infertilitat també pot donar-se en homes, ja que es dona en un 25-30 % dels casos en ambdós sexes. En homes, la capacitat de producció d'espermatozoides es pot veure disminuïda en alguns casos, generant infertilitat ocasional o permanent. Tant per homes com per dones, hi ha alternatives per poder conservar la capacitat reproductora:

- Congelació del teixit ovàric en nenes.
- Congelació o vitrificació d'òvuls.
- Congelació d'embrions ja fecundats.
- Congelació d'esperma
- Maduració d'òvuls en el laboratori.

9.2. Radioteràpia:

La radioteràpia o també anomenada teràpia de radiació és una aplicació mèdica freqüentment utilitzada com a tractament contra el càncer. És l'aplicació mèdica d'altres dosis de radiació, sigui en forma de raigs X o partícules amb alta potència per aconseguir la destrucció de les cèl·lules canceroses i retardar el creixement tumoral, al mateix temps que limita el dany al teixit sa.

Aquest tipus de tractament acostuma a ser recomanat pels doctors com a primera opció contra el càncer. Encara que també es pot aplicar com a teràpia adjuvant⁷⁵ de tractaments quirúrgics o de teràpies més utilitzades com la quimioteràpia. Atacant a les cèl·lules canceroses que encara queden del tractament previ, incrementant l'efectivitat i evitant la recurrència de la malaltia.

La utilització d'aquesta teràpia dependrà de l'etapa, el tipus de càncer i altres problemes de salut que pugui tenir el pacient.

9.2.1. Funcionament

Les cèl·lules canceroses tenen la característica de créixer i dividir-se amb més velocitat que la majoria de cèl·lules sanes. Amb aquest tractament, la radiació el

que fa és actuar de manera directa sobre l'ADN que es troba a l'interior del nucli cel·lular produint petites fractures. Aquestes fractures causades per la radiació eviten el creixement i la divisió de les cèl·lules tumorals. Quan les cèl·lules danyades moren, es descomponen i el cos les elimina.

La radioteràpia no actua de manera immediata sobre les cèl·lules malignes. Es requereixen dies o inclús setmanes de tractament abans que l'ADN estigui danyat de manera òptima per destruir-les. Després, aquestes continuen morint durant les setmanes i mesos posteriors a la finalització del tractament.

9.2.2. Administració

Existeixen dos tractaments de radioteràpies principals; de feix extern i intern.

Per ser tractat amb un o un altre, hi ha molts factors que influeixen:

- El tipus de càncer
- La mida del tumor
- Proximitat del tumor als teixits normals sensibles a la radiació
- La salut general del pacient i el seu historial mèdic
- Estudi de la possibilitat d'altres tractaments adjuvants pel càncer

Feix extern

La radioteràpia de feix extern és la més freqüent, consisteix en una màquina que dirigeix els raigs d'alta energia des de l'exterior del cos a dins del tumor. La màquina en qüestió pot tractar grans àrees del cos.

L'accelerador lineal o també anomenat *linac* és la màquina que crea el feix de radiació per al tractament per raigs X o fotons. Es tracta d'un programa informàtic el què ajusta segons la teràpia la mida i forma del feix, això ens permet una major precisió a l'hora de tractar el tumor evitant produir danys als teixits sans que envolten les cèl·lules canceroses.

Aquest procediment acostuma a ser administrat cada dia, en alguns casos dues dosis diàries, durant diverses setmanes. Aquest tipus de tractament s'administra de manera ambulatoria en centres de tractaments o hospitals. En casos com càncers d'encèfal o coll s'utilitzen suports anatòmics permetent la immobilització de les zones.

Tots els pacients que són tractats amb radioteràpia de feix extern no conserven residus materials de radiació i no han de seguir cap mena de precaució de seguretat a la llar.

Radioteràpia conformacional tridimensional (3D):

Mitjançant altres tècniques com la tomografia computaritzada (TC⁷³) o la ressonància magnètica (RM), es generen imatges detallades 3D del càncer a tractar. L'equip farà ús d'aquestes imatges obtingudes per precisar el tractament de radioteràpia el màxim possible. Això acostuma a significar que les dosis de radioteràpia utilitzades puguin ser majors de manera més segura i reduir el teixit sa que pugui ser afectat. De la mateixa manera disminueix els possibles efectes secundaris. Com és el cas de sequedat a la boca en càncers de cap i coll, amb aquest tipus de teràpia es redueix el teixit danyat disminuint la sequedat.

Radioteràpia d'intensitat modulada (IMRT, Intensity-modulated radiation therapy):

A diferència de la radioteràpia conformacional 3D, l'IMRT és més complexa donat que la intensitat del feix de radiació varia. L'IMRT d'una manera encara molt més precisa ataca el teixit cancerós i evitant el teixit sa.

Teràpia de feix de protons:

La característica principal d'aquesta teràpia és la utilització de protons, substituïdors dels raigs X. Són partícules de càrrega positiva que utilitzats amb altes potències poden destruir cèl·lules canceroses. Els protons es dirigeixen directament al tumor aportant la dosi específica de radioteràpia. El que diferencia aquesta teràpia de les tradicionals de raigs X, és la seva dosi de radiació que roman a la zona limitada amb els teixits sans. Actualment, no és una teràpia a l'abast de tothom donat que és relativament nova i requereix uns aparells especialitzats que no estan disponibles en tots els centres de salut.

Radioteràpia guiada per imatges (IGRT, Image-guided radiation therapy):

Aquesta radioteràpia utilitza un seguiment diari d'imatges de camp de tractament per a confirmar en tot moment la posició del pacient i així garantir que el blanc estigui en el camp. En tot moment aquestes imatges són comparades de forma

diària amb les prèvies emprades per a la planificació del tractament. Aquest mètode permet que el metge redueixi en tot moment els camps de tractament del pacient. Donada aquesta possibilitat dona l'avantatge de millorar l'orientació tumoral⁶⁰ i el mal causat al teixit sa.

Radioteràpia estereostàtica:

Aquest tractament permet l'aplicació d'una dosi alta i precisa de radiació en una petita zona del tumor. En tot moment el pacient ha de romandre immòbil per tal d'evitar tractar una zona sana. Aquesta teràpia s'acostuma a administrar com a únic tractament o menys de 10 sessions. Segons el cas a tractar pot necessitar més d'un cicle de radioteràpia esterostàtica.

Radioteràpia interna. Braquiteràpia o també coneguda com a radioteràpia interna implica que la seva metodologia amb el material radioactiu (implants) sigui directe amb el teixit cancerós i sa que l'envolta. Aquests implants poden ser permanents o temporals segons el tipus de càncer que pateixi el malalt, inclús pot requerir l'hospitalització del pacient durant un període indefinit. És important saber que la radiació interna que es deixa al cos, amb el pas del temps deixarà de ser emesa.

Implants permanents:

Els implants permanents són petites boletes d'acer que contenen material radioactiu. Aquestes càpsules tenen la mida aproximada d'un gra d'arròs i alliberen la càrrega radioactiva al voltant de l'àrea on s'ha implantat. Aquesta petita quantitat de radiació pot escapar del cos del pacient. En aquest tipus de tractaments sí que es requereix la presa de mesures de seguretat per a protegir a tothom que envolta al pacient donada a l'exposició contínua a la radiació. Les càpsules a mesura que va passant el temps perden la seva radioactivitat i aquelles que perden l'activitat total romanen dins del cos del malalt.

Radioteràpia interna temporària:

Aquesta variant de radioteràpia pot ser administrada amb diferents procediments:

- Injeccions
- Catèters
- Aplicadors especials

En aquesta teràpia la radiació pot romandre dins del sistema del pacient durant uns minuts o uns dies. Majoritàriament, les persones que són tractades reben uns minuts de teràpia únicament. És poc usual tenir sessions de períodes més llargs, en aquests casos, per tal d'evitar l'exposició radioactiva sobre el personal sanitari i l'entorn familiar s'administra la teràpia en una habitació aïllada.

Radioteràpia intraoperatòria (RIO). Aquest tipus de tractament s'empra durant un procediment quirúrgic, mitjançant radioteràpia de feix extern o interna. Aquest tipus de tècnica permet al cirurgià acomodar la zona on el tractament es durà a terme. És un mode molt beneficiós per quan el tumor es troba en una zona delicada com és a prop d'òrgans vitals.

Radioteràpia sistèmica. En aquest cas els pacients ingereixen o reben una injecció de materials radioactius que atacaran els teixits afectats. Aquests materials radioactius seran expulsats a través de la saliva, suor i orina. Els líquids radioactius fan que l'entorn del pacient s'hagin de prendre mesures de seguretat pel seu bé.

Radioimmunoteràpia. La radioimmunoteràpia és una teràpia sistèmica que utilitza anticossos monoclonals⁴, proteïnes que atrauen marcadors molt específics a l'exterior de les cèl·lules canceroses per a l'administració directa de la radiació al tumor. Aquests anticossos es troben acoblats a materials radioactius que reben el nom de radiosondes. Donat que el tractament requereix d'aquest tipus d'anticossos hi ha menys efectes sobre el teixit sa. Ja que quan són injectats al torrent sanguini, s'adhereixen a les cèl·lules canceroses i aquestes reben una alta dosi de radiació directa al tumor.

9.2.3. Efectes secundaris de la radioteràpia

És important recalcar que cada persona reacciona de diferent manera a cada tractament, qualsevol efecte secundari que es pot presentar depèn del tipus i localització del càncer, la dosi administrada i la seva salut. És per això que la duració d'aquests efectes depèn de la dosi i el pla de tractament. Alguns d'aquests efectes secundaris poden desaparèixer temps després de la finalització del tractament, donat que les cèl·lules sanes requereixen d'un període per poder recuperar-se de la radiació a la que han estat exposades.

Efectes secundaris primerencs:

Són efectes que floreixen durant o poc després. Aquests tipus d'efecte acostumen a tenir una curta duració, són lleus i tractables. Normalment, acostumen a desaparèixer en finalitzar el tractament.

- Fatiga
- Problemes amb la pell
- Pèrdua de cabell
- Problemes bucals
- Recòmptes sanguinis baixos

Efectes secundaris tardans:

Són efectes secundaris que poden trigar mesos o inclús anys en manifestar-se. Poden aparèixer en qualsevol zona que hagi estat tractada amb radiació. Tot depèn de la zona que ha estat tractada i la dosi que ha rebut durant la teràpia.

9.2.4. Eficàcia i seguretat del tractament

Rebre la radioteràpia com a tractament implica que el risc de desenvolupar un altre càncer augmenti lleument, donada a l'exposició constant a la radioactivitat. Però, en molts casos, només elimina el càncer existent. Donant un benefici major a la petita probabilitat que el tractament generi un futur càncer.

Deponent el tractament que s'estigui realitzant la seguretat del pacient i del seu entorn dependrà del tipus de radioteràpia que s'estigui duent a terme. En el cas del feix extern la radiació roman a la sala de tractament. Però en el cas de radioteràpia interna, fa que el pacient sí l'emeti, és per aquesta raó que s'hi han de prendre mesures de seguretat per tal de protegir el seu entorn:

- No visitar el pacient si està embarassada o té menys de divuit anys.
- No acostar-se a menys de 6 peus del llit del pacient.
- Limitar la seva estança a 30 minuts com a màxim cada dia.

Encara que el pacient hagi sortit de l'hospital durant dos mesos haurà de mantenir com a màxim 5 minuts de contacte amb nens i dones embarassades.

I de la mateixa manera aquests pacients que siguin tractats amb radioteràpia sistèmica hauran de seguir unes mesures de seguretat:

- Renteu-vos bé les mans després d'usar el bany.
- Utilitza tovalloles i estris separats.
- Beure gran quantitat de líquids per eliminar el material radioactiu restant de l'organisme.
- Eviteu el contacte sexual.
- Proveu evitar el contacte amb nadons, nens i dones embarassades.

9.3. Cirurgia:

9.3.1. Què és la cirurgia oncològica?

La cirurgia oncològica és l'extirpació del tumor i el teixit que l'envolta mitjançant una operació. La cirurgia és el tipus més antic de tractament contra el càncer. I encara avui dia continua sent efectiu per a molts tipus de càncer.

Hi ha molts motius per fer una cirurgia:

- Per diagnosticar el càncer.
- Per extirpar part o la totalitat d'un càncer.
- Per determinar on es troba el càncer.
- Per determinar si el càncer s'ha disseminat la metàstasi o està afectant les funcions d'altres òrgans del cos.
- Per recuperar l'aspecte o les funcions del cos.
- Per alleujar efectes secundaris.

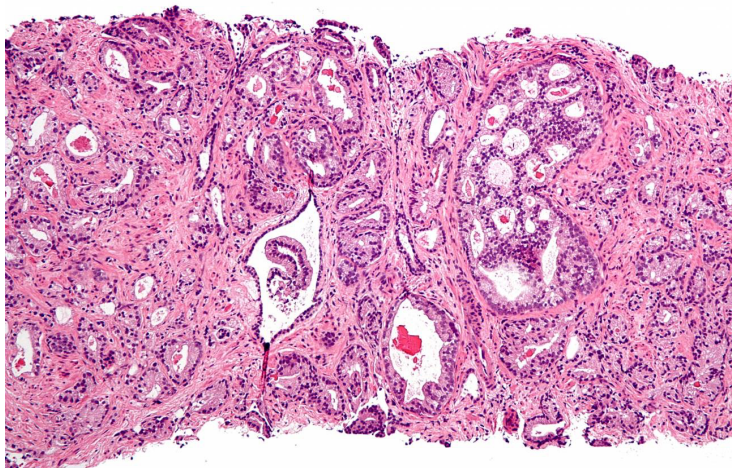


Figura 18: Exemple de tumor vist des d'un microscopi, concretament d'un Adenocarcinoma de pròstata.

(https://d7lju56vldri.cloudfront.net/var/ezwebin_site/storage/images/_aliases/img_1col/noticias/descubren-el-talon-de-aquiles-del-cancer-de-prostata-neuroendocrino/1891406-2-esl-MX/Descubren-el-talon-de-Aquiles-del-cancer-de-prostata-neuroendocrino.jpg)

9.3.2. Tipus de cirurgia

Diagnòstic: La biòpsia és la principal forma de diagnòstic per a la majoria dels tipus de càncer. En una biòpsia quirúrgica, el cirurgià realitza un tall a la pell anomenat "incisió a la pell". Després, s'extirpa part o la totalitat del teixit sospitós.

Existeixen 2 tipus principals de biòpsies quirúrgiques:

- Una biòpsia incisional s'extirpa una part de la superfície sospitosa per estudiar-la.
- Una biòpsia excisional s'extirpa tota l'àrea sospitosa, com una piga o un bony.

Després d'una biòpsia, un patòleg⁶² examina sota un microscopi el teixit que es va extirpar. A continuació del diagnòstic del teixit, s'avalua en altres cèl·lules i teixits per a saber l'extensió de la malaltia. Després, el patòleg⁶² lliura un informe patològic a l'oncòleg. A continuació, l'oncòleg revisa l'informe i diagnostica el tumor.

Determinació de l'estadi: La cirurgia de determinació de l'estadi s'utilitza per esbrinar la mida del tumor i si el càncer s'ha disseminat i cap a on. El metge també sol extirpar alguns ganglis limfàtics³³ propers al càncer per determinar si s'ha disseminat.

El seu equip d'atenció mèdica usa els resultats d'aquesta cirurgia i d'altres anàlisis per guiar les opcions de tractament.

Hi ha diferents estadis, aquest són simbolitzats amb la lletra T (de tumor) i un número que proporciona informació del tumor en qüestió:

- TX → No hi ha informació del tumor o que no es pot mesurar.
- T0 → No existeix evidència d'un tumor.
- Tis (tumor in situ) → El tumor s'ubica en les cèl·lules d'origen, encara no s'ha disseminat a algun teixit del voltant.
- T1-T4 → Indica la ubicació i grandària del tumor, en una escala de l'1 al 4. Com més hagi crescut en el teixit obtindrà un nombre major.

Extirpació de tumor, també anomenada cirurgia curativa o primària. La cirurgia s'usa més freqüentment per extirpar el tumor i part del teixit proper.



Figura 19: Exemple de l'extirpació de tumor, concretament La cirurgia de tumor testicular, urologia. (Extreta de google)

L'extirpació del tumor pot ser l'únic tractament o es pot combinar amb altres tractaments, com quimioteràpia o radioteràpia.

Per a aquest tipus de cirurgia, el cirurgià realitza grans incisions a través de la pell, del múscul i, en alguns casos, de l'os. Algunes vegades, es poden utilitzar tècniques quirúrgiques menys invasives. Aquestes tècniques podrien accelerar la recuperació i reduir el dolor després de la cirurgia.

9.3.3. Tipus de cirurgia invasiva

Cirurgia de reducció de massa

Algunes vegades, el cirurgià no pot extirpar el tumor sencer o aquesta podria danyar massa el cos. En aquests casos, durant la cirurgia s'extirpa la quantitat més gran possible de tumor. En aquest cas, com bé hem dit abans, es podria combinar amb radioteràpia o la quimioteràpia per acabar amb la resta de tumor que no s'ha pogut extirpar durant la cirurgia. També es podria fer al revés, és a dir, començar amb els tractaments com la radioteràpia o quimioteràpia per aconseguir reduir el tumor el màxim possible i a continuació extirpar-lo, ara sí, sencer ja que el tumor tindria una mida menor.

Pal·liació

La cirurgia pal·liativa alleuja els efectes secundaris causats per un tumor. Millora en gran manera la qualitat de vida de les persones amb càncer avançat o malaltia disseminada. Per exemple, la cirurgia pot usar-se per les següents raons:

Alleujar el dolor o recuperar les funcions físiques quan un tumor causa els següents problemes:

Pressió en un nervi o la medul·la espinal.

Obstrucció dels intestins.

Pressió o obstrucció en una altra part del cos.

Aturar el sagnat. Certs tipus de càncer són més propensos a causar sagnat:

Càncer en àrees amb gran quantitat de vasos sanguinis, com l'úter.

Càncer en òrgans que són delicats i poden sagnar amb facilitat quan els aliments i deixalles passen per la zona, com l'esòfag, l'estómac i els intestins.

El sagnat també pot ser un efecte secundari d'alguns fàrmacs que s'utilitzen per tractar el càncer. Quan cal fer una cirurgia per aturar el sagnat, sovint, s'utilitza una tècnica anomenada lligadura per transfixió. Aquesta cirurgia uneix els vasos sanguinis amb sutura quirúrgica.

Introduir una sonda d'alimentació per administrar fàrmacs si el càncer o el tractament ha fet difícil la ingesta d'aliments.

Es col·loca una sonda d'alimentació directament a l'estómac o l'intestí a través de la paret abdominal. També, podria introduir una sonda en una vena per administrar analgèsics o medicaments de quimioteràpia.



Figura 20: Visualització d'una sonda administrant un fàrmac. (Extreta de google)

Evitar fractures d'ossos.

Els ossos afeblits pel càncer o el tractament contra el càncer es poden fracturar amb facilitat i, sovint, es consoliden lentament. Els metges podrien introduir una vareta de metall per ajudar a evitar les fractures dels ossos febles i alleujar el dolor durant la consolidació.

Reconstrucció

Després d'una cirurgia principal per extirpar un tumor, les persones poden optar per sotmetre a una altra cirurgia per recuperar l'aspecte i les funcions del cos. Aquesta s'anomena cirurgia reconstructiva o plàstica. La cirurgia reconstructiva es pot realitzar al mateix temps que la cirurgia d'extirpació de tumor o es pot realitzar després que la persona hagi curat o rebut altres tractaments. Alguns exemples de cirurgia reconstructiva inclouen la reconstrucció de mama després d'una mastectomia⁵⁰ i una cirurgia per recuperar l'aspecte i les funcions d'una persona després de la cirurgia de cap i coll.

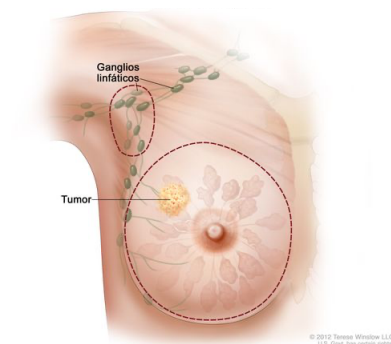


Figura 21: Simulació d'una mastectomia⁵⁰, les línies vermelles ens indiquen tot el que s'extirpara durant l'operació. També veiem indicada aquesta línia vermella on els ganglis, debut a què també es podrien extirpar si estiguessin afectats pel tumor. (<https://nci-media.cancer.gov/pdq/media/images/722117.jpg>)

Prevenió

La cirurgia també es realitza per reduir el risc d'aparició de càncer. Per exemple, els metges sovint suggereixen extirpar els pòlips⁶⁶ precancerosos del còlon per evitar el càncer de còlon. A més, les dones amb sòlids antecedents familiars de càncer de mama o ovaris o mutacions conegudes dels gens del càncer de mama i del càncer d'ovaris BRCA1 i BRCA2⁷ podran decidir realitzar-se una mastectomia⁵⁰ o una ooforectomia⁵⁹. La mastectomia⁵⁰ és l'extirpació d'una mama. Una ooforectomia⁵⁹ és l'extirpació dels ovaris. sotmetre a aquestes cirurgies redueix el risc d'aparició de càncer de mama o ovaris.

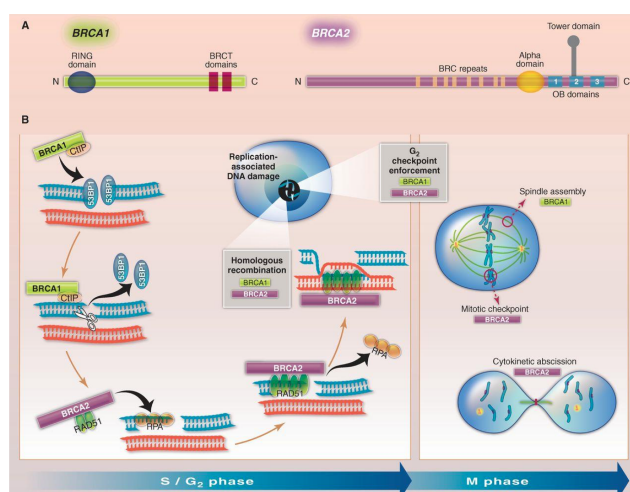


Figura 22: BRCA1 es troba involucrat tant en la reparació de l'ADN, com en la regulació de punts de control del cicle cel·lular, en resposta al dany en l'ADN. BRCA2 participa en la reparació de ruptures d'ADN doble cadena.

(<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcR9jELRoOFFhn7Tdl0jUVJmpZT4PMf-TV4TNQ&usqp=CAU>)

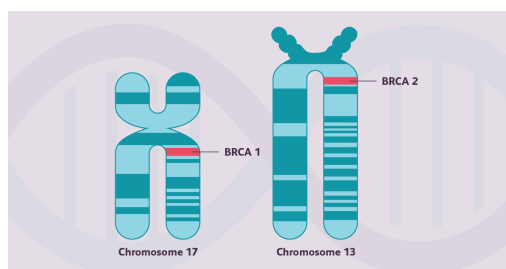


Figura 23: Localització d'on es troba BRCA1 i BRCA2⁷ en el cromosoma on es troba cadascún.

[https://www.verywellhealth.com/thmb/2lfx3jqHOCB8KVrqwGaz65vimY=/1501x1000/filters:no_upscale\(\):max_bytes\(150000\):strip_icc\(\)/role-of-brca-mutations-in-breast-cancer-survival-4158206-color-V1-c9673d1527664e3b9fb2824e3725ea9d.png](https://www.verywellhealth.com/thmb/2lfx3jqHOCB8KVrqwGaz65vimY=/1501x1000/filters:no_upscale():max_bytes(150000):strip_icc()/role-of-brca-mutations-in-breast-cancer-survival-4158206-color-V1-c9673d1527664e3b9fb2824e3725ea9d.png)

9.3.4. Tipus de cirurgia mínimament invasiva

Com hem esmentat més amunt, durant la cirurgia, el cirurgià sol realitzar incisions grans en el cos. Però, en alguns casos, pot utilitzar un o diversos talls més petits. Aquestes cirurgies generalment acceleren el temps de recuperació i presenten menys dolor després de la cirurgia.

Exemples de procediments i cirurgies mínimament invasius:

Cirurgia laparoscòpica. El metge realitza petites incisions a la pell i després introdueix un tub flexible fins a l'òrgan que vol analitzar amb una càmera i llum. El terme "laparoscòpia" fa referència a una cirurgia abdominal mínimament invasiva. Mediastinoscòpia i toracoscòpia és el mateix tipus de cirurgia, però es realitza al tòrax. La cirurgia laparoscòpica també es pot realitzar amb l'ajuda d'un robot. Aquest procediment quirúrgic pot sol utilitzar-se per als ronyons, la pròstata, l'úter o els ovaris.



Figura 24: Representació simulada i real d'una laparoscòpia. (Extret de google)

Cirurgia amb làser. El metge empra un raig estret de llum d'alta intensitat per extirpar el teixit cancerós.



Figura 25: Una cirurgia amb làser real, concretament cirurgia de pròstata. (Extret de google)

Criocirurgia. El metge fa servir nitrogen líquid per congelar i matar cèl·lules anormals.



Figura 26: Utilització de criocirurgia en un tumor renal. (Extret de google)

Endoscòpia. El metge insereix una sonda prima i flexible amb una llum i una càmera a l'extrem. Aquest dispositiu és denominada "endoscopi". Pot inserir-se en la boca, el recte o la vagina per examinar els òrgans interns. Durant aquest procediment, el metge extirpa mostres de teixit sospitoses per examinar amb més detall.

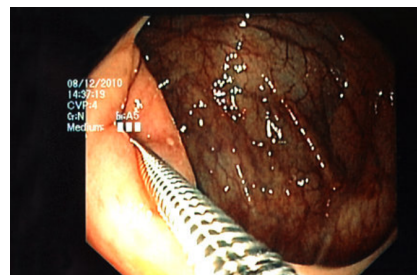


Figura 27: Vista des de la càmera que hi ha a l'extrem de la sonda dins del cos. (Extret de google)

9.4. Trasplantament de cèl·lules:

9.4.1. Cèl·lules mare

Són unes cèl·lules que es troben i es desenvolupen en la medul·la òssia (teixit esponjós que omple les cavitats dels ossos).

Aquestes cèl·lules mare de la sang tenen dues característiques fonamentals:

1. Són capaces d'autoregenerar-se de forma indefinida durant tota la vida.
2. Són capaces de produir totes les cèl·lules de la medul·la òssia, de la sang, del sistema limfàtic i, fins i tot, cèl·lules d'alguns teixits.

Aquestes cèl·lules no s'han de confondre amb les cèl·lules mare embrionàries capaces de generar totes les cèl·lules de l'organisme.

A la medul·la òssia, les cèl·lules mare tenen diverses divisions a través de les quals van produint totes les cèl·lules de la sang:

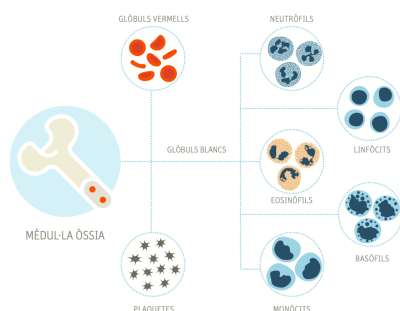


Figura 28: Divisions de les cèl·lules mare.

(https://www.fcarreras.org/ca/quia-del-trasplantament-de-medul-la-ossia-per-al-pacient_730447.pdf)

9.4.2. On i com s'obtenen les cèl·lules mare?

Medul·la òssia. Les cèl·lules mare de la medul·la òssia s'obtenen mitjançant múltiples puncions en ambdues crestes ilíaqües posteriors. Aquestes puncions s'efectuen a través de 2-4 petits orificis a la pell sota anestèsia general. Encara que aquesta aspiració pot fer-se sota anestèsia local, és recomanable l'anestèsia general perquè és més còmode per al pacient i facilita la labor dels metges. El volum de sang medul·lar que cal aspirar per obtenir cèl·lules mare suficients sol ser molt elevat. Per això, cal reposar part del volum de sang extret mitjançant una autotransfusió administrada durant el procediment. Uns 15-20 dies abans de

l'aspiració de medul·la òssia, es fa una extracció de sang del donant. Addicionalment, els donants reben ferro per via oral durant un parell de mesos.

L'efecte secundari més freqüent que provoca la donació de medul·la òssia és una lleugera molèstia a les zones de punció, És habitual que el procediment comporti un ingrés hospitalari de 24 hores.

Sang perifèrica. En condicions normals, la quantitat de cèl·lules mare existent a la sang que circula per les venes i les artèries és molt escassa. No obstant això, és possible mobilitzar grans quantitats d'aquestes cèl·lules de la medul·la a la sang i recollir-les sense necessitat d'anestèsia. Per aconseguir aquesta «mobilització», els donants han de rebre, durant quatre o cinc dies, una injecció diària de G-CSF³⁴. En aquests casos és usual aprofitar per a la mobilització algun dels cicles de quimioteràpia que hagi de rebre per al seu tractament, ja que en la fase de recuperació després d'una quimioteràpia surten moltes cèl·lules mare cap a la sang de forma espontània. De nou, aquest procés es pot facilitar mitjançant l'administració de G-CSF³⁴ després de la quimioteràpia.

Quan les cèl·lules mare s'han mobilitzat cap a la sang, es recullen mitjançant un procediment denominat afèresi³. És un procediment ben tolerat, amb escassos efectes secundaris, entre els quals cal destacar, per la seva freqüència, els formigueigs a les extremitats. A diferència de l'obtenció de medul·la òssia, les afèresis³ es fan de forma ambulatoria i no cal anestèsia ni ingrés.

En els donants sans, amb una sessió d'afèresi³ sol ser suficient per obtenir les cèl·lules necessàries per al trasplantament.

Hi ha diverses maneres de dur a terme la donació de cèl·lules:

Germans i altres familiars

La probabilitat de trobar un donant compatible és més alta entre germans, d'aquí que aquests siguin els primers a estudiar-se. A causa de les lleis de l'herència, un de cada quatre germans (25 %) serà totalment compatible amb el pacient, per la qual cosa la probabilitat de trobar un donant familiar augmenta amb el nombre de germans.

La probabilitat que els pares o fills siguin suficientment compatibles amb el pacient és molt baixa. Amb tot, és habitual fer-ne l'estudi per descartar aquesta possibilitat i davant l'eventual necessitat d'haver de recórrer a un trasplantament haploidèntic (trasplantament de donant 50 % compatible, en el supòsit de no localitzar un donant 100 % compatible o una bona unitat de sang de cordó umbilical).

L'estudi d'altres familiars mai està indicat, llevat de situacions de consanguinitat excepcionals, ja que és més fàcil trobar un donant no emparentat compatible en els registres de donants.

Quan no existeix un donant familiar

En aquells casos en què el pacient requereix un trasplantament al·logènic per a la seva curació i no disposa d'un donant familiar compatible, el seu equip mèdic exposarà al pacient i discutirà amb ell i la seva família les possibilitats terapèutiques alternatives en funció del tipus de malaltia i de la fase en què es trobi, la seva edat i el seu estat general. Entre les alternatives terapèutiques hi ha el trasplantament a partir d'un donant (o d'una unitat de sang de cordó) no emparentat, el trasplantament haploidèntic, el trasplantament autogènic i les teràpies en fase de recerca (assajos clínics).

Donants voluntaris de registres internacionals

L'alternativa als donants familiars la constitueixen els donants voluntaris i les unitats de sang de cordó umbilical emmagatzemades als bancs de sang de cordó. Aquests donants voluntaris i unitats de cordó poden localitzar-se gràcies a la seva inscripció en els registres de donants.

Ús de diverses fonts de progenitors

En ocasions, el trasplantament s'efectua amb cèl·lules mare obtingudes de dues fonts diferents o de dos donants diferents. És el cas dels trasplantaments dobles de cordó umbilical, ha mostrat clars avantatges sobre l'administració d'una única unitat.

Una situació similar és la del trasplantament dual, que consisteix a administrar una unitat de sang de cordó suplementada amb progenitors de sang perifèrica d'un

donant familiar haploidèntic dels quals s'han eliminat els limfòcits T. Amb aquesta tècnica s'aconsegueix una ràpida recuperació hematològica, amb la qual cosa es redueix el risc de complicacions infeccioses a curt termini.

9.5. Teràpia Gènica:

La teràpia gènica és una tècnica experimental per tractar amb malalties mitjançant l'alteració del material genètic del pacient. La teràpia gènica consisteix en la introducció d'una còpia sana d'un gen defectuós a les cèl·lules del pacient.

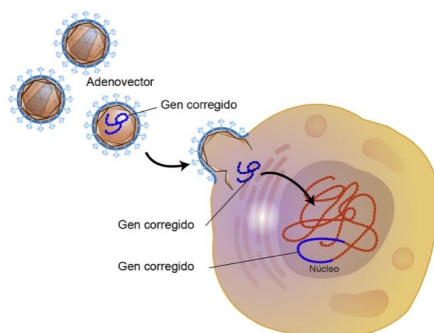


Figura 29: Simulació d'adenovirus unint-se a una cèl·lula defectuosa. (Extret de National Human Genome Research Institute)

Com a objectiu té modificar la informació genètica de la cèl·lula del pacient que pateix la malaltia, perquè les cèl·lules recuperin la seva normalitat. La transferència del material genètic se sol realitzar mitjançant l'ús de vectors virals que utilitzen les seves capacitats biològiques pròpies per a entrar en la cèl·lula i dipositar el material genètic. Tant les malalties genètiques hereditàries com els trastorns adquirits poden ser tractats amb teràpia gènica. Exemples d'aquests trastorns són les immunodeficiències primàries, on la teràpia gènica ha estat capaç de corregir la presentació de la malaltia en aquests pacients i/o el càncer, on la teràpia gènica encara està en fase experimental.

9.5.1. Mètodes

Els mètodes que s'experimenten es poden realitzar *in vivo*⁴⁶ o *ex vivo*²⁷. La transferència dels gens *in vivo*⁴⁶ consisteix a introduir el vector amb el gen terapèutic directament al pacient, via sistèmica per infusió, o per injecció directa en el teixit afectat. El problema de la transferència *in vivo*⁴⁶ és que no es poden distingir les cèl·lules que adquireixen el gen terapèutic de les quals no l'adquireixen;

a més, en el cas de la transferència per via sistèmica, es requereix un vector dirigit que sigui capaç de reconèixer el teixit diana⁷⁴ per a evitar que les cèl·lules sanes siguin també transferides amb el gen terapèutic, incloent-hi les cèl·lules germinals.

En el cas de l'administració *ex vivo*²⁷, es tracta d'aïllar les cèl·lules afectades, conrear-les *in vitro*⁴⁵ en el laboratori i sotmetre-les al procés de transfecció gènica; una vegada transformades les cèl·lules, es tornen a reimplantar a l'individu donant. Aquest mètode té l'avantatge que solament s'exposen a la transferència del gen terapèutic les cèl·lules afectades; a més, l'eficiència de transformació és molt més alta, ja que les cèl·lules poden ser exposades a una elevada concentració del vector, optimitzant el procés.

Tabla 1. Vectores de terapia génica		
Vector	Ventajas	Inconvenientes
Retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> - Alta eficiencia de transducción - Integración en el cromosoma huésped - Expresión estable 	<ul style="list-style-type: none"> - Potencialidad de mutagénesis por inserción - Requiere células en división - Limitación en el tamaño del gen a introducir
Adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> - Alta eficiencia de transducción - Pueden infectar a una gran variedad de células - No requieren células en división - Bajo riesgo de mutagénesis por inserción 	<ul style="list-style-type: none"> - Expresión limitada (inmunogenicidad) - Efecto citopático (expresión no estable)
Virus adenoasociados	<ul style="list-style-type: none"> - No requieren células en división - Integración específica 	<ul style="list-style-type: none"> - Potencialidad de mutagénesis por inserción - Limitación en el tamaño del gen a introducir
Vectores fisicoquímicos	<ul style="list-style-type: none"> - No existen riesgos de infección - Completamente sintéticos - No existe limitación en el tamaño del gen a introducir 	<ul style="list-style-type: none"> Baja eficiencia: - Limitaciones en el tipo de células aplicables - Expresión no estable

Figura 30: Vectores de teràpia gènica.

<https://multimedia.elsevier.es/PublicationsMultimediaV1/item/multimedia/13054407:4v22n10-13054407tab02.gif?idApp=UINP>
 BA00004N)

10. TERÀPIA GÈNICA

10.1. Història de la teràpia gènica

Al principi dels anys seixanta, en concepte de teràpia gènica va començar a agafar forma, els científics especulaven sobre si les seqüències d'ADN podrien ser introduïdes a les cèl·lules dels pacients per tal de curar les malalties genètiques.

Theodore Friedmann i Richard Roblin, una dècada després publiquen el primer *paper* "*Gene therapy for human genetic disease?*", on confirmaven que el reemplaçament d'ADN defectuós en gent amb malalties genètiques era possible.

A principis de la dècada dels vuitanta, David Williams i David Nathan, van publicar el primer *paper* demostrant que la introducció de gens a cèl·lules mare de la sang per mitjà d'un virus.

L'any 1985, el Dr. Anderson i Michael Blease van iniciar un projecta per tal de demostrar com les cèl·lules de persones amb deficiència d'ADA² podien ser modificades utilitzant un retrovirus com a vector per a portar el gen correcte d'ADA² a les cèl·lules. Un any després, van intentar la transferència d'aquests gens a la medul·la d'animals. Dos anys més tard, 1988, van percebre que la translació dels gens als leucòcits, augmentava la quantitat de gens no defectuosos que eren adherits per les cèl·lules. A 1989, Anderson i Michael Blease juntament amb el Dr. Steven Rosenberg van abordar la seguretat i l'efectivitat de la teràpia gènica en casos de malalts per càncer. Van realitzar cultius de limfòcits de gent amb melanomes malignes. Un vector viral⁷⁷ va ser modificat per tal de portar un marcador de l'ADN en les cèl·lules canceroses, aquestes marcades van permetre que els investigadors arribessin a conclusions sobre si el virus era segur en éssers humans i l'eficàcia del vector viral⁷⁷.

No va ser fins a l'any 1990, a NIH (National Institute of Health), que Ashanthi da Silva la primera pacient que va rebre teràpia gènica de manera satisfactòria. La pacient de quatre anys patia una malaltia congènita immunodeficient severa. La carència d'ADA² li procava la mort de les cèl·lules T¹⁴, fet que la convertia en una persona immunodeprimida³⁹. De manera temporal, va rebre injeccions d'enzim

d'ADA² sintètica. Fins que el Dr. W. Anderson i el seu equip van decidir inserir gens d'ADA² no defectuosos en les seves cèl·lules sanguínies, a través d'un virus desactivat.

L'èxit d'aquest cas va estimular el nombre d'assaigs de SCID (Immunodeficiència severa combinada), a Europa, centrats en SCID-X1 relacionat amb el cromosoma X. L'any 2000 van informar d'un succés en les primeres cures, però pocs anys després un 25% dels infants tractats van desenvolupar, leucèmia⁴⁸. Donat que un vector viral⁷⁷, alliberar un gen el qual activava un oncogen⁵⁷, provocant càncer de sang. Mentre als assaigs dels Estats Units, van obtenir resultats poc positius amb la mort de Jesse Gelsinger, un jove de divuit anys. Aquest pacient estava rebent tractament per a un trastorn metabòlic poc comú. En aquest cas, a diferència de l'anterior el vector viral⁷⁷ va provocar una resposta immunitària fatal, la qual va posar fi a la vida del jove.

L'any 2010, la teràpia gènica va experimentar un retorn al món de la ciència. Els investigadors van crear millors vectors virals, aquest fet proporcionaria millors teràpies pels pacients. Van utilitzar noves tecnologies afegint promotors i potenciadors per dirigir l'activitat i el nivell del gen. Aquests elements indicaven la ubicació i el moment en què el gen s'havia d'activar. Els nous vectors permetien orientar amb més precisió l'expressió genètica en cèl·lules específiques, i no desencadenen el sistema immunitari. Alguns tenien la funció d'entregar gens destinats a funcionar durant un curt període de temps donat que després es desactivaven. D'altres tenien la funció d'entregar gens destinats a funcionar a llarg termini i passen a les cèl·lules filles a mesura es produeix mitosi. El tipus de virus utilitzats com a vectors virals eren i són adenovirus, virus adenoassociats i lentivirus.

En aquesta última dècada, la teràpia gènica ha vist una aparició de nous mètodes per lliurar o arreglar gens. Tenint en compte que la teràpia gènica tradicional consistia a transportar gens sans a cèl·lules per tal de compensar el gen defectuós o deficient. L'edició de gens i l'edició base han estat unes de les tècniques més modernes descobertes. L'edició de gens fa ús d'eines moleculars que s'orienten amb molta precisió a gens defectuosos, on tallen una seqüència de l'ADN, per després inserir una nova seqüència. Els sistemes d'edició més comuns són CRISPR/Cas 9, ZFN (Zinc Finger Nuclease) i TALEN (Nucleases Efectors de Tipus Activador de la Transcripció). Mentre l'edició base és encara més precisa. Aquesta

aprofita l'orientació del CRISPR, però a l'hora de canviar una base nitrogenada del codi es basa pels enzims. Aquests petits canvis poden corregir mutacions genètiques, ajudant a silenciar o activar un gen. Aquest segon mètode a diferència de l'edició de gens no s'ha provat en assaig clínic. Actualment, existeixen 400 estudis de teràpia gènica a tot el món i més d'una dotzena de fàrmacs de teràpia gènica al mercat.

10.2. Arribada al pacient

Aquest tractament va estar inicialment proposat per quatre pacients amb retinoblastoma avançat. D'aquests quatre, només un metge va acceptar després de veure les proves i la fiabilitat del tractament en ratolins. Els altres tres, per por a la metastasi i la inseguretat de la probabilitat d'èxit en el tractament van decidir no utilitzar-lo i acabar amb un tractament més agressiu com la quimioteràpia o la radioteràpia.

L'u dels tres que va decidir administrar la nova teràpia gènica, presentava un retinoblastoma bilateral que afectava els dos ulls. Aquest pacient era de Veneçuela, on li van haver d'extirpar un dels dos ulls i va ser enviat a Barcelona per intentar conservar el seu únic ull restant. Després d'un primer intent de tractament amb quimioteràpia intraarterial i laser van aconseguir estabilitzar la malaltia i el pacient va poder tornar al seu país d'origen.

Tot i això, al cap de vuit mesos va tenir una reactivació severa del seu tumor intraocular⁴². Inicialment, van tornar a fer servir la quimioteràpia intraarterial e intravítrea⁴⁴, però aquest cop no van poder controlar el tumor.

Davant el risc que el tumor sortís de l'ull i pogués comprometre la vida del pacient, tenien dues opcions, l'enucleació²⁴ de l'ull, és a dir, extirpar el segon ull del pacient així doncs deixant al pacient sense visió o incloure'l a l'assaig clínic amb el virus VCN01.

Afortunadament, després de les dues injeccions del virus VCN01, seguides de més quimioteràpia i braquiteràpia (*radioteràpia localitzada*) van poder controlar la seva malaltia i van poder mantenir la visió del seu únic ull.

Actualment, tres anys i mig després de la reactivació i del tractament, van poder conservar el seu ull i una mica de visió, que permeten al pacient anar a l'escola, jugar i moure's per si mateix.

10.3. Administració al pacient

L'administració del tractament amb el virus oncolític VCN-01, consisteix en injeccions intraoculars⁴² (Intravítries⁴⁴) del virus modificat genèticament. Virus el qual mitjançant la seva modificació genètica adquireix la capacitat d'infectar de manera selectiva les cèl·lules tumorals, en aquest cas de retinoblastoma, i provocar la seva mort.

Actualment, l'ús d'aquest tractament no està autoritzat com a tractament habitual, s'ha fet ús d'aquest tractament en un context d'assaig clínic realitzat a l'hospital de Sant Joan de Déu. Amb la singularitat de què el departament d'investigació bàsic en retinoblastoma ha estat qui ha desenvolupat i dut a terme tots els experiment *in vitro*⁴⁵ i en animals que han mostrat l'eficàcia del tractament, abans de ser provats en pacients.

Donat que es tracta d'un assaig clínic, està indicat en aquells casos que es considera que no hi ha altra opció de tractament. Generalment, aquests casos acostumen a estar en una fase molt avançada en què l'única alternativa de tractament és l'enucleació²⁴.

L'assaig clínic ha de complir unes condicions molt estrictes i s'hi ha d'establir que s'injectarà el virus en 2 ocasions amb una separació de dues setmanes entre injecció i injecció. Existeix la possibilitat que en algun cas especial i, com a ús compassiu, s'injecti una tercera dosi del virus.

10.4. Protocol inicial al pacient

1. Procediment de valoració i selecció del pacient

- a. Servei de Neurologia (Neurofisiologia)
 - i. Electroretinograma²² (ERG)
 - ii. FST³⁰ (Full-field Stimulus Testing)
- b. Servei d'oftalmologia
 - i. Agudeses visual: HOTV, ETDRS³⁶
 - ii. Humphrey macula threshold³⁸, dB, monocular, mitja d'ambdós ulls:
 1. 4° centrals
 2. 10-2
 - iii. Humphrey camp visual cinètic³⁷: Goldmann III4e sumatori dels graus totals. Monocular, mitja d'ambdós ulls.
 - iv. Qüestionari sobre funció visual 25³¹
 - v. Qüestionari sobre desenvolupament visual
 - vi. OCT macular⁵⁶
 - vii. Retinografia i autofluorescència
 - viii. Estudi genètic
- c. Servei de genètica
 - i. Estudi genètic + confirmació amb estudis familiars

1.1. Indicació de tractament amb Luxturna

Seguint les guies de la EMA, la teràpia gènica amb Luxturna està indicada en pacients que compleixin amb els 3 criteris següents:

1. Diagnòstic clínic de distròfia retinal
2. Mutació bi-al·lèlica del gen RPE65 confirmada mitjançant estudi gènic
3. Evidència clínic del teixit retinal viable

Diagnòstic clínic de distròfia retinal: Responsable: oftalmòleg amb experiència en distròfies retinals.

Dr. Jaume Català Mora. Dr. Jesús Díaz Cascajosa. Dra. Elisa Carreras Bertran

1. Confirmació diagnòstic clínic

- a. Electroretinograma²² (ERG mesòpic; escotòpic i fotòpic)
 - b. Campimetria visual⁹: Humphrey 4°/10-2
 - c. Tomografia de coherència òptica (OCT)
 - d. Retinografia i autofluorescència de fons (FAF)
2. Diagnòstic genètic: Mutacions bi-al·lèliques en el gen RPE65:
- a. Mutacions confirmades
 - b. Variats patogèniques o possiblement segons la classificació del American College for Medical Genetics and Genomics (ACMG)
3. Identificació del teixit objectiu, un dels següents criteris:
- a. Gruix retinal total > 100 micres en pol posterior.
 - b. Un illot de camp visual residual en els 30° centrals
 - c. Una àrea sense atròfia d'almenys 3 diàmetres de disc.
4. Selecció de l'ull a tractar
5. Consentiment informat quirúrgic i de medicació en condicions diferents de les autoritzades.

2. Procés de preparació i administració de Luxturna al centre

Serveis i persones implicades:

1. Servei de Farmàcia
 2. Servei d'anestèsia
 3. Servei d'oftalmologia
 4. Infermeria quiròfan UCA
 5. Infermeria planta 5
 6. Coordinació
 7. Comitè de bioseguretat
- A. Procés de recepció i conservació de Luxturna:
- a. Comprovació i registre de la cadena de fre
 - b. Conservació a temperatura inferior a -65 °C
- B. Medicació concomitant per al pacient:

- a. Prednisona 1 mg/kg/dia (màx. 40 mg al dia) des del dia -3 fins al dia 0 (de la intervenció quirúrgica).
 - b. Prednisona 0,5 mg/kg/dia (màx. 20 mg al dia) des del dia 1 al dia 5 postcirurgia.
 - c. Prednisona 0,5 mg/kg/dia (màx. 20 mg al dia) en dies alterns del dia 6 al 10 postcirurgia.
 - d. L'oftalmòleg (Dr. Jaume Català) entregar repta i instruccions d'administració.
 - e. Trucada prequirúrgica: Confirmar que el pacient està prenent el tractament prequirúrgic.
- C. Programació de la intervenció quirúrgica:
- a. Confirmar que el cirurgià, ajudant, instrumentista, personal de quiròfan i farmacèutica han estat informats i estan disponibles el dia i hora programats.
 - b. Programar la intervenció dels dos ulls amb un mínim de sis dies de diferència. S'aconsella planificar la cirurgia de cada ull amb una setmana de diferència.
 - c. Comprovar disponibilitat d'habitació amb aïllament.
 - d. Comprovar formació d'infermeria de planta en posicionament, tractament tòpic i maneig d'oclusió ocular.
 - e. Comprovar disponibilitat de roba quirúrgica d'un sol ús.
 - f. Entregar a la família un document amb la medicació i instruccions pre i postquirúrgiques.
- D. Dia preintervenció quirúrgica:
- a. Comprovar amb farmàcia la disponibilitat de Luxturna i la correcta conservació del producte amb la cadena de fred, així com la persona responsable de la preparació i la del trasllat al quiròfan A12.
 - b. Comprovar la disponibilitat del producte de neteja de superfícies a determinar per bioseguretat.
- E. Dia de la intervenció quirúrgica:
- a. Programació de la intervenció (quiròfan A12 tarda) 16.30 hores.

- b. L'equip quirúrgic haurà d'estar entrenat en el maneig de la bioseguretat d'agents de nivell 1.
- c. Comprovació de disponibilitat de dues caixes de vitrectomia + crioteràpia i endolàser.
- d. Valoració preanestèsica del pacient durant el matí.
 - i. Dejuni prequirúrgic a partir de les 10 h
 - ii. Visita anestèsia
 - iii. En cas de no contraindicació, avis a oftalmologia, UCA i farmàcia per a la preparació del Luxturna i preparació al pacient (ingrés en planta, dejuni prequirúrgic)
 - iv. Farmàcia confirma disponibilitat de campana
 - v. Baixar al pacient a UCA per a pauta de dilatació pupil·lar.
 - vi. Confirmació de l'ull a tractar
- e. Preparació del Luxturna segons el protocol (màx. 4 hores abans de l'administració) 16.00 h
 - i. Tècnica asèptica, sota condicions estèrils en una càmera de flux de seguretat microbiològica classe II.
 - 1. Xeringa estèril 1 ml
 - ii. Trasllat de les dues xeringues en condicions estèrils i bioseguretat al quiròfan A12.
 - iii. Rebutjar fàrmac i material en contacte en el contenidor de productes biològics
 - iv. Zelador d'UCA va a Farmàcia a recollir el fàrmac
- f. Després de l'arribada del fàrmac a quiròfan:
 - i. Entrega del fàrmac a la infermera circulant
 - ii. Introducció anestèsia
 - iii. Preparació del material quirúrgic
 - 1. Cànula subretinal 41G
 - 2. Tub d'extensió 15,2 cm de longitud
 - iv. Check-list ull-procediment-material
- g. Vitrectomia posterior vpp 23G
 - i. Administració de Luxturna subretinal
 - ii. Intercanvi sèrum-aire
 - iii. Sutura esclerotomies

- iv. Urbason subconjuntival
 - h. Rebutjar fàrmac i material en contacte en el contenidor de productes biològics.
 - i. Rentat de superfícies de quiròfan.
- F. Despertar i reanimar en quiròfan
- G. Posicionament en decúbit supí¹⁸ primeres 24 hores
- H. Habitació amb aïllament
- I. Tractament antibiòtic i antiinflamatori tòpic habituals postvitrectomia
- J. Tractament de l'ull contralateral:
- a. Es recomana un mínim de sis dies entre el tractament d'un ull i el següent.
 - b. Contraindicacions de tractament de l'ull contralateral:
 - i. Despreniment de retina
 - ii. Endoftalmitis²³
 - iii. Hemorràgia vítria
 - iv. Vitritis/Uveïtis posterior severa

3. Procediment de seguiment del tractament amb Luxturna

- A. Postoperatori immediat:
- Dia 1, dia 6, setmana i mes: AV, biomicroscòpia, pressió intraocular⁴², fons d'ull.
- B. Recogida de secrecions nasals i llagrimals per part de la família i custodia en bosses tancades. Entrega per a dipòsit en contenidors per a residus tipus 3 en cada visita postoperatòries fins al dia 15 postvitrectomia.
- C. Seguiment funcional (1 mes, 3 mesos, 6 mesos, 1 any)
- a. Millor AV corregida (HOTV, ETDRS)³⁶
 - b. Campimetria visual⁹ (Humphrey 4° i 10-2); perimetria cinètica⁶⁴
 - c. FST³⁰
 - d. Electroretinograma²²
 - e. OCT
 - f. Retinografia i FAF

10.5. Possibles efectes secundaris

Reacciones adversas, n (%)	Sujetos (n=41)	Ojos tratados(n=81)
Hiperemia conjuntival	9 (22%)	9 (11%)
Catarata*	8 (20%)	15 (19%)
Elevación de la presión intraocular	7 (17%)	9 (11%)
Desgarro retiniano	4 (10%)	4 (5%)
Dellen (adelgazamiento del estroma corneal)	3 (7%)	3 (4%)
Agujero macular*	3 (7%)	3 (4%)
Inflamación ocular	2 (5%)	4 (5%)
Irritación ocular	2 (5%)	2 (2%)
Dolor ocular*	3 (7%)	3 (4%)
Maculopatía (membrana epirretiniana)	2 (5%)	3 (4%)
Adelgazamiento foveal y pérdida de la función foveal	1 (2%)	2 (2%)
Endoftalmitis	1 (2%)	1 (1%)
Dehiscencia foveal (separación de las capas retinianas en el centro de la mácula)	1 (2%)	1 (1%)
Hemorragia retiniana	1 (2%)	1 (1%)
Desprendimiento de retina	1 (2%)	1 (1%)

Figura 31: Reaccions adverses oculars en 66% dels participants de l'estudi (57% dels ulls injectats). (Extract del protocol enviat del Dr. Jaume Català)

11. VIRUS

Un virus és un agent submicroscòpic infecció que només té la capacitat de prosperar i reproduir-se dins de les cèl·lules vives de l'organisme que hospeda. Es caracteritza per infectar tota forma de vida, des d'animals i plantes fins a microorganisme incloent bacteris i arqueobacteris. Els virus s'han trobat en tots els ecosistemes.

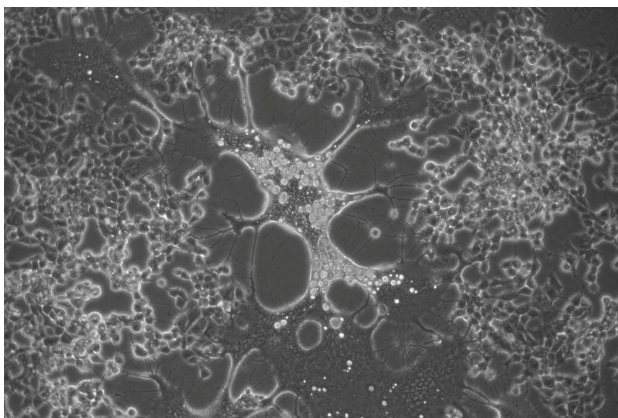


Figura 32: Tipus de virus en microscopi. Cèl·lula infectada amb una variant de virus de l'herpes simplex generada durant el cultiu cel·lular.

https://d7lju56vldri.cloudfront.net/var/ezwebin_site/storage/images/alias/img_1col/en-exclusiva/programados/el-virus-del-herpes-genital-humano-evolucion-a-mas-rapido-que-el-labial/9180451-1-esl-MX/El-virus-del-herpes-genital-humano-evolucion-a-mas-rapido-que-el-labial.jpg

11.1. Història del virus

Un virus és una partícula de codi genètic, ADN o ARN, encapsulada en una vesícula de proteïnes. Aquests no es poden reproduir per si sols, necessiten cèl·lules, utilitzar els components de les cèl·lules hostes¹³ per fer còpies de si mateixos. Sovint el virus mata o danya a la cèl·lula durant el procés de multiplicació. Els virus no tenen la mateixa composició biològica que els bacteris, no els podem combatre amb antibiòtics. Tan sols podem utilitzar vacunes o medicacions antivirals per eliminar o reduir la severitat de les malalties virals.

Els virus són submicroscòpics, per tant, no els podem veure en el microscopi. L'interessant dels virus és que tenen dos o tres components només. Començant des de l'interior, estats formats per un àcid nucleic que pot ser ADN o ARN, i en els dos casos, els àcids nucleics els podem trobar tant de cadena simple com de cadena doble. Envoltant l'àcid nucleic trobem una cobertura proteica en forma de càpsida. Aquesta seria la composició comuna de tots els virus.

11.2. Tipus de virus (classificació de Baltimore):

Virus ADN

Aquells virus codificats en forma d'ADN són anomenats virus d'ADN. Com a característica general aquest tipus de virus s'acostumen a replicar a l'interior del nucli cel·lular, utilitzant les proteïnes de la cèl·lula hoste. Dins d'aquest tipus de virus, els podem classificar en tres subtipus: Virus d'ADN bicatenari (Grup I), virus d'ADN monocatenari (Grup II) i virus d'ADN bicatenari retrotranscrit (Grup VII).

Els virus d'ADN bicatenari (Grup I) organitzen el seu material genètic d'ADN de doble cadena, similar al que trobem a les cèl·lules eucariotes. A aquest grup I forma part el virus de la varicel·la, el papil·loma humà (VPM) i l'herpes comú. Els virus d'ADN bicatenari es caracteritzen per la necessitat que tenen de què la cèl·lula infectada entri a la fase de replicació cel·lular, donat que són dependents de les polimerases. Hi ha excepcions en què aquests virus poden induir la divisió cel·lular en les cèl·lules que actuen com hostes, és per aquesta raó que alguns virus d'ADN bicatenari arriben a tenir relació amb alguns tipus de càncer.

Els virus d'ADN monocatenari (Grup II) organitzen el seu material genètic d'ADN de cadena senzilla. Per tal que aquests virus aconseguixin replicar-se dins de la seva cèl·lula hoste és necessari que en la infecció d'aquesta, la cadena senzilla d'ADN es transformi en una doble cadena d'ADN. Dins d'aquest grup II formen part virus com el Parvovirus V19 humà i bacteriòfags de les famílies *Inoviridae* i *Microiridae*.

Els virus d'ADN bicatenaris retrotranscrits (Grup VII) es caracteritzen principalment per la utilització de la transcriptasa inversa⁷⁶ durant el cicle reproductiu. La transcriptasa inversa⁷⁶ es tracta d'un conjunt d'enzims de tipus ADN-polimerasa que tenen la funció de sintetitzar ADN de doble cadena utilitzant com a motlle ADN, és a dir, que sintetitza "al revés". Això vol dir que al contrari d'altres ADN-polimerases, pot obtenir una molècula d'ADN bicatenari a partir d'un ARN monocatenari. Dins del grup VII el virus més conegut és el virus de l'hepatitis B.

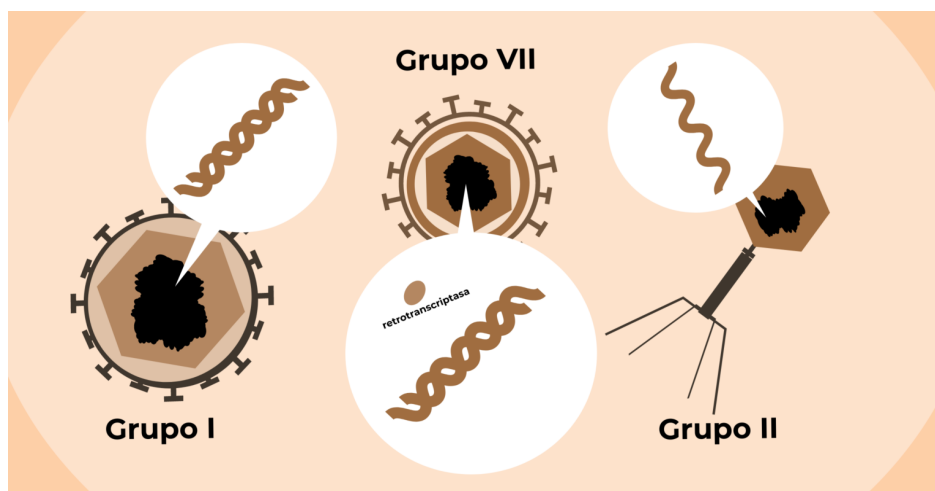


Figura 33: Mostra els virus d'ADN i la seva "forma". (Extret de genotipia)

Virus ARN

Aquells virus codificats en forma d'ARN són anomenats virus d'ARN. Dins d'aquest tipus de virus, els podem classificar en quatre subtipus: Virus d'ARN bicatenari (Grup III), virus d'ARN monocatenari positiu (Grup IV), virus d'ARN negatiu (Grup V) i virus d'ARN bicatenari retrotranscrit (Grup VI).

Els virus d'ARN bicatenari (Grup III) organitza el material genètic en ARN de doble cadena i es replica en un medi citoplasmàtic. Donat aquest fet, no depenen dels aparells de replicació de l'ADN de la cèl·lula hoste. Dins d'aquest grup III es troben els virus del gènere *Rotavirus*.

Els virus d'ARN monocatenari positiu (Grup IV) organitzen el seu material en molècules d'ARN monocatenari en sentit positiu, és a dir, que la seqüència d'ARN viral pot ser traduïda directament per les proteïnes virals desitjades. Una de les característiques més important d'aquest virus en la polaritat del seu ARN, ja que aquest tipus de virus tenen la mateixa polaritat que l'ARNm cel·lular, donat que el virus arriba amb l'orientació positiva facilita l'arribada a la cèl·lula tenint una traducció directa. Virus com l'hepatitis A, la febre groga, el refredat comú, el SARS-CoV-2 formen part del grup IV.

Els virus d'ARN monocatenari negatiu (Grup V) organitzen el seu material, al contrari que el grup IV, en molècules d'ARN monocatenari en sentit negatiu. Aquest tipus de virus ha de transformar l'ARN de polaritat negativa en ARN de sentit positiu mitjançant un ARN-polimerasa per a poder replicar-se dins el seu hoste. És

aquest motiu pel qual els virus del grup V a vegades aporten a la infecció de manera conjunta al seu material genètic un ARN-polimerasa o transcriptasa. L'Ebola, el virus de la grip, el xarampió o el virus de la ràbia són virus d'ARN monocatenari negatiu.

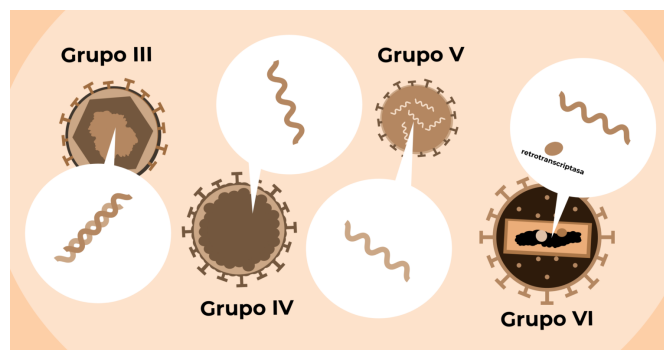


Figura 34: Mostra els virus d'ARN i la seva "forma". (Extret de genotipia)

11.3. Adenovirus oncolítics

L'adenovirus pertany al grup I (virus d'ADN bicatenari) de la classificació de Baltimore, això el cataloga com a un dels virus més estables, donat que té una doble cadena d'ADN. Aquests virus destaquen per aconseguir propagar-se per cèl·lules que realitzen la mitosi o no. Els adenovirus poden provocar malalties respiratòries o digestives no greus. Els adenovirus oncolítics, virus modificats genèticament per al tractament de càncers, se'ls coneix per CRAds (adenovirus de replicació condicional). Les modificacions realitzades impliquen una modificació en el virus per tal que només es reproduïxin en les cèl·lules tumorals. Els adenovirus inalterats s'enganxen a cèl·lules normals en unir-se a les proteïnes situades a les membranes cel·lulars. Les proteïnes receptores acostumen a trobar-se en cèl·lules sanes no en cèl·lules canceroses. En virtut d'això, els científics modifiquen als virus per tal que no puguin unir-se a les proteïnes receptores, per evitar infeccions en cèl·lules sanes. A més a més, els adenovirus permeten modificar la seva genètica per tal de tenir la capacitat d'identificar, infectar i destruir aquelles cèl·lules tumorals amb més precisió. Estudis preclínics demostren que l'adenovirus oncolític com a teràpia adjuvant⁷⁵ a la quimioteràpia podrien provocar bons resultats en la millora del pacient.

12. Treball de camp

12.1. VCN Biosciences com Empresa

Per poder realitzar i informar-nos més sobre el treball escollit, vam contactar amb l'empresa VCN Biosciences. VCN Biosciences SL és una empresa privada centrada en el desenvolupament de nous enfocaments terapèutics per a tumors que no tenen tractament eficaç. Es centra en el desenvolupament dels tractaments contra el càncer utilitzant una plataforma d'un adenovirus oncolític, categoria de virus que s'associa a una tecnologia per a la seva producció i forma d'actuar. L'empresa fa servir una plataforma tecnològica d'adenovirus oncolític per dissenyar agents altament selectius i eficients que es repliquen i autoamplifiquin exclusivament en cèl·lules tumorals. Actualment, VCN Biosciences té diferents virus oncolítics de diferents tecnologies en diferents fases clíniques (*Figura 35*).



Figura 35: Fotografia realitzada per nosaltres des de l'exterior de les instal·lacions.

12.2. Missió

La missió de VCN Biosciences és el desenvolupament de nous agents per al tractament del càncer basats en adenovirus oncolítics amb alta potència i selectivitat. De cara al futur VCN Biosciences voldria aplicar el tractament no només al retinoblastoma sinó a altres tipus de càncer, als quals ja s'estan fent proves per acceptar-los i poder aplicar-los.

12.3. Tecnologies

VCN Biosciences utilitza una plataforma tecnològica basada en adenovirus oncolítics per generar candidats viro terapèutics. La viroteràpia és un enfocament terapèutic per al tractament del càncer basat en l'ús de virus capaços de replicar i lisar⁴⁹ selectivament cèl·lules tumorals (virus oncolítics). Aquesta nova classe d'agents anticancerígens dirigits té un mecanisme d'acció únic en comparació amb altres fàrmacs contra el càncer, ja que poden respondre a la manca de funció d'una proteïna (actuen en absència d'una diana) i són capaços d'autoampliar-se i propagar l'efecte oncolític (reduint la dosi necessària per arribar a les cèl·lules tumorals).

Entre els diferents eixos vertebrals desenvolupats per a la viroteràpia, els virus oncolítics derivats de l'adenovirus humà tipus 5 (Ad5wt) són especialment atractius atesa la limitada patogenicitat d'aquest virus i la possibilitat de controlar l'expressió dels seus gens.

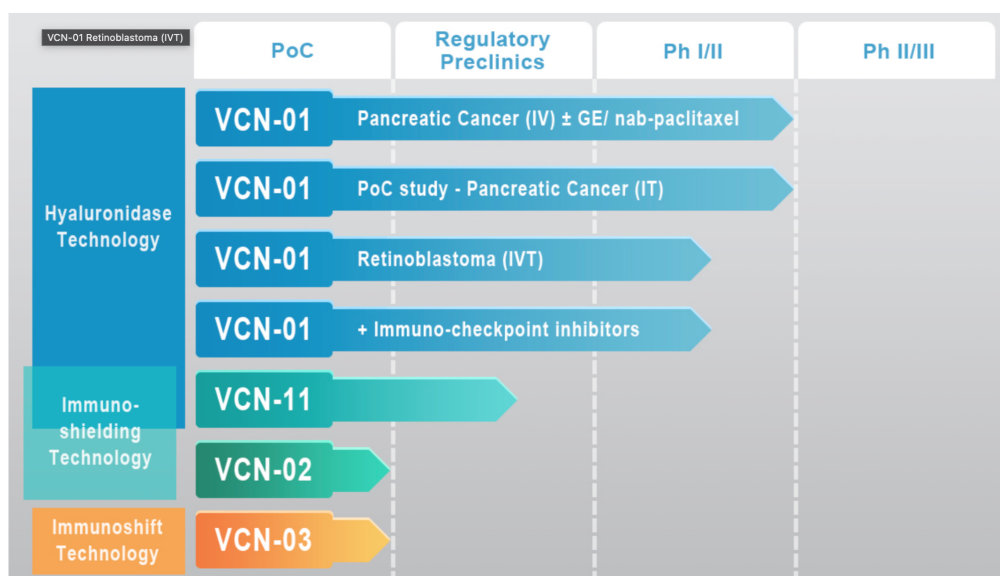


Figura 36: Diferents virus oncolítics de diferents tecnologies en diferents fases clíniques. (Extret de VCN Bioscience web)

Les descripcions de les remissions del càncer després de les infeccions per virus es remunten a fa un segle. Els intents terapèutics inicials amb virus contra el càncer publicats fa 50 anys utilitzaven virus no dissenyats. Durant l'última dècada, els virus oncolítics s'han modificat genèticament per completar el seu cicle viral exclusivament en cèl·lules que expressen funcions que caracteritzen les cèl·lules tumorals. En virtut d'aquestes modificacions, la replicació viral està relacionada amb alteracions genètiques dels tumors humans. El seu valor en el tractament del

càncer s'ha demostrat en diferents estudis preclínic i clínic de fase I, II i III.

12.4. Hialuronidasa

La hialuronidasa ha estat una tecnologia que ha actuat millorant la propagació intratumoral⁴³ dels virus oncolítics, cosa que permet al virus destruir les cèl·lules tumorals amb més eficàcia. Majoritàriament, els càncers estan formats per cèl·lules tumorals i una part important del teixit acompanyant conegut com a estroma²⁶ tumoral o desmoplàsia¹⁹. Aquest estroma²⁶ limita la disseminació de medicaments quimioterapèutics i virus oncolítics. L'expressió de la hialuronidasa (enzim) dels virus oncolítics de VCN degrada l'àcid hialurònic dins de l'estroma²⁶ tumoral i millora la propagació del virus. Aquesta tecnologia de la hialuronidasa està incorporada en el VCN-01, principal virus oncològic de la companyia, que també es caracteritza per la millorada orientació tumoral⁶⁰. Els investigadors de VCN Biociències corroboren la bona eficàcia antitumoral del producte creat, després de diversos assaigs d'administració que ha passat amb bon nivell de seguretat i tolerabilitat. El potencial terapèutic d'aquest adenovirus oncolíctic que expressa hialuronidasa s'ha estudiat la seva eficàcia en diferents casos, com ara en tumors cerebrals, osteocarnes pediàtrics i retinoblastomes.

12.5. VCN-01

Per entendre el VCN-01, primer hem de conèixer com funciona un retinoblastoma. Els nous coneixements sobre la biologia i la genètica del retinoblastoma han proporcionat pistes terapèutiques. En la majoria dels casos de la inactivació bi-al·lèlica⁶ del gen supressor de tumors del retinoblastoma 1 (RB1), situat al cromosoma 13 resulta la malaltia. Les cèl·lules de la retina revelen un estat disfuncional de la proteïna del retinoblastoma (RB1), que afavoreix la divisió cel·lular descontrolada i inicia l'oncogènesi⁵⁸ del retinoblastoma. A les cèl·lules normals, la proteïna RB1 funcional s'uneix als factors de transcripció E2F lliures, formant un complex que inhibeix la proliferació cel·lular⁶⁷. Els E2F són una àmplia família de factors de transcripció amb dominis d'unió a l'ADN conservats que s'uneixen a promotors diana controlant l'expressió dels reguladors clau del cicle cel·lular. És a dir, E2F és un factor de transcripció involucrat en el control del cicle cel·lular. Regula l'expressió de gens necessaris per entrar a la fase S (*de síntesi de*

l'ADN) i el pas del seu punt de control. En rebre un senyal mitogènic⁵², RB1 és fosforilada²⁹ per quinases⁶⁹ dependents de ciclina¹⁵, provocant la incapacitat d'unir-se a E2F i promoure la progressió del cicle cel·lular de G1 a S. En el retinoblastoma, la inactivació de RB1 elimina la restricció al control del cicle cel·lular i augmenta constitutivament l'expressió d'E2F lliure. La supressió heterozigota del gen E2F1 impedeix l'activació del retinoblastoma en models murins⁵⁴. Orientar els esdeveniments associats amb la disfunció de RB1 i l'augment de l'expressió E2F representa una estratègia potencial en el tractament del retinoblastoma.

VCN-01 és un adenovirus oncolític de grau clínic modificat genèticament a partir d'adenovirus tipus 5 (*Ad5*) dissenyat per replicar-se en cèl·lules canceroses amb una via RB1-E2F alterada, com bé hem explicat. Les modificacions inclouen una supressió de 24 parells de bases en el gen de l'adenovirus E1A que impedeix la replicació viral en cèl·lules funcionals RB1 i la inserció d'un promotor E2F1 sota el gen E1A que permet el control transcripcional en cèl·lules amb alta expressió d'E2F-1 lliure.

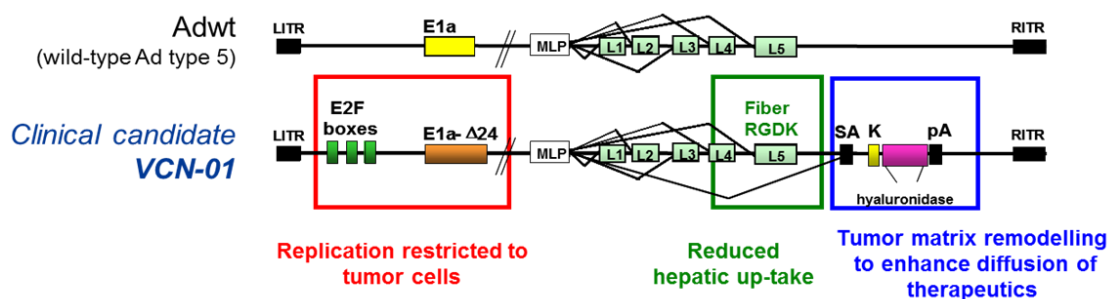


Figura 37: Esquema d'un virus 1 type⁷⁸ i d'un virus genèticament modificat. Imatge de VCN Biosciences.

(Imatge proporcionada per Miriam Bazán)

Ad5 es format per una càpsida proteica icosaèdrica d'uns 80 nm de diàmetre sense embolcall lipídic. Les cares de l'icosaedre estan formades per una proteïna estructural anomenada hexon. En cadascun dels dotze vèrtexs de la càpsida hi ha una proteïna coneguda com a fibra, que s'uneix al receptor cel·lular primari del virus, el receptor Coxsackie¹⁷-Adenovirus (CAR⁴¹) 1. Els receptors cel·lulars implicats en l'entrada d'adenovirus a les cèl·lules hostes¹³ inclouen el receptor d'adenovirus coxsackie¹⁷, una glicoproteïna expressada en tumors que inclouen les

línies cel·lulars de retinoblastoma Y79 i WERI-Rb1 i v3 i v5 integrines⁴⁰, que són receptors expressats per diversos tipus de càncer. Les integrines⁴⁰ CAR⁴¹ i v medien la unió de l'adenovirus a la superfície cel·lular. El genoma viral està empaquetat dins de la càpsida i és un ADN lineal de doble cadena de 36 Kb que s'allibera al nucli després d'haver penetrat i injectar el material genètic el virus per tal que arribi a la membrana nuclear. A més, un cassat d'expressió de hialuronidasa inclòs a VCN-01 millora la propagació intratumoral⁴³ del virus degradant la matriu extracel·lular. Mitjançant aquests mecanismes, VCN-01 infecta selectivament i es replica a les cèl·lules canceroses, donant lloc a una activitat antitumoral en diversos models de càncer.

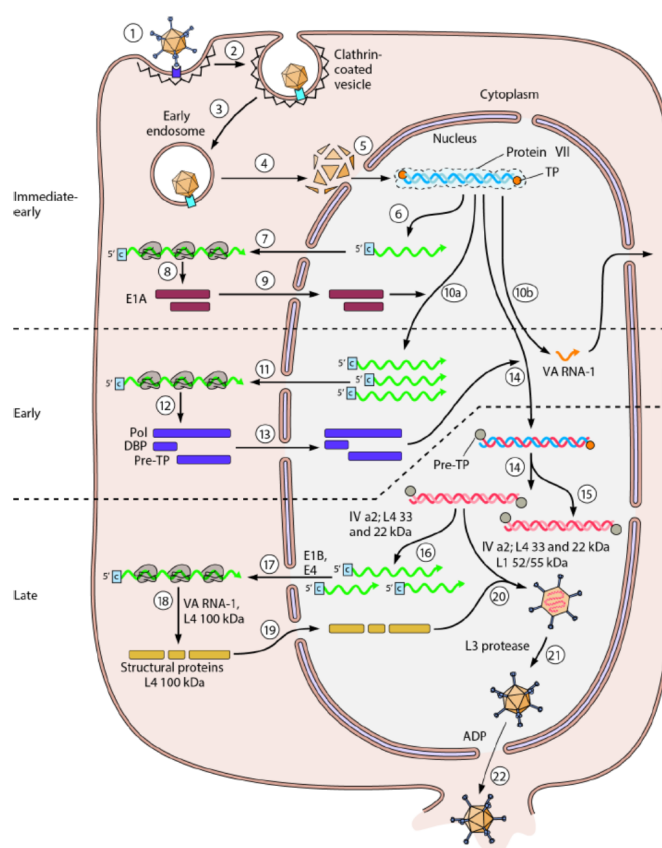


Figura 38: El cicle infecció dels adenovirus humans. El cicle d'infecció dels adenovirus es pot dividir en esdeveniments específics de temps: entrada de cèl·lules d'adenovirus (passos 1-3), desmuntatge de la càpsida i importació del genoma al nucli (passos 4-5), expressió del gen E1A immediata i primerenca (passos 6-9), transcripció intervinguda per E1A de gens primerencs virals (pas 10a), traducció de proteïnes primerenques virals (passos 11-13), replicació de l'ADN viral (passos 14-15), transcripció i traducció de gens tardans virals (passos 16-19), muntatge de la càpsida i maduració del virió (passos 20-21) i alliberament de descendència del virus (pas 22). *Imatge de la tesi doctoral Martí Ferrera Sal*

Totes les modificacions genètiques de VCN-01 esmentades anteriorment, en definitiva són: la inserció d'un promotor sintètic específic del tumor que restringeix

l'expressió de proteïnes virals a les cèl·lules tumorals. La supressió parcial del gen E1A (mutació $\Delta 24$) que inhibeix la replicació viral en cèl·lules normals. La substitució RGDK⁷⁰ de KKTK⁴⁷ a la proteïna de fibra adenovirus que dona lloc a una millor infectivitat del tumor i una infecció hepàtica més baixa. I la inserció d'un casset d'expressió per l'ADNc d'esperma hialuronidasa humana (PH20), un enzim degradador de matriu que permet reduir la pressió del fluid intersticial dins de la massa tumoral.

12.6. Funcionament del virus

Quan un virus oncolític infecta una cèl·lula no afectada no es realitza cap mutació ni perjudica la cèl·lula per contra quan un virus oncològic infecta una cèl·lula cancerosa, el DNA del virus és capaç d'enviar mutacions que permeten la replicació viral. Aquest virus s'autoamplifica, genera centenars de còpies del mateix i elimina les cèl·lules infectades i exposa al tumor als antígens, aquest virus segueix en funcionament i infecta altres cèl·lules canceroses més properes per continuar amb la propagació del virus i l'eliminació d'aquestes (Figura 37).

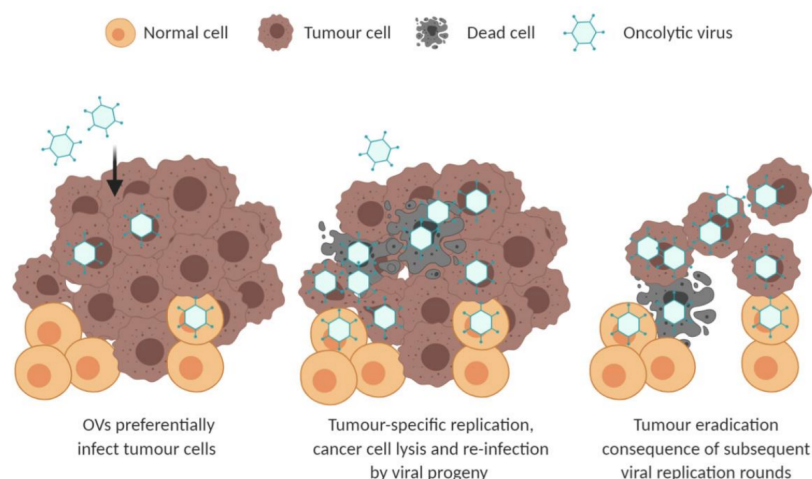


Figura 39: Actuació del virus on ens mostra el seu funcionament. *Imatge de Tesis doctoral de Martí Ferrera Sal.*

Un component important de la matriu extracel·lular és l'àcid hialurònic, que es caracteritza per tenir una única capacitat d'aferrar i retenir les molècules d'aigua, en càncers altament agressius la quantitat d'àcid hialurònic és molt més elevada. Un enfocament terapèutic clau és l'enginyeria genètica d'un adenovirus oncolític per expressar un enzim anomenat hialuronidasa pH20, la combinació de la destrucció

directa de cèl·lules canceroses per adenovirus oncolítics que exposen a més antígens nous juntament amb la degradació de l'àcid hialurònic per pH20 faciliten l'activitat de propagació del virus dins del tumor. Aquesta teràpia també atrau les cèl·lules immunitàries i permet que la teràpia (químic) i els anticossos terapèutics entrin al tumor. El virus es pot administrar de manera segura per via intravenosa a dosis molt altes. Després circula dins del torrent sanguini i arriba als llocs metastàtics. No obstant això, alguns pacients han estat exposats de manera natural a adenovirus durant la infància i tenen alts nivells d'anticossos antiadenovirus que s'uneixen i neutralitzen els adenovirus. Per evitar-ho, es modifica genèticament alguns dels adenovirus oncolítics per unir una proteïna natural de la sang anomenada albúmina. Aquesta unió es produeix tan bon punt el virus entra al torrent sanguini. Crea un escut contra els anticossos neutralitzants i permet que el virus arribi als signes metastàtics.

12.6.1. Albúmina

L'escut d'albúmina protegeix els adenovirus dels anticossos neutralitzants preexistents quan s'entreguen de manera sistèmica. L'eficàcia dels adenovirus utilitzats com a vacunes, vectors de teràpia gènica i virus oncolítics sovint es veu limitada per l'exposició prèvia d'adenovirus en humans que condueix al desenvolupament d'anticossos neutralitzants que inactiven els adenovirus quan s'administra per via intravenosa. Evitar els anticossos neutralitzants és necessari per aconseguir infeccions múltiples i aconseguir un tractament eficaç del càncer. Es va inserir un domini d'unió a l'albúmina (ABD) a la càpsida de l'adenovirus de manera que quan el virus és a la sang, l'albúmina natural es pot unir a l'adenovirus ABD i protegir-lo dels anticossos antiadenovirus neutralitzadors. Els científics han demostrat recentment que els adenovirus no modificats es neutralitzen completament en ratolins preimmunitzats, mentre que l'adenovirus ABD pot transduir tumors de manera eficient, mostrar activitat antitumoral i generar respostes immunes a les proteïnes expressades (Rojas LA et al., JCR, 2016). La tecnologia ABD està integrada al segon candidat terapèutic VCN-11 de VCN Biosciences.

El VCN-1 és un adenovirus oncolíctic dissenyat per evadir anticossos neutralitzants contra adenovirus, replicar-se en cèl·lules canceroses amb una via RB1

disfuncional, exposar neoantígens tumorals de tumors lisats⁴⁹, millorar l'orientació del tumor del virus, expressar hialuronidasa per millorar la propagació intratumoral⁴³ del virus i facilitar la quimioteràpia i l'extravasació cel·lular al tumor.

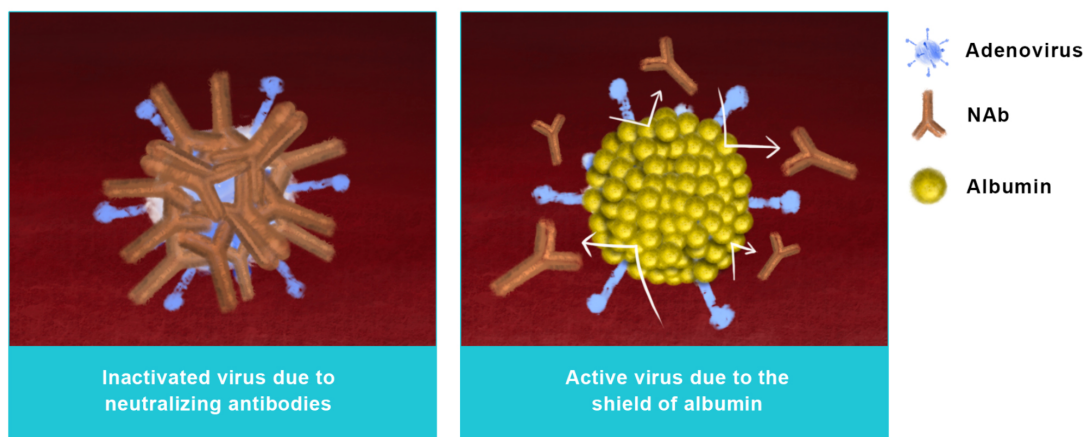


Figura 40: Simulació de quina funció fa l'albumina. *Imatge de VCN Biosciences.*

12.6.2. Immunoshift

La tecnologia *Immunoshift* desenvolupada pels científics de VCN ha aconseguit supressions funcionals en els epítops²⁵ de cèl·lules T¹⁴ immunodominants presents a l'adenovirus oncolític, la qual cosa permet una activació més eficient de les respostes immunes antitumorals. Cal destacar que aquestes supressions d'epítops²⁵ de cèl·lules T¹⁴ funcionals no s'associen amb una citotoxicitat reduïda o una replicació viral reduïda en comparació amb un adenovirus parental. Els adenovirus oncolítics que inclouen la tecnologia d'immunoshift són capaços de produir respostes immunes antitumorals de manera més eficient en comparació amb els seus homòlegs no modificats, quan es prova tant en un model de vacunació contra el tumor com en un model de tumor establert.

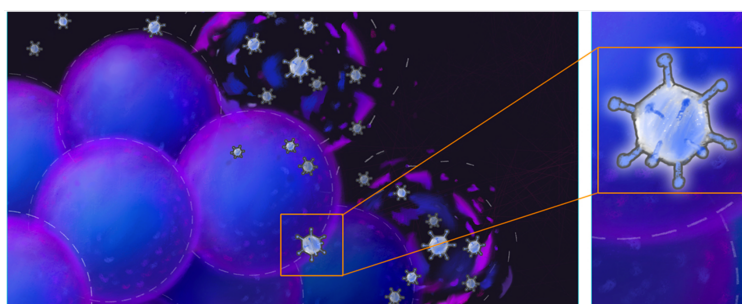


Figura 41: Representació del Immunoshift. (Extret de VCN Bioscience web)

12.6.3. T1 Bioselecció

La tecnologia T1 es basa en una mutació puntual en el genoma de l'adenovirus que millora les propietats oncolítics de l'adenovirus. La tecnologia T1 proporciona un mecanisme nou per augmentar l'alliberament d'adenovirus de les cèl·lules tumorals infectades. La mutació T1 elimina el domini de retenció del reticle endoplasmàtic de la proteïna E3/19K de l'adenovirus. Aquesta supressió millora la potència oncolítica de l'adenovirus en línies de cèl·lules tumorals humanes i fibroblasts²⁸ associats al càncer in vitro⁴⁵, i l'activitat antitumoral quan el virus s'injecta intratumoralment⁴³ o sistèmicament in vivo⁴⁶. Aquesta tecnologia ha estat sublicència a ORCA Therapeutics (Països Baixos).

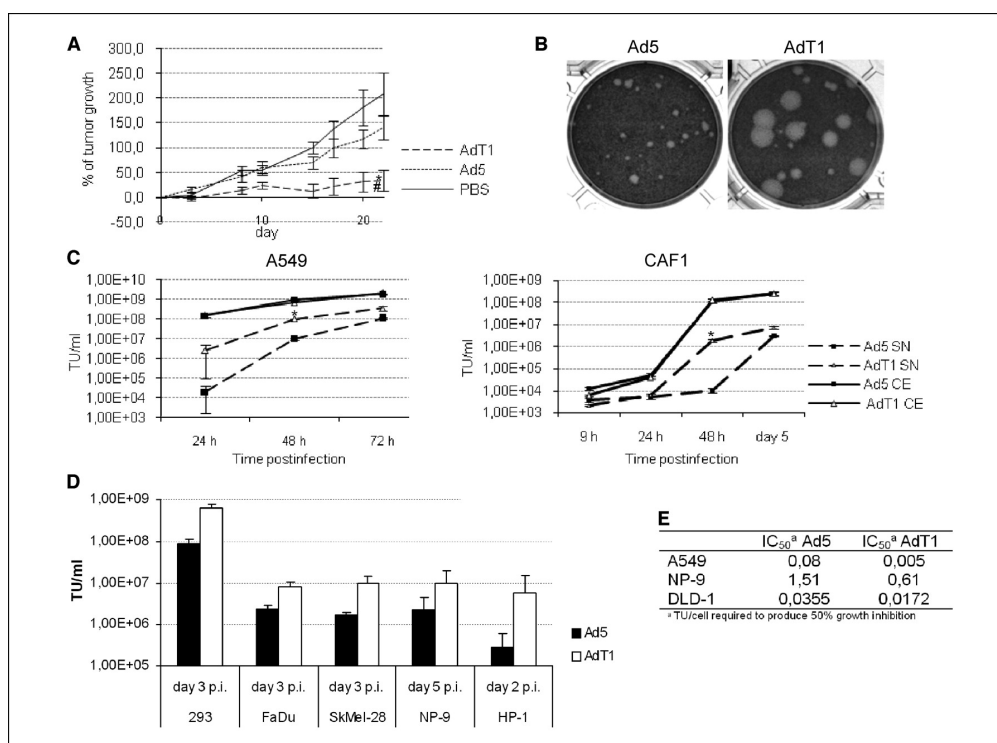


Figura 42: Caracterització del fenotip d'AdT1. A, els xenografts de tumor NP-9 es van tractar i.v. amb PBS, Ad5 o AdT1. Punts, percentatge mitjà de creixement del tumor. B, mida de la placa d'Ad5 i AdT1 a les cèl·lules A549 el dia 7 després de la infecció. C, producció viral i cinètica d'alliberament d'Ad5 i AdT1 en cèl·lules A549 (esquerra) i fibroblasts²⁸ associats al carcinoma (cèl·lules CAF1; dreta). D, alliberament viral d'Ad5 i AdT1 en un panell de diferents línies de cèl·lules tumorals. Títol del sobrenedant en el moment en què AdT1 i Ad5 van mostrar les diferències més grans per a cada línia cel·lular. E, citotoxicitat comparativa d'Ad5 i AdT1 en línies cel·lulars tumorals A549, NP-9 i DLD-1.

(https://www.researchgate.net/figure/Characterization-of-the-phenotype-of-AdT1-A-NP-9-tumor-xenografts-were-treated-iv_fig1_23441713)

12.6.4. VCN-01 en retinoblastoma

Com qualsevol investigació científica, s'ha de poder demostrar de si realment la teva teoria és certa o no i si funciona. En el cas del VCN 01 en retinoblastoma s'han dut a terme moltes proves abans d'administrar-lo en un pacient. Van haver de comprovar si el retinoblastoma seria un objectiu terapèutic i per veure si VCN 01 funcionaria en aquest.

Primer van fer una demostració de si realment els retinoblastomes expressen proteïnes que a més permeten que infecti el virus i es repliqui. Si és de color blau no hi ha proteïnes, és a dir el virus és poc probable que pugui reproduir-se. Per confirmar si el que es deia teòricament és veritat o no.

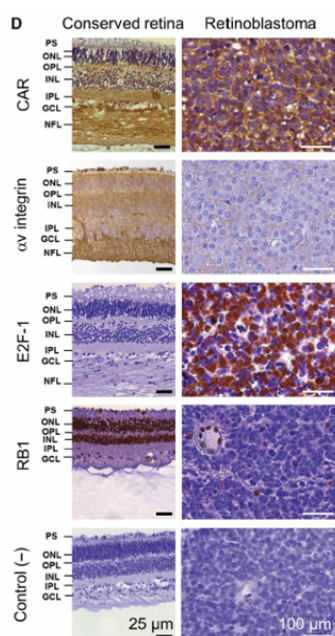


Figura 43: VCN-01 en retinoblastoma. Casos representatius de tinció de CAR⁴¹, integrina α_v , E2F-1 i RB1 en mostres humanes, El portaobjectes de control (-) van ser tractats amb cap anticòs primari. Les imatges mostren zones seleccionades de la retina conservada i del retinoblastoma. PS, segments fotoreceptors; ONL, capa nuclear externa; OPL, capa plexiforme externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de les cèl·lules ganglionars; NFL, capa de les fibres nervioses.

(Imatge del paper Guillem Pascual-Pasto^{1,2}, 2019)

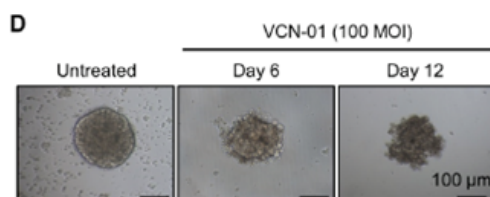


Figura 44: Activitat oncolítica del retinoblastoma. Podem observar un cultiu esferoide de cèl·lules tumorals. A l'esquerra es pot observar

un esferoide de cèl·lules tumorals que no ha rebut cap tractament i està creixent, a la vegada al seu voltant les cèl·lules tumorals estan sent eliminades. En canvi, a l'inserir-li el virus, al cap de 6 dies com es pot comprovar a la imatge l'esferoide s'ha reduït i continua el procés d'eliminació de les cèl·lules tumorals, després de 12 dies es pot veure com totes les cèl·lules tumorals han sigut eliminades, és a dir, han mort. *Imatge del paper Guillem Pascual-Pasto1,2, 2019*

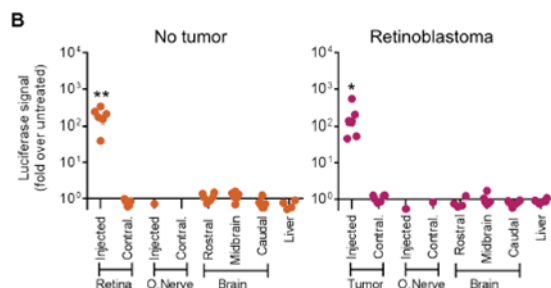


Figura 45: Biodistribució. Aquest són els requisits que et demanen a la part regulatòria, això vol dir a l'Agència Espanyola de Medicaments per poder aprovar el tractament amb animals, específicament amb ratolins. Injecten intravitriament al ratolí sense tumor luciferasa signal (transgèn amb el qual es mesura l'expressió gènica). Normalment, a la teràpia gènica s'utilitzen virus reporters. A l'ull d'infecció, en aquest cas la retina, la injectada i la contralateral trobem que a la injectada hi ha molta quantitat d'expressió gènica, en canvi, a la contralateral (l'ull del costat) no hi ha cap expressió gènica. El mateix succeeix en el retinoblastoma, no hi ha cap expressió gènica ni al tumor, ni nervi òptic ni al cervell. Això vol dir que el virus no es mou d'on l'injectes. *Imatge del paper Guillem Pascual-Pasto1,2, 2019*

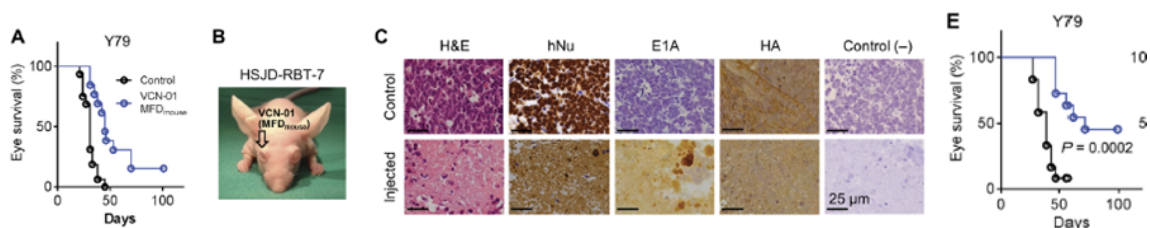


Figura 46: (B) T'informa de com està el ratolí afectat, però només li van injectar a un ull el virus (VCN-01). Es pot observar que l'ull que no ha sigut injectat sobresurt notablement. (A) la supervivència del Y79 explica la supervivència de l'ull, el cent per cent vol dir que tots estan vius, cada línia que baixa vol dir que un ull no ha aguantat el procés. El 50% dels ulls es van haver d'extreure, concretament al dia 45 d'aplicar el virus. El 40% dels ulls són curats amb dues injeccions cent dies després i si a partir d'aquesta xifra de dies el tumor no ha crescut, vol dir que ja no creixerà més. Arriben a la conclusió que dues injeccions serà més eficaç que una. (C) En el cas dels injectats el marcador està d'un color més fluixet i el motiu és perquè n'hi ha moltes cèl·lules necròtiques. *Imatge del paper Guillem Pascual-Pasto1,2, 2019*

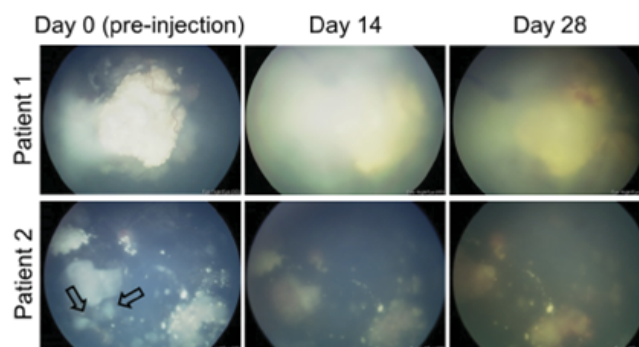


Figura 47: Primera injecció realitzada a First-in-human. Aquestes imatges pertanyen als ulls dels pacients, les parts blanques que podem associar amb la forma dels núvols són els tumors, la terbolesa que veiem al voltant és perquè el tumor està creixent. Podem observar que a partir dels catorze dies el virus va començar a fer la seva funció i començar a eliminar el tumor. Imatge del paper Guillem Pascual-Pasto^{1,2}, 2019

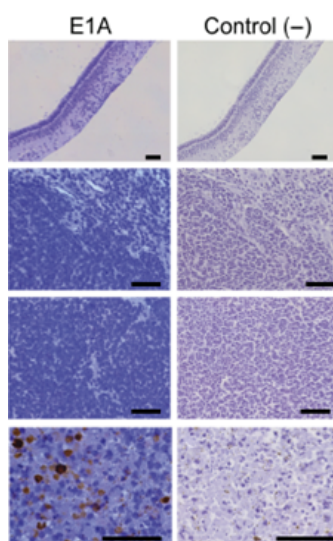


Figura 48: Com es pot veure al E1A no va haver-hi tinció, no com al control (-) per tant, com a conclusió van obtenir que el E1A és el més eficaç per ser injectat a futurs pacients. Imatge del paper Guillem Pascual-Pasto^{1,2}, 2019

Amb aquests resultats, van estudiar l'eficàcia preclínica, la farmacocinètica i la seguretat de l'adenovirus oncolític VCN-01 administrat per via intravítrea⁴⁴ en el retinoblastoma, amb èmfasi en la determinació de la selectivitat de VCN-01 per a cèl·lules amb una via RB1 disfuncional. Primer, van recollir mostres humanes per a anàlisis d'expressió gènica i proteïnes per determinar si els objectius de la infecció i la replicació virals estaven sobre expressats significativament en els tumors en comparació amb la retina humana en desenvolupament. Paral·lelament, van establir models de tumors derivats de pacients cultivats en medi lliure de sèrum com a esferes tumorals i fibroblasts²⁸ amb la mutació RB1 homozigota o

heterozigota inserida per CRISPR-Cas9. Diverses cèl·lules derivades del pacient i la línia cel·lular Y79 es van empeltar ortotòpicament⁶¹ en ratolins per avaluar l'eficàcia del VCN-01 intravítrea⁴⁴ a les dosis màximes. A dosis més baixes i clínicament rellevants, van comparar l'eficàcia de dues administracions de VCN-01 amb quimioteràpies de cura estàndard. Els punts finals dels experiments es van definir un cop realitzats tots els experiments i es van construir corbes de Kaplan-Meier¹⁶ per a les anàlisis de supervivència ocular. Per finalitzar, es van realitzar estudis de biodistribució i toxicitat en ratolins i conills utilitzant almenys sis mostres per punt de temps. Tots els animals es van assignar aleatòriament a grups de tractament. L'avaluació de la patologia va ser cega. Els resultats de l'estudi preclínic es van utilitzar com a base per a l'assaig de fase 1 primer en nens de VCN-01 per al retinoblastoma.

Les intervencions terapèutiques per a nens amb retinoblastoma quimiofractari es limiten actualment a l'enucleació²⁴ de l'ull, la qual cosa provoca pèrdua de visió en ulls funcionals i és percebuda per moltes famílies com un procediment mutilant, tot i que controla de manera eficient la difusió metastàtica de la malaltia. En aquest estudi, hem utilitzat una gran plataforma preclínica de models de retinoblastoma, cèl·lules editades per gens que recapitulen la via RB1 disfuncional i espècies animals adequades per a estudis de biodistribució i toxicitat. Demostren que l'adenovirus oncolític VCN-01 dirigit a l'alteració genòmica canònica dels retinoblastomes humans era actiu, selectiu tumoral, segur i clínicament traduïble, proporcionant una nova opció terapèutica per salvar la visió en aquests nens. Els pacients amb retinoblastoma i inactivació de RB1 serien candidats adequats per al tractament amb VCN-01 perquè els seus tumors expressen abundantment la diana molecular E2F-1 per a la replicació del virus, tal com demostren el nostre estudi i altres.

Un dels principals objectius d'aquestes proves va ser demostrar la selectivitat tumoral del tractament en pacients molt joves les retines dels quals encara estaven en desenvolupament (és a dir, cèl·lules en procés de divisió o migració) i pacients amb mutacions RB1 de la línia germinal (és a dir, nens amb risc de desenvolupar una malaltia bilateral). En el primer cas, la baixa expressió del gen E2F1 trobat a les retines en desenvolupament va ser coherent amb l'expressió sostinguda de

RB1 a les retines fetals del ratolí i humans normals durant el desenvolupament. La primera experiència en un pacient pediàtric va recolzar encara més la manca de replicació viral a la retina. En el cas de pacients amb mutacions de la línia germinal, va haver-hi una manca de tinció de proteïna E2F-1 en fragments de retina conservats d'ulls enucleats va significar que VCN-01 no es replicaria als seus teixits normals de la retina. Així, la replicació de VCN-01 selecciona tumors, i no retines, als pacients amb retinoblastoma, inclosos nens molt petits i pacients amb mutacions de la línia germinal.

L'expressió diferencial dels receptors del virus en cultius cel·lulars podria explicar en part la diferent susceptibilitat de cada cultiu al tractament. Per exemple, la selectivitat dels receptors d'integrina incorporada per l'edició gènica de VCN-01 podria explicar per què les cèl·lules derivades de la sembra vítria del primer pacient, que no mostraven expressió d'integrina, eren resistents al tractament amb VCN-01, mentre que les cèl·lules derivats del tumor de retina del mateix pacient, que mostraven expressió positiva d'integrina, van ser molt sensibles en el nostre estudi.

Es descrivia una eficàcia antimetastàtica millorada de VCN-01 en comparació amb els animals tractats només amb enucleació²⁴ (controls no tractats), cosa que es podria explicar per un control local millorat dels tumors en animals tractats amb VCN-01, donant lloc a una supervivència ocular prolongada. Un estudi preclínic en ratolins va demostrar que un virus oncolític de la vall de Seneca 001 inhibia la metastasi de la línia cel·lular Y79 al cervell en comparació amb cap tractament, tot i que en aquest estudi la via d'administració era intravenosa.

Traducció humana

Els dos primers pacients que van rebre dues injeccions intravítries⁴⁴ de VCN-01 separades per catorze dies a 2×10^9 vp per ull (és a dir, 1/100MFDchildren) i 2×10^{10} vp per ull (és a dir, 1/10MFDchildren) en l'assaig clínic NCT08284226. Les injeccions intravítries⁴⁴ es van realitzar sota anestèsia general. Es van obtenir mostres de sang, superfície ocular i hisops³⁵ nasals per quantificar l'ADN viral abans i després de la injecció. Els exàmens oftalmològics van incloure tonometria, ERG i imatges RetCam abans de cada injecció (dies 1 i 14) i els dies 28 i 42

després de la primera dosi. També es va avaluar la morfologia del tumor i dels teixits mitjançant imatges de ressonància magnètica cerebral.

12.7. Laboratory experience at VCN

12.7.1. Descongelació de cèl·lules

Durant la nostra estança als laboratoris, ens van poder mostrar alguns dels passos que han de seguir per dur a terme les seves investigacions i seguir experimentant amb el virus per obtenir resultats sobre l'efecte del virus en cada cas. Vam començar per la descongelació d'unes cèl·lules, més concretament d'un melanoma (càncer de pell) d'un home de cinquanta-un anys. Aquest presentava càncer de pell i havíem de descongelar algunes de les cèl·lules extretes per investigar amb elles. Les cèl·lules es trobàvem congelades amb vapor de nitrogen líquid, no a -70°C , ja que podria provocar pèrdues de viabilitat. El procés que vam seguir per dur a terme la descongelació va ser el següent:

1. Vam descongelar el vial agitant suaument en un bany d'aigua a 37°C , per reduir la possibilitat de contaminació vam haver de mantenir la tapa fora de l'aigua. Aquest procés ha de ser ràpid (aproximadament 2 min).
2. Vam treure el tub del bany maria quan ja estava descongelat i descontaminat per immersió o polvorització amb un 70% d'etanol.
3. Seguidament, vam transferir el contingut del flascó a un matràs de cultiu de 75 cm^2 i el vam diluir amb el medi de cultiu complet recomanat.
4. Després vam haver d'incubar el cultiu a 37°C en una incubadora adequada amb un 5% de CO_2 en l'aire.

Aquest procés de descongelació cel·lular s'ha de realitzar de manera ràpida donat que si no el sulfòxid, substància tòxica que protegeix les cèl·lules del medi exterior, s'escapa i les cèl·lules podrien ser contaminades.

Un cop ja preparat el cultiu amb les cèl·lules descongelades vam passar-les a un nou cultiu:

1. S'havia de treure i rebutjar el medi de cultiu
2. Havien d'esbandir breument la capa cel·lular amb un 0,25% (p/v) de

Trypsina-0,53 mM EDTA solució per eliminar totes les traces de sèrum que conté inhibidor de la tripsina.

3. Després afegir 2,0 a 3,0 mL de solució Trypsin-EDTA al matràs i observar les cèl·lules al microscopi invertit fins que la capa cel·lular es dispersi (*generalment entre 5-15 min*).
4. Afegir 6,0 a 8,0 mL de medi de creixement complet i aspirar les cèl·lules pipetant suaument.
5. Afegir alíquotes adequades de la suspensió cel·lular, és a dir, el que hem deixat al recipient inicial a nous vasos de cultiu.
6. Incubar els cultius a 37 °C amb una renovació setmanal de dues a tres vegades per setmana.

Els cultius de cèl·lules un cop ja estan crescuts:

1. S'extreu el medi sobrant centrifugant les cèl·lules a 125G durant 5 o 10 minuts.
2. Per tal d'observar el creixement dels cultius cel·lulars cal numerar les cèl·lules segons la quantitat que hi hagi a cada quadrant de la càmera de Neubauer fent servir el microscopi. Amb aquest recompte es podrà obtenir un recompte aproximat del nombre de cèl·lules que han crescut.

12.7.2. Extracció del plasmidi bacterià

El segon procés que vam presenciar va ser l'extracció de plasmidi bacterià que més tard seria el genoma del virus oncològic en forma de plasmidi. Per dur a terme aquest procediment primerament crear cultius bacterians.

Vam crear 3 cultius bacterians diferents de 500 ml en tres matrassos Erlenmeyer de 2L. Cada cultiu de bacteris, amb el plasmidi amb el genoma del virus que ens interessa, es trobaven en un medi LB amb antibiòtics (cloranfenicol 12,5 ug/ml i streptomicina 1mg/ml). Les bacteries que contenen plasmidi tenen gens de resistència als antibiòtics esmentats anteriorment, per aquesta raó tenen la capacitat de créixer en aquest medi. Una vegada el medi bacterià està preparat, s'ha d'esperar entre 40-60 minuts per tal que el cultiu cel·lular pugui créixer. Un cop passat aquest període de temps es pot observar el creixement del cultiu per la

terbolesa del medi. Seguidament, partint d'un cultiu cel·lular molt crescut, per tal d'extreure les bacteries i separar-les del medi de cultiu, primer s'ha de fer una centrifugació a 6.000G a 4 °C durant 15. Per realitzar la centrifugació s'ha de canviar el recipient del cultiu i depenen de la quantitat de cultiu realitzat es necessitaran una o dues centrifugacions. Un cop finalitzada la/es centrifugació/ns es pot observar un conjunt de substància grisa anomenada pellet⁶³ a una cantonada del recipient, que correspon a les bactèries. Per tal d'obtenir el plasmidi de les bacteries van començar a seguir els passos del protocol de la Maxiprep⁵¹:

1. Resuspenem el sediment bacterià (pellet⁶³) en 10 ml Buffer⁸ P1.
2. Afegim 10 ml Buffer⁸ P2, barrajem invertint el recipient vigorosament entre 4-6 vegades i ho incubem a una temperatura d'entre 15-25°C durant 5 minuts.
3. Afegim 10 ml Buffer⁸ P3, barrajem invertint el recipient vigorosament entre 4-6 vegades. Incubem en gel durant 20 minuts.
4. Centrifugem a $\geq 20,000G$ per 30 minuts a 4°C. Re-centrifugem el sobrenedant $\geq 20,000$ a 15 minuts a 4°C.
5. Equilibrem a QIAGEN-tip 500 afegint 10 ml Buffer⁸ QBT, i permetre a la columna buida que dreni per gravetat.
6. Apliquem el sobrenedant del pas 4 al QIAGEN-tip i permetem l'entrada de la resina pel flux de la gravetat.
7. Rentem el QIAGEN-tip amb 2 x 30 ml Buffer⁸ QC. Permetent que el Buffer⁸ QC pugui moure's fins al QIAGEN-tip per la gravetat.
8. Eluïm el ADN amb 15 ml Buffer⁸ QF en un recipient net de 50 ml. Per a construccions majors de 45 kb, el pre-escalfament del buffer⁸ eluit a 65°C ajudarà a un garantir un millor rendiment.
9. Precipitem l'ADN afegint 10.5 ml (0.7 volums) d'isopropanol a temperatura ambient a l'ADN eluit i barrajem. Centrifugem a $\geq 15,000G$ per 30 minuts a 4°C.
10. Rentem el pellet⁶³ d'ADN amb 5 ml d'etanol 70% a temperatura ambient i centrifugem a $\geq 15,000G$ per 10 minuts.
11. Deixem assecar a l'aire lliure el pellet⁶³ durant 5-10 min i redissolvem l'ADN amb un volum de Buffer⁸ adient (TE buffer⁸, pH 8.0, o 10 mM Tris·Cl, pH 8.5).

En aquest procés en què hem aconseguit trencar els bacteris per alliberar el DNA d'aquest, ho vam fer amb una sèrie de buffers⁸ (resuspensió (P1), lisis (P2) i neutralització(P3)). Més endavant vam separar amb la columna el DNA bacterià del plasmídic. Aquesta columna es classifica per mida del DNA i per tant ens permetria aconseguir només el DNA amb la dimensió més petita i excloure la resta. A una altra columna hi utilitzem novament els buffers⁸ per netejar i extreure el DNA plasmídic, Un cop fet aquest procés afegim isopropanol i incubem un gel perquè el DNA precipiti i es pugui veure clarament. Nosaltres ho vam poder veure després de la centrifugació, la seva aparença era similar a la d'una taca blanca i es trobava al fons del tub. Finalment, ho vam recollir resuspenen-lo a un buffer⁸ d'elució i com a resultat vam obtenir el DNA plasmídic amb el genoma del virus que ens interessava usar.

12.7.3. Citotoxicitat

A l'empresa també van avaluar la citotoxicitat dels adenovirus en línies cel·lulars de cultiu. Per dur a terme aquesta avaluació vam necessitar línies cel·lulars (A549, SK-MEL-28, NP-18, MIAPaCa-2, HCT-116, etc.) i tipus d'adenovirus (Adwt, VCN-01, VCN-11, ICOVIR15K, etc.). Van manipular aquestes cèl·lules i virus a unes instal·lacions amb grau equivalent a la contenció de nivell de bioseguretat 2 (BSL2), a més a més de la utilització de guants i bata.

Primerament, vam infectar les cèl·lules tumorals amb dilucions en sèrie dels adenovirus corresponents amb 200, 500 o 1000 MOI⁵³, depenent de la línia cel·lular.

Cell type	Cell line	Cells/well	Initial MOI	Serial dilution of Ads
Human Lung carcinoma	A549	30000	200	1/5
	H460	15000	1000	1/5
Human Pancreatic cancer	NP-18	15000	500	1/3
	MIAPaCa-2	15000	1000	1/3
	PANC-1	15000	1000	1/3
	RWP-1	15000	1000	1/5
Human Melanoma	SK-MEL-28	15000	500	1/3
Human Colorectal carcinoma	HCT-116	15000	1000	1/3
Murine Melanoma	B16CAR	15000	1800	1/3
		15000	1800	1/5
Murine Lung carcinoma	CMT-64-RG6	15000	1800	1/5
		15000	1800	1/5
Murine prostate adenocarcinoma	TRAMP-C2	15000	1800	1/3
Murine Colon adenocarcinoma	MC38	15000	1800	1/3
Hamster Pancreatic cancer	HAPT-1	15000	1800	1/3
	HP-1	15000	1800	1/3

Figura 49: Aquí, descriuen les condicions d'experiments anteriors per facilitar la configuració d'experiments futurs, però es podrien realitzar noves condicions. *Imatge proporcionada per VCN Bioscience*

Seguidament, vam preparar una suspensió viral diluint l'adenovirus corresponent en DMEM²⁰ 5% FBS fins a la concentració final necessària per infectar 15.000 o 30.000 cèl·lules a un MOI⁵³ màxim desitjat en un volum final de 50 µl.

El volum total de la primera columna tenia un volum addicional per preparar dilucions en sèrie. Per a 1/3 dilucions en sèrie: *volum total = 75 µl: 50 µl per a la infecció del pou + 25 µl per a 1/3 dilucions en sèrie*. El protocol que vam seguir a era per a un experiment de dilució en sèrie d'1/3.

Vam preparar les plaques de 96 pous tal com es descriu a la (figura 48); des de la columna 2 fins a la 12 vam afegir 50 µl de DMEM²⁰ 5% FBSi per pou i a la columna 1 vam afegir 75 µl de solució de treball de virus per pou.

Dilució en sèrie 1/3:

Vam agafar 25 µl de tots els pous de la columna 1 i vam afegir aquest volum als següents pous de la columna 2 amb una pipeta multicanal. Seguidament, vam agafar 25 µl de tots els pous de la columna 2 i vam afegir aquest volum als següents pous de la columna 3 amb una pipeta multicanal. Vam repetir el mateix procediment de dilució de columna a columna fins a la columna 11. Vam agafar 25 µl de tots els pous de la columna 11 i els vam descartar. Després vam afegir 100 µl de cèl·lules en DMEM²⁰ 5% FBSi a cada pou (que contenia el nombre desitjat de cèl·lules/pou). Vam afegir 100 de DMEM²⁰ 5% FBSi a cada pou de la fila A i de la fila H (per evitar la dessecació dels pous). Per últim vam incubar les plaques a 37 °C en una atmosfera humidificada al 5% de CO₂ durant cinc dies (el dia 1 és el dia de la infecció i el dia 6 és el dia de la lectura).

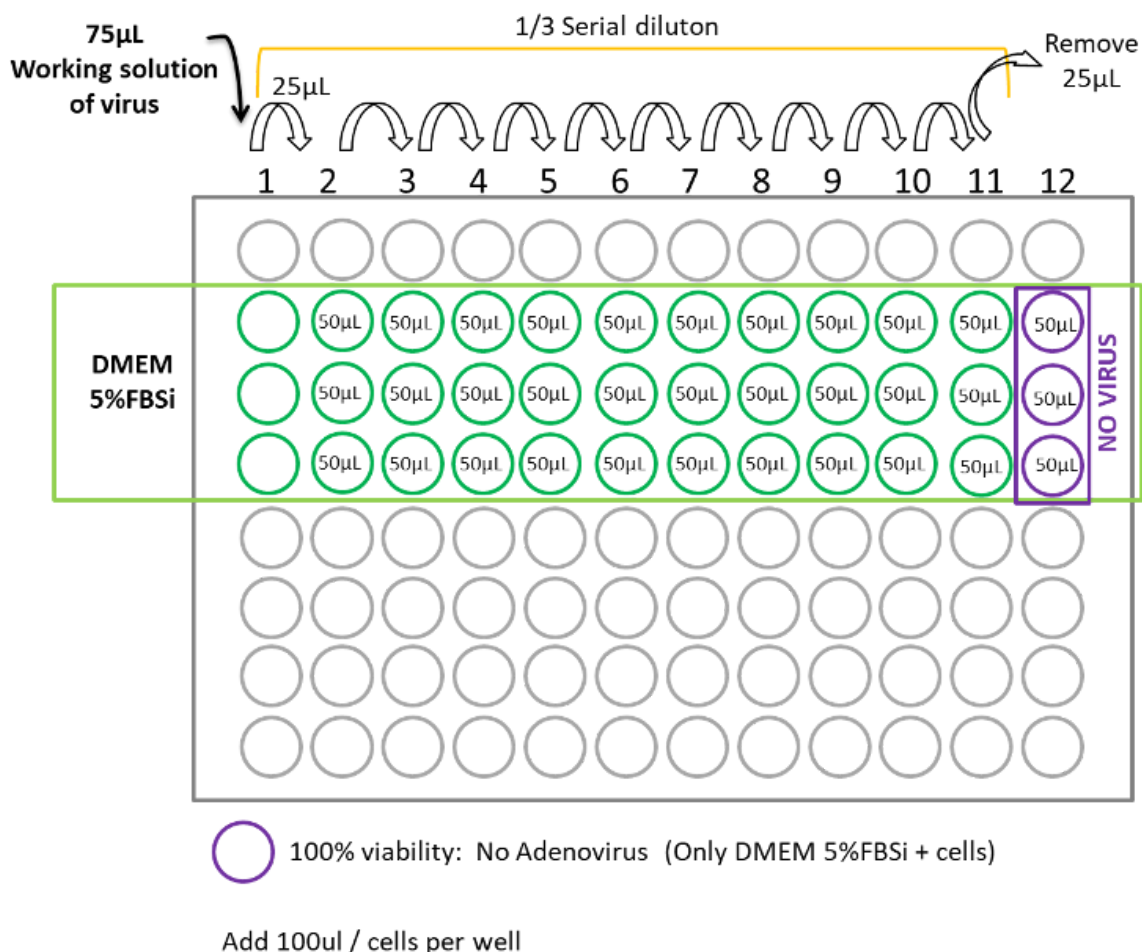


Figura 50: Esquema de plantilla de placa per a l'experiment de citotoxicitat en línies cel·lulars. *Imatge proporcionada per VCN Bioscience*

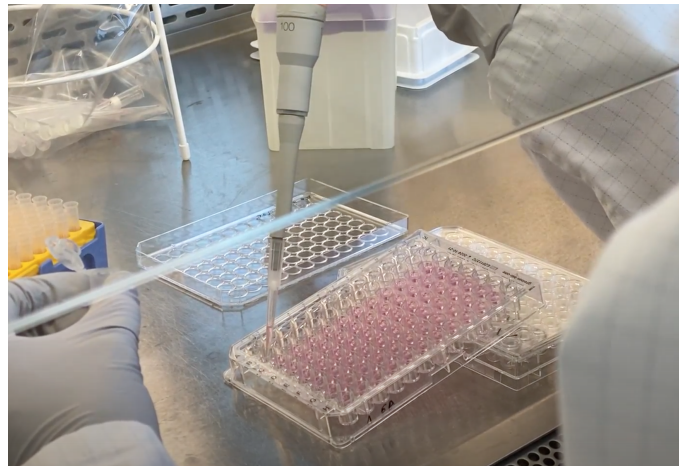


Figura 51: Demostració dels passos que acabem d'explicar. Realitzada per nosaltres

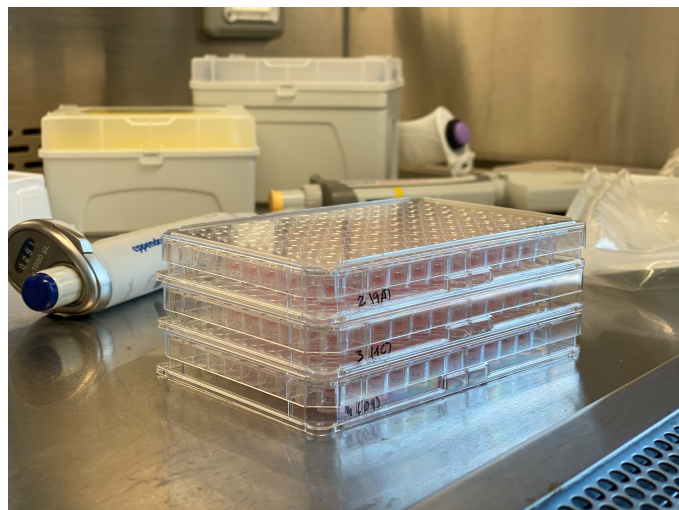


Figura 52: Citotoxicitat acabada, preparada per guardar i veure els resultats passats sis dies. Realitzada per nosaltres

No vam estar presents durant l'observació dels resultats, però aquest és el protocol que van seguir:

Dia 6 (cinc dies després de la infecció): mesuren de la viabilitat cel·lular. La viabilitat cel·lular es pot mesurar quantificant la proteïna total o l'activitat metabòlica cel·lular.

Quantificació de proteïnes totals: assaig de BCA⁵

- Preparar la solució de BCA: Barrejar el reactiu A + el reactiu B (1:50) de l'assaig comercial de BCA.
- Treure els medis de cultiu de cada pou.

- Rentar els pous una vegada amb PBS 1x⁶⁵.
- Afegir 200 µl de solució de BCA per pou amb cèl·lules. Afegiu també la solució de BCA en alguns pous sense cèl·lules (fila A o H), aquests pous s'utilitzaran per mesurar l'absorbància de fons.
- Incubar 30 minuts a 37 °C a la foscor.
- Registra l'absorbància a 540 nm amb el lector de plaques EnSpire, Perkin Elmer.

Un efecte citopàtic²¹ mitjançat per virus provoca un despreniment cel·lular, la quantitat de proteïna que queda a cada pou es correlaciona amb el nombre de cèl·lules vives o connectades.

Activitat metabòlica cel·lular (MTS): Assaig de reactiu d'una solució aquosa CellTiter-96¹²

- Descongelar el reactiu d'una solució aquosa CellTiter-96¹² (10 min al bany maria a 37 °C).
- Feu una solució amb 20µl de reactiu CellTiter-96¹²® AQueous One Solution i 100µl de medi de cultiu sense vermell de fenol (DMEM²⁰, glucosa alta, sense glutamina, sense vermell de fenol) per pou.
- Treure el medi de cultiu dels pous.
- Afegir 120 µl de reactiu de títol cel·lular diluït per pou. Afegiu també una solució de reactiu en alguns pous sense cèl·lules (fila A o H), aquests pous s'utilitzaran per mesurar l'absorbància de fons.
- Incubar la placa a 37 °C durant 1 h en una atmosfera humidificada al 5% de CO₂.
- Enregistreu l'absorbància a 490nm amb el lector de plaques EnSpire, Perkin Elmer.

Criteris per a acceptar els resultats

S'accepten els resultats si; No s'observa contaminació bacteriana o fúngica a les plaques de 96 pous, el 70-100% de la confluència cel·lular s'observa en pous no infectats i per últim s'ha d'observar un efecte citopàtic²¹ clar al microscopi en pous infectats amb el MOI⁵³ més alt.

13. CONCLUSIONS

Gràcies a la recerca bibliogràfica realitzada i el treball de camp realitzat als laboratoris de VCN Bioscience, a la Grifols, hem pogut assolir majoritàriament els nostres objectius establerts a l'inici d'aquest projecte, de manera molt satisfactòria. A més hem extret un seguit de conclusions.

La nostra conclusió principal no ens porta a una afirmació contundent del tractament amb virus oncolítics, donat que actualment els resultats obtinguts esdevenen d'assajos clínics. Però el que sí que podem confirmar és que va pel bon camí d'arribar a ser-ho.

La teràpia vírica en retinoblastoma, ara com ara és un mètode revolucionari, pel fet d'aprofitar característiques genètiques del retinoblastoma (mutacions del gen RB1) per a poder tractar selectivament les cèl·lules tumorals. El model en retinoblastoma no deixa de ser un dels diversos casos que s'estan assajant. A partir del mateix vector viral⁷⁷ s'estan utilitzen en diferents assajos clínics en altres tumors de cap i coll. És una via interessant i prometedora, amb bons resultats en animals i prometedors en humans, però que encara ha de demostrar seguretat i eficàcia en assajos clínics amb més pacients.

En el camí que hem recorregut per arribar a aquestes conclusions hem ampliat els nostres coneixements sobre càncer, modificació genètica, virus i sobre el retinoblastoma en concret.

El gen RB1 és un gen supressor de tumors. La seva funció és vigilar i destruir o neutralitzar canvis o mutacions que fan que es desenvolupin diferents tumors. En cas que el gen RB1 no funcioni bé es desenvolupen tumors com el retinoblastoma, osteosarcoma, tumor de pàncrees, melanoma, etc.

També hem tingut l'honor de poder parlar amb especialistes i professionals que ens han guiat durant aquest camí. Hem pogut viure l'experiència d'anar a laboratoris de bioseguretat i veure quins són els protocols i la manera en què es treballa. Ha estat una experiència molt gratificant per a totes tres, ja que hem viscut de prop al que ens agradaria dedicar-nos en un futur.

14. AGRAÏMENTS

Ens agradaria finalitzar el nostre treball agraint a totes aquelles persones que han fet que aquest s'hagi pogut realitzar.

Durant tot aquest procés d'investigació hem rebut ajut de professionals de la investigació (i de la medicina), i, evidentment, de la mà de la nostra tutora.

En primer lloc, ens agradaria donar-li les gràcies per la paciència i ganes que mostrat per orientar-nos en el treball. Volem posar en evidència la seva gran implicació en aquest treball i la confiança que ens ha transmès durant aquest llarg període. Ha estat una experiència profitosa i fer-la al seu costat ha estat especial. Ens agradaria agrair-li que ens proporcionés la notícia acabada de publicar. Gràcies a ella vam descobrir aquest nou tractament utilitzat a l'hospital de Sant Joan de Déu per tractar un cas de retinoblastoma infantil. Realment, si la nostra tutora no ens hagués presentat aquesta oportunitat, potser el nostre treball hauria estat diferent.

Seguidament, volíem donar les gràcies a la Sra. Miriam Bazan, que sense ella no hauríem sabut encaminar el nostre projecte, ja que quan vam començar el treball estàvem molt perdudes i ella ens va acollir de la millor manera possible. Gràcies, a ella per obrir-nos les portes de la seva empresa i donar-nos l'oportunitat d'entrar en els seus laboratoris.

Amb ella hem fet diverses reunions. Ens ha atès sempre que li hem demanat el més ràpid possible, i ens ha explicat la modificació genètica i el funcionament de VCN-01 i ens ha ampliat el coneixement de biologia. Moltes gràcies de debò, per tenir tanta paciència i interès per nosaltres.

També agrair al Sr. Manel Mascalló, CEO de VCN Biosciences, per posar-nos en contacte amb la Miriam i donar-nos accés als seus laboratoris.

I per descomptat, agrair a María del Paz Moreno i a María Victoria Maliandi per acollir-nos dos dies en els laboratoris i ensenyar-nos i explicar-nos tots els procediments que seguien en cada protocol, durant l'estança als laboratoris. Ens van acollir de la millor manera, ens van oferir les seves instal·lacions i ens van

aconsellar i guiar pel que fa al nostre futur científic i respecte a coneixements que vam poder aplicar al nostre treball.

En tercer lloc, ens agradaria donar les gràcies a l'Hospital de Sant de Déu, més concretament al doctor Jaume Català Mora. Per emprar part del seu valuós temps per contestar-nos i resoldre'ns alguns dels dubtes que se'ns han plantejat durant aquest projecte.

Per últim, donem les gràcies als membres del grup, en tot moment ens hem entès i ens hem ajudat. Hem sabut redactar i dur a terme el treball de la millor manera possible, demostrant en tot moment una sinergia entre nosaltres sorprenent. Donar les gràcies per poder haver compartit tot aquest temps i projecte.

15. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCIÓ

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer-in-children>

6. HISTÒRIA DEL CÀNCER

[https://www.news-medical.net/health/Cancer-History-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Cancer-History-(Spanish).aspx)

<https://www.bbvaopenmind.com/ciencia/investigacion/enfermedad-moderna-averia-biologica-la-historia-del-cancer/>

<https://www.ngenespanol.com/ciencia/cancer-antiguo-egipto-hasta-nuestros-dias/>

<https://hipertextual.com/2015/02/historia-del-cancer>

7. QUÈ ÉS EL CÀNCER?

<https://www.ivo.es/tipos-de-cancer/que-es-el-cancer/>

<https://www.cancer.org/content/cancer/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/que-es-el-cancer.html>

8. RETINOBLASTOMA

<https://www.aao.org/salud-ocular/enfermedades/que-es-retinoblastoma>

<https://martindevoto.com/cirugia-reconstructiva/enucleacion-y-evisceracion/>

<https://www.msmanuals.com/es/professional/pediatr%C3%ADa/c%C3%A1nceres-pedi%C3%A1tricos/retinoblastoma>

<https://icrcat.com/ca/tractaments-proves-diagnostiques/fotocoagulacio-amb-laser/>

<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/9.1/quimioterapia-inyectable.html>

<https://www.fisterra.com/ayuda-en-consulta/tecnicas-atencion-primaria/crioterapia/#5122>

<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel-de-celulas-basales-y-escamosas/tratamiento/quimioterapia-sistematica.html>

<https://www.msmanuals.com/es/professional/pediatr%C3%ADa/c%C3%A1nceres-pedi%C3%A1tricos/retinoblastoma>

9. TRACTAMENTS UTILITZATS

9.1. QUIMIOTERÀPIA

<https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/como-se-trata-el-cancer/quimioterapia/qu%C3%A9-es-la-quimioterapia>

9.2. RADIOTERÀPIA

<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/radioterapia/conceptos-basicos.html>

<https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/como-se-trata-el-cancer/radioterapia/que-es-la-radioterapia>

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>

9.3. CIRUGÍA

<https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/como-se-trata-el-cancer/cirug%C3%ADa/%C3%A1-que-es-la-cirug%C3%ADa-oncol%C3%B3gica>

9.4. TRANSPLANTAMENT DE CÈL·LULES

https://www.fcarreras.org/ca/guia-del-trasplament-de-medul-la-ossa-per-al-pacient_730447.pdf

9.5. TERÀPIA GÈNICA

[https://www.news-medical.net/health/Gene-Therapy-History-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Gene-Therapy-History-(Spanish).aspx)

<https://answers.childrenshospital.org/gene-therapy-history/>

Tesis doctorals

Reunions amb professionals

11. VIRUS

<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aat9321>

Martí Ferrera Sal. Tesis Doctoral Enhanced hyaluronidase and tumor neoepitope expression by oncolytic adenoviruses.

Reunions amb professionals

12. **TREBALL DE CAMP**

Tesis Raul Gil. Modificación genética de la inmunodomancia epitopica del adenovirus para potenciar la respuesta inmune contra epítupos no virales.

<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aat9321>

Alba Rodríguez-García¹, Marta Gimenez-Alejandre², Juan J. Rojas³, Rafael Moreno¹, Miriam Bazan-Peregrino², Manel Cascallo², and Ramon Alemany¹. Article. Seguretat i eficàcia del VCN-01, un Adenovirus Oncolític Combinant el domini HSG-Binding de fibra amb RGD i l'expressió Hyaluronidase.

Guillem Pascual Pasto. Article sobre el procés per identificar el virus més adient per ser injectat i com ataca al tumor. (Accesible online)

<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aat9321>

VCN Bioscience. Vídeo explicatiu del procés de mutació del virus a les cèl·lules tumorals. (Accesible a la pàgina online de VCN)

<http://www.vcnbiosciences.com/index.php/technologies/our-science>

VCN Bioscience. Informació sobre l'empresa.

<http://www.vcnbiosciences.com/index.php/technologies/our-science>

Bruce Alberts. Introducció a la biología cel·lular. (Llibre).

<https://books.google.com.pe/books?id=qrrYZJhrRm4C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>

Ana soterias. Explicació cancer d'ulls i retinoblastoma. (Accesible online)

<https://www.efesalud.com/cancer-de-ojos-tumores-raros-investigacion/>

Anònim. Explicació esquema modificació genètica de VCN-01. (Esquema

realitzat per l'empresa VCN)

Manel Cascallo Article informació VCN-01 (Accessible online)
<https://www.nature.com/articles/s41598-019-51014-1>

Reunions amb professionals

The background is a solid reddish-brown color. In the top left and bottom left corners, there are stylized, light brown virus particles with circular bodies, irregular spots, and several protruding spikes. On the right side, there is a large, faint, dark brown DNA double helix structure. The word "Glossari" is centered in a large, bold, light yellow font.

Glossari

DESEMBRE 2021

GLOSSARI

Acceleradors lineals¹: Dispositiu elèctric per l'acceleració de partícules subatòmiques que tinguin càrrega elèctrica.

ADA²: Proteïna produïda per les cèl·lules de l'organisme i associada a l'activació dels limfòcits; aquests són un tipus de leucòcits que juguen un paper fonamental en la resposta immune a les infeccions.

Afèresi³: Tècnica mitjançant la qual se separen els components de la sang, de manera que són seleccionats els necessaris per a la seva aplicació en medicina, mentre la resta són retornats al torrent sanguini.

Anticossos monoclonals⁴: Anticossos idèntics perquè són produïts per un sol tipus de cèl·lula del sistema immunitari, és a dir, tots els clons procedeixen d'una mateixa cèl·lula mare.

Assaig de BCA⁵: Assaig d'àcid bicinconínic, també conegut com l'assaig Smith, després del seu inventor, Paul K.

Bi-al·lèlica⁶: Que concerneix els dos al·lells d'un gen (al·lel patern i al·lel matern).

BRCA1 i BRCA2⁷: Gens que inhibeixen els tumors malignes (càncer) en els éssers humans. Quan aquests gens canvien (muten), no inhibeixen els tumors com hi hauria. Així que les persones amb mutacions en aquests gens corren un major risc de presentar càncer.

Buffer⁸: Sistema constituït per un àcid feble i la seva base conjugada, o per una base i el seu àcid conjugat que té capacitat de tapar, és a dir, que pot oposar-se a grans canvis de pH.

Campimetria visual⁹: La campimetria visual, també dita perimetria visual, és un examen mèdic que s'utilitza per a valorar les alteracions del camp visual. El camp

visual és la porció de l'espai que és capaç de captar l'ull immòbil en un moment donat.

Carcinogènesi¹⁰: Procés pel qual les cèl·lules normals es transformen en cèl·lules canceroses.

Cauterització¹¹: Terme clínic usat per descriure la cremada del cos usada per extreure una part d'ell.

CellTiter-96¹²: Mètode colorimètric per a determinar el nombre de cèl·lules viables en els assajos de proliferació, citotoxicitat o sensibilitat química.

Cèl·lules hostes¹³: Organisme que alberga un altre al seu interior o que el porta sobre si.

Cèl·lules T¹⁴: Part del sistema immunitari i es formen a partir de cèl·lules mare en la medul·la òssia. Ajuden a protegir el cos de les infeccions i a combatre el càncer.

Ciclina¹⁵: Proteïna que controla el cicle cel·lular, permetent que aquest segueixi endavant o es pari. Les ciclins apareixen en determinats períodes del cicle cel·lular i actuen unint-se a altres proteïnes anomenades quinases⁶⁹, dependents de les ciclins.

Corbes de Kaplan-Meiner¹⁶: Estadística no paramètrica que s'utilitza per estimar la funció de supervivència a partir de dades de tota la vida.

Coxsackie¹⁷: Tipus de virus. Generalment, la causa més comuna de la malaltia de mans, peus i boca als EUA.

Decúbit supí¹⁸: Posició anatòmica del cos humà que es caracteritza per: Posició del cos estirada sobre un pla horitzontal, amb l'esquena tocant a terra.

Desmoplàsia¹⁹: Fenomen de producció excessiva de teixit connectiu, pobre en

cèl·lules i ric en fibres de col·lagen, que sol acompanyar alguns tumors malignes epitelials per activació excessiva dels fibroblasts²⁸.

DMEM²⁰: Medi de cultiu cel·lular sintètic desenvolupat per Harry Eagle publicat per primer cop l'any 1959 a Science que es pot utilitzar per a mantenir les cèl·lules en el cultiu de teixits.

Efecte citopàtic²¹: Canvis estructurals de les cèl·lules hostes¹³ causats per la invasió viral. El virus infectant causa la lisi de la cèl·lula hoste o quan la cèl·lula mor sense lisi a causa de la incapacitat de replicació.

Electroretinograma²²: Mesura la resposta elèctrica produïda per les cèl·lules ubicades a la retina sensibles a la llum

Endoftalmitis²³: L'endoftalmitis consisteix en una infecció que incideix en tot l'ull. Ja que els teixits del globus ocular són bastant delicats, aquesta malaltia és bastant seriosa, podent derivar en ceguesa i pèrdua de l'ull.

Enucleació²⁴: Eliminació quirúrgica d'una massa sense tallar-la ni disseccionar-la.

Epítops²⁵: Porció d'una macromolècula que és reconeguda pel sistema immunitari, específicament la seqüència a la qual s'uneixen els anticossos, que són els receptors de limfòcits de cèl·lules B, o de les cèl·lules T¹⁴, en estat soluble.

Estroma²⁶: Clàssicament, es considera l'estroma com el teixit de sustentació o suport del teixit que compleix la funció específica d'un òrgan.

Ex vivo²⁷: Experiments químics, físics o farmacològics que es duen a terme fora d'un organisme.

Fibroblasts²⁸: Cèl·lula allargada i plana amb prolongacions en forma de llançament, que es troba en les diferents varietats del teixit conjuntiu i intervé en la formació de les fibres de col·lagen.

Fosforilada²⁹: Addició d'un grup fosfat a qualsevol altra molècula.

FST (Full-field Stimulus Testing)³⁰: Per quantificar la percepció visual en candidats amb ceguera severa per a assajos de tractament.

Funció visual 25³¹: Escala NEI VFQ-25 com a instrument de mesurament de la qualitat de vida relativa a la visió.

Gammagrafia òssia³²: Tipus especial de procediment que utilitza petites quantitats de material radioactiu per diagnosticar i avaluar la gravetat d'una gran varietat de malalties i condicions dels ossos incloent fractures, infeccions i càncer.

Ganglis limfàtics³³: Òrgans minúsculs amb forma de pèsol que ajuden a combatre les infeccions.

G-CSF³⁴: Medicament que es fa servir sota les marques comercials Neupogen, Zarxio i Nivestym per al tractament de la neutropènia i la prevenció d'infeccions i la preparació de la sang per a la recol·lecció de certs tipus de glòbuls sanguinis.

Hisop³⁵: Un hisop, bastonet, cotonet, vareta, vareta de paper, aplicador o copet és un instrument fet servir per recollir mostres, per al seu posterior estudi.

HOTV, ETDRS³⁶: Són proves per avaluar l'agudesesa visual en visió llunyana.

Humphrey camp visual cinètic³⁷: El Campímetre Humphrey és un campímetre automàtic que s'empra per a mesurar el camp visual de l'ull.

Humphrey macula threshold³⁸: Mètode per analitzar el camp visual d'un pacient.

Immunodeprimida³⁹: Persona a qui se li redueix la capacitat per a combatre infeccions i altres malalties.

Integrines⁴⁰: Superfamília de glucoproteïnes que participen majoritàriament en la unió de les cèl·lules amb la matriu extracel·lular, encara que n'hi ha algunes que

també participen en la unió cèl·lula-cèl·lula.

Integrines CAR⁴¹: Coxsackie¹⁷ adenovirus receptor.

Intraocular⁴²: Dins de l'ull.

Intratumoral⁴³: Dins d'un tumor.

Intravítries⁴⁴: Dins del vitri.

In vitro⁴⁵: Experiments bioquímics que es duen a terme en un ambient artificial.

In vivo⁴⁶: Experiments químics, físics o farmacològics que es duen a terme dins d'un organisme viu.

KKTK⁴⁷: Mutació

Leucèmia⁴⁸: Càncer de la sang que comença a la medul·la òssia, el teixit tou que es troba al centre dels ossos, on es formen les cèl·lules sanguínies.

Lisar⁴⁹: Deteriorament d'una cèl·lula a causa d'una lesió a la membrana plasmàtica (exterior). Aquesta pot ser per mitjans químics o físics (per exemple, detergents forts o ones sonores d'alta energia) o per infecció amb una soca d'un virus que pot lliar les cèl·lules.

Mastectomia⁵⁰: Extirpació d'un pit.

Maxiprep⁵¹: Una preparació de plasmidi és un mètode d'extracció i purificació d'ADN per a l'ADN del plasmidi.

Mitogènic⁵²: Substància o agent físic que causa mutacions, és a dir, que altera de manera permanent l'ADN de les cèl·lules.

MOI⁵³ (multiplicitat d'infeccions): Nombre de partícules virals que poden infectar

cada cèl·lula del recipient de cultiu de teixits. Això pot variar entre 0,1 i 10, 20, 30x, etc.

Murins⁵⁴: Subfamília de rosegadors.

Neoplàsies⁵⁵: Creixement anormal d'un teixit.

OCT macular⁵⁶: És una tècnica d'imatge que permet diagnosticar, controlar i fer un seguiment dels problemes de la màcula.

Aquesta prova, en concret, permet prendre fotografies de la secció transversal de la retina, el teixit que recobreix la part posterior de l'ull en el qual es troba la màcula

Oncogen⁵⁷: Gen que quan ha mutat o s'expressa en nivells alts, ajuda a convertir una cèl·lula normal en una cèl·lula tumoral.

Oncogènesis⁵⁸: Formació de tumors.

Ooforectomia⁵⁹: Procediment quirúrgic per a extirpar un ovari o ambdós.

Orientació tumoral⁶⁰: Disposició i ubicació en què es troba el tumor en qüestió.

Ortotòpicament⁶¹: Dit de l'empelt que ocupa el mateix lloc que l'òrgan substituït.

Patòleg⁶²: Metge que interpreta anàlisis de laboratori.

Pellet⁶³: Denominació genèrica utilitzada per referir-se a petites proporcions de material aglomerat o comprimit de diferents materials. En aquest cas bacteris.

Perimetria cinètica⁶⁴: Un estímul de grandària i intensitat específica es mou des de la perifèria cap a la fixació central fins que el pacient pot veure'l. El procediment es repeteix per a diversos meridians.

PBS 1x⁶⁵: Solució utilitzada en la investigació biològica, bioquímica i immunològica diagnòstica.

Pòlips⁶⁶: Creixement anormal de teixit que sobresurt d'una membrana mucosa.

Proliferació cel·lular⁶⁷: Increment en el nombre de cèl·lules en un organisme o colònia, no quan una cèl·lula augmenta la seva mida.

Proliferar⁶⁸: Multiplicar-se abundantment.

Quinases⁶⁹: Enzims que tenen el poder de modificar altres molècules, especialment proteïnes, catalitzant reaccions de fosforilació.

RGDK⁷⁰: Mutació

RM orbitàries⁷¹: Ressonància Magnètica (RM) d'òrbites permet la visualització i l'estudi de les estructures que hi ha dins de les òrbites, incloent-hi el globus ocular i les porcions intraorbitàries dels nervis òptics.

Simptomatologia òssia⁷²: Metàstasis des del punt del tumor fins als ossos.

Tc⁷³: Tomografia computada. A través de processos anomenats algorismes, l'ordinador pot generar imatges tridimensionals d'una secció del cos.

Teixit diana⁷⁴: Part del cos en la qual una substància química origina efectes adversos. Pot ser un òrgan íntegre, un teixit, una cèl·lula o tan sols un component subcel·lular.

Teràpia adjuvant⁷⁵: Teràpia complementària.

Transcriptasa inversa⁷⁶: Nom que es dona a un conjunt d'enzims de tipus ADN-polimerasa, que tenen com a funció sintetitzar ADN de doble cadena utilitzant com a motlle ARN monocatenari.

Vector viral⁷⁷: Versió del virus modificada

Virus 1 type⁷⁸: Virus no modificat