

TREBALL DE RECERCA

**ESTUDI DEL POTENCIAL  
CITOTÒXIC DE PRODUCTES  
NATURALS EN CÈL·LULES  
CANCEROSES**

Papallona groga

Curs 2021 – 2022

Departament de ciències



**AGRAÏMENTS:**

Primerament, voldria agrair a la tutora actual d'aquest treball, per animar-me a presentar al Projecte Itinera de la UdL i per la seva ajuda amb l'elecció del treball. Estic molt agraïda pel suport i consells rebuts de la seva part. També donar gràcies per la resolució de tots els dubtes que m'han anat sorgint.

Moltes gràcies a l'investigador en els laboratoris de Fisiopatologia Metabòlica (FPM) de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB) de Lleida, per haver-me assessorat en el treball, per facilitar-me molta informació i sobretot, per oferir-me l'oportunitat de poder integrar-me en la seva investigació.

Agrair a tot el personal que treballa en el centre per haver-me obert les portes i oferir-me l'accés a les sales i laboratoris.

A la meva família i amics, pel suport moral que m'han ofert durant la realització del treball, i als meus pares pels seus consells, ajudes i per la seva gran paciència.

Finalment, donar moltes gràcies al Projecte Itinera, agrair l'oportunitat d'incorporar-me en una de les seves investigacions.

**RESUM:**

Partint de l'interès per la medicina i totes les seves àrees, s'ha plantejat conèixer si existeix un possible efecte anticancerós que afecti la viabilitat cel·lular in vitro per tal de seleccionar uns productes per futures investigacions.

El càncer segueix sent un dels majors i més perillosos enemics del nostre propi cos, amb un elevat índex de mortalitat en persones majors de 40 anys.

El nostre coneixement de les bases moleculars del càncer està experimentant un avanç important en l'actualitat degut fonamentalment a noves tecnologies i descobriments.

A partir d'això es van examinar una sèrie de composts naturals per tal d'explorar els seus efectes en cèl·lules canceroses. Diverses investigacions estan estudiant de quina manera es relacionen determinats aliments i productes naturals amb el càncer. Alguns composts d'origen natural mostren ser més potents que altres segons els seus components que presenten.

Les línies cel·lulars en les quals es va experimentar es van dividir en dos, HEK293 i MEF. L'avaluació de la viabilitat en elles va ser desenvolupada per diversos factors en les quals van ser exposades.

Finalment, es va comprovar que la viabilitat cel·lular variava segons els temps d'exposició i concentració de producte a les quals s'havia exposat a les cèl·lules.

**ABSTRACT:**

Based on the interest in medicine and all its areas, it has been considered whether there is a possible anticancer effect affecting in vitro cell viability in order to select products for future research.

Cancer remains one of the biggest and most dangerous enemies of our own body, with a high mortality rate in people over the age of 40.

Our knowledge of the molecular bases of cancer is currently experiencing significant progress mainly due to new technologies and discoveries.

A number of natural compounds were examined from this to explore their effects on cancer cells. Several research is studying how certain foods and natural products are linked to cancer. Some naturally occurring compounds show that they are more powerful than others depending on their components.

The cellular lines in which it was tested were divided into two, HEK293 and MEF. The feasibility assessment in them was developed by several factors in which they were exposed.

Finally, it was found that cellular viability varied according to the time of exposure and concentration of product that had been exposed to cells.



## Taula de contingut:

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	12
<b>1.1. El càncer</b> .....	13
1.1.1. Què és el càncer? .....	13
1.1.1.1. Diferències entre tumors benignes i tumors malignes.....	15
1.1.2. Tipus de càncer.....	17
1.1.3. Incidència.....	18
1.1.4. Diferències entre cèl·lules canceroses i cèl·lules normals.....	19
1.1.5. El càncer i el cicle cel·lular .....	21
<b>1.2. Mort cel·lular en càncer</b> .....	26
1.2.1. Apoptosi.....	27
1.2.2. Autofàgia.....	28
1.2.3. Necrosi.....	30
<b>1.3. Investigació</b> .....	32
1.3.1. Importància productes naturals .....	32
<b>1.4. Lípids en el càncer</b> .....	34
1.4.1. El metabolisme dels lípids en els tumors.....	35
<b>2. HIPÒTESI I OBJECTIUS</b> .....	37
<b>3. MATERIALS I MÈTODES</b> .....	38
<b>3.1. Materials i maneig</b> .....	38
<b>3.2. Metodologia</b> .....	48
3.2.1. Línies cel·lulars .....	48
3.2.2. Manteniment de les cèl·lules. ....	50
3.2.3. Productes.....	51
3.2.4. Determinació viabilitat .....	53
3.2.5. Estadística .....	54
<b>4. RESULTATS</b> .....	55
<b>4.1. Grficació resultats i anàlisis</b> .....	60
4.1.1. Estudis de viabilitat cel·lular.....	60
<b>4.2. Anàlisis cel·lular</b> .....	69
<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	76
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	77
<b>7. FONTS DOCUMENTALS</b> .....	81
<b>8. ANNEXOS</b> .....	86

## Índex de figures:

Figura 1: Procés de metàstasi.....	14
Figura 2: Diferències a nivell d'invasió de vasos sanguinis entre tumors benignes i malignes.....	15
Figura 3: Procés d'angiogènesi.....	16
Figura 4: Diferències a nivell d'estructura entre cèl·lules normals i cèl·lules canceroses.....	19
Figura 5: Punts de control en el cicle cel·lular.....	22
Figura 6: Modelatge de la ruta de la proteïna p53 en el cicle cel·lular, aturades i apoptosi.....	24
Figura 7: Interrupcions en el cicle cel·lular.....	25
Figura 8: Procés d'apoptosi.....	27
Figura 9: Procés d'autofàgia.....	28
Figura 10: Procés de necrosi.....	30
Figura 11: Diferència entre els 3 tipus de mort cel·lular.....	31
Figura 12: Exemple de micropipetes.....	38
Figura 13 i 14: Exemple microscopi òptic.....	38
Figura 15: Exemple pot amb diferents mesures d'ependorfs.....	39
Figura 16: Exemple eppendorf.....	39
Figura 17: Exemple bany termostàtic.....	39
Figura 18: Exemple reactiu PrestoBlues.....	40
Figura 19: Exemple DMEM.....	40
Figura 20: Exemple rack de laboratori amb els eppendorf corresponents.....	41
Figura 21: Exemple rack de laboratori.....	41
Figura 22 i 23: Exemple placa de Petri amb cultiu cel·lular.....	41
Figura 24 i 25: Exemple incubador.....	42
Figura 26 i 27: Exemple campana de laboratori.....	42
Figura 28 i 29: Exemple lector de plaques de fluorescència.....	43
Figura 30: Exemple centrífuga específica de tubs cònics.....	43
Figura 31: Exemple centrífuga específica d'ependorfs.....	43
Figura 32: Aplicació PBS per netejar la placa de petri que contenia cèl·lules.....	44
Figura 33: Exemple PBS.....	44



Figura 34: Exemple tripsina.....	44
Figura 35: Exemple FBS.....	45
Figura 36: Exemple Thermomixer Comfort Eppendorf.....	45
Figura 37 i 38: Exemple sistema al buit.....	46
Figura 39 i 40: Exemple tub cònic per a centrífuga.....	46
Figura 41 i 42: Exemple microbalança.....	47
Figura 43: Exemple bany d'aigua.....	47
Figura 44: Mostres biològiques de HEK293 visualitzades des d'un microscopi òptic.....	48
Figura 45: Mostres biològiques de MEF visualitzades des d'un microscopi òptic.....	49
Figura 46: Parts de mostres biològiques de MEF visualitzades des d'un microscopi òptic.....	49
Figura 47: Compostos naturals subministrats per l'empresa LYOTEK.....	51
Figura 48: Procés de dissolució dels productes, amb les concentracions de 0,2 i 0,3 mg/mL, en DMEM.....	51
Figura 49: Procés d'agregació dels productes, a les concentracions corresponents, a les cèl·lules cultivades.....	51
Figura 50: Procés a seguir a l'hora d'utilitzar el reactiu PrestoBlues.....	53
Figura 51: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en MEF. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,2 mg/mL a les 24 hores del tractament.....	61
Figura 52: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en MEF. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,3 mg/mL a les 24 hores del tractament.....	62
Figura 53: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en MEF. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,2 mg/mL a les 48 hores del tractament.....	63
Figura 54: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en MEF. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,3 mg/mL a les 48 hores del tractament.....	64
Figura 55: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en HEK293. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,2 mg/mL a les 24 hores del tractament.....	65
Figura 56: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en HEK293. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,3 mg/mL a les 24 hores del tractament.....	66

Figura 57: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en HEK293. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,2 mg/mL a les 48 hores del tractament.....	67
Figura 58: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en HEK293. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,3 mg/mL a les 48 hores del tractament.....	68
Figura 59: Placa de petri amb cèl·lules preparades per ser analitzades en el microscopi òptic.....	69
Figura 60: Estructura cel·lular de la línia HEK293 sense cap tipus de modificació ni exposició als productes, un cop passades 24 hores del cultiu. No hi ha restes cel·lulars o si hi són, són molt difícil de veure.....	70
Figura 61: Estructura cel·lular de la línia HEK293 un cop exposada al producte 156P a una concentració de 0,2 mg/mL i un cop passades 24 hores. Les fletxes indiquen les restes de cèl·lules mortes provocades per l'administració del compost en estudi, aquestes, coincideixen amb la pèrdua de l'estructura cel·lular.....	71
Figura 62: Estructura cel·lular de la línia HEK293 un cop exposada al producte 157P a una concentració de 0,2 mg/mL i un cop passades 24 hores. Les fletxes indiquen les restes de cèl·lules mortes provocades per l'administració del compost en estudi. Aquestes restes coincideixen amb la pèrdua de l'estructura cel·lular.....	72
Figura 63: Estructura cel·lular de la línia HEK293 un cop exposada al producte 159P a una concentració de 0,2 mg/mL i un cop passades 24 hores. Les fletxes indiquen les restes de cèl·lules mortes provocades per l'administració del compost en estudi, aquestes, coincideixen amb la pèrdua de l'estructura cel·lular.....	73
Figura 64: Estructura cel·lular de la línia MEF sense cap tipus de modificació ni exposició als productes, un cop passades 24 hores del cultiu. No s'hi veuen restes cel·lulars, com a molt en pot haver alguna, encara que n'hi ha moltes més en les cèl·lules tractades.....	74
Figura 65: Estructura cel·lular de la línia MEF un cop exposada al producte 155P a una concentració de 0,2 mg/mL i un cop passades 24 hores. Una fletxa indica el nucli de la cèl·lula i l'altra les restes cel·lulars que són tots els puntets negres o més foscos que es poden veure al voltant de les estructures cel·lulars. També es pot veure que els fibroblasts s'han tornat més allargats i que ja no estan junts com en les cèl·lules control.....	74
Figura 66: Estructura cel·lular de la línia MEF sense cap tipus de modificació ni exposició als productes, un cop passades 48 hores del cultiu. No hi ha restes cel·lulars o si hi són, són molt difícil de veure.....	75
Figura 67: Repartició del tipus d'exposició de productes a les cèl·lules en una placa de 48 pouets.....	95
Figura 68: Placa de 48 pouets (fibroblasts de ratolins exposats al producte) on hi sobraven 6 pous i l'hem completat amb el control de fibroblasts i el ratolí 1 i 2 (48 hores).....	96

## Índex de taules:

Taula 1: Estimació del número de nous casos de càncer en Espanya per l'any 2021.....	18
Taula 2: Diferències a nivell d'estructura entre cèl·lules normals i cèl·lules canceroses.....	20
Taula 3: Unitats de fluorescència, és a dir, viabilitat cel·lular corresponent a cada pouet de cèl·lules HEK293 exposades 24 hores als productes.....	55
Taula 4: Unitats de fluorescència, és a dir, viabilitat cel·lular corresponent a cada pouet de cèl·lules HEK293 exposades 48 hores als productes.....	56
Taula 5: Unitats de fluorescència, és a dir, viabilitat cel·lular corresponent a cada pouet de cèl·lules MEF exposades 24 hores als productes.....	57
Taula 6: Unitats de fluorescència, és a dir, viabilitat cel·lular corresponent a cada pouet de cèl·lules MEF exposades 48 hores als productes.....	58

## **1. INTRODUCCIÓ**

El càncer és un dels principals problemes de salut de les societats modernes. La seva freqüència augmenta progressivament, no sols pel fet que els ciutadans dels països desenvolupats tenim cada vegada una esperança de vida més llarga, sinó que també perquè ens afavoreixen una sèrie d'hàbits nocius que hem incorporat en les nostres vides.

Els detonants del càncer són principalment externs, un grup molt divers d'elements capaços de produir mutacions a l'ADN de les nostres cèl·lules. Tractant de minimitzar l'exposició als factors de risc coneguts, podem disminuir la possibilitat de patir aquestes mutacions.

El camp de la prevenció nutricional del càncer és molt prometedor, però encara està en fases inicials. En els laboratoris s'han identificat moltes substàncies naturals que afecten les cèl·lules canceroses, un cop aquestes són extreptes dels aliments que les contenen, s'ha observat que maten o detenen el creixement de les cèl·lules canceroses. Experiments amb ratolins han demostrat que eviten que els animals desenvolupin tumors.

Aquest treball pretén fer publicitat a la falta de coneixement sobre els nutrients i/o composts naturals que existeixen que poden afavorir la protecció contra el càncer.

## **1.1. El càncer**

### **1.1.1. Què és el càncer?**

La paraula càncer s'utilitza per descriure un complex i heterogeni grup d'estats patològics en el que les cèl·lules proliferen desmesuradament i envaeixen teixits veïns.

El càncer és una malaltia de caràcter genètic que es produeix quan les restriccions que limiten la divisió cel·lular en cèl·lules de teixits ja diferenciats, són eliminades. Generalment, és una malaltia adquirida i de caràcter irreversible.

El càncer és una de les malalties més desenvolupades i la més versàtil de totes les que causen una mortalitat elevada en la població mundial. Existeixen més de 200 tipus de càncers malignes.

Segons les estadístiques Espanya és un dels països amb menys incidència de càncer dins d'Europa, la malaltia hi afecta cada any a unes 150.000 persones, de les quals sols una tercera part sobreviu a la malaltia. En Estats Units es cura el 45% dels càncers i en els països europeus el 35%.

Molts estudis relacionen els estils de vida, hàbitats, dietes, professions, llocs geogràfics, entre d'altres, amb la incidència de determinats càncers. Aquesta, augmenta amb l'edat, el que indica que existeix un factor acumulatiu de causes responsables que un únic succés no sigui suficient per desencadenar, de manera immediata, un càncer.

En l'àmbit cel·lular, el càncer és un conjunt de malalties que es caracteritzen pel desenvolupament de cèl·lules anormals, que es divideixen i creixen sense control en qualsevol part del cos.

En condicions normals, les cèl·lules creixen i es divideixen de manera que donen lloc a noves cèl·lules a mesura que l'organisme les va necessitant. Quan una cèl·lula normal envelleix, es fa malbé o mor, es reemplaça per una de nova. El descontrol d'aquest procés dona lloc al càncer. A mesura que les cèl·lules es van fent més i més anormals, les velles i/o danyades sobreviuen en lloc de morir de manera que es produeix una massa cel·lular diferenciable de la resta, denominada tumor.

Parlarem de tumors benignes quan les cèl·lules que s'incrementen posseeixen una estructura i funcions normals. En canvi, el tumor es considerarà benigne en el moment en el qual el creixement i la proliferació esdevinguin incontrolades. A més a més, de sumar-s'hi la facultat d'envair i dispersar-se a altres teixits produint així, "metàstasis".

Quan parlem de metàstasi fem referència a un tumor secundari que es produeix un cop les cèl·lules canceroses procedents d'un tumor primari s'han dispersat. Les metàstasi les podem trobar prop o molt lluny del tumor primari, ja que poden ser transportades pel corrent circulatori. (Rojo, 1999)

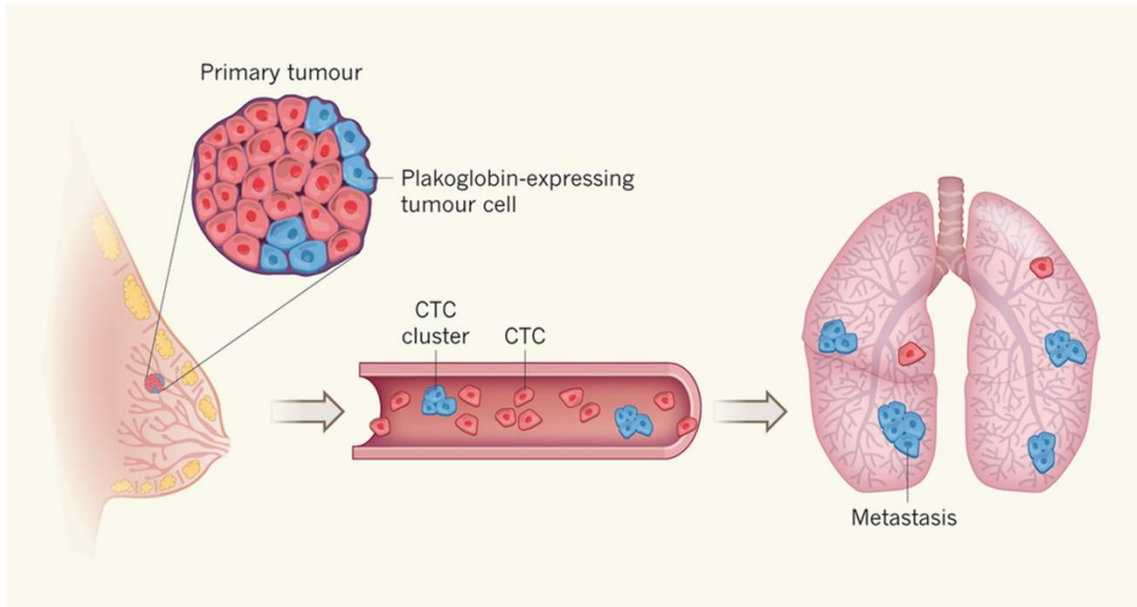


Figura 1: Procés de metàstasi.

Font: <http://www.cancermetastasislab.com/wp-content/uploads/2015/11/Fig-1.jpg>

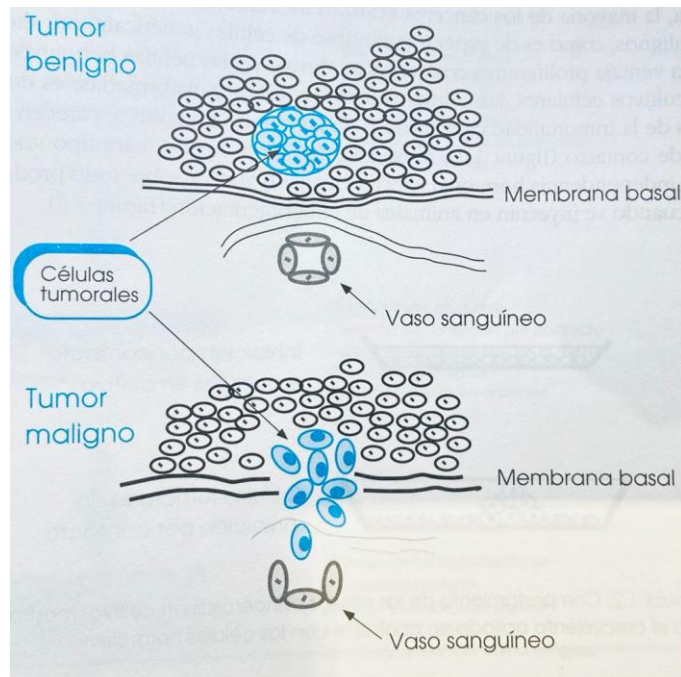
### 1.1.1.1. Diferències entre tumors benignes i tumors malignes

En l'àmbit biològic la classificació més important dels tumors es troba entre tumors benignes i malignes, els quals aquests últims són els considerats pròpiament càncer.

Els tumors benignes tenen una extensió controlada, no necessàriament avancen cap a la malignitat ni s'estenen a altres parts de l'organisme com fan els malignes, multiplicant-se de manera descontrolada.

Per regla general, els tumors malignes varien molt en forma i mesura, les cèl·lules s'assemblen poc o molt poc a les originals, mentre que els benignes mantenen el semblant amb el teixit d'origen.

Un dels problemes dels tumors malignes que diferencia dels benignes és el seu ràpid creixement, són capaços de destrossar membranes basals envaint vasos sanguinis, ja que no tenen cap càpsula que les rodegi. En canvi, les cèl·lules en un tumor benigne es troben separades del teixit normal que les rodeja a causa d'una espècie de "càpsula" de teixit conjuntiu. (Biolatto, 2021)



*Figura 2: Diferències a nivell d'invasió de vasos sanguinis entre tumors benignes i malignes.*

Font: (Rojo, 1999)

L'angiogènesi és la formació de vasos sanguinis nous.

Aquest procés consisteix en la migració, creixement i diferenciació de cèl·lules endotelials, les encarregades de recobrir les parets internes dels vasos sanguinis.

El procés d'angiogènesi exerceix un paper important en el creixement del càncer, ja que els tumors sòlids necessiten un subministrament de sang perquè els tumors creixin uns mil·límetres més en la seva mesura. El subministrament de sang que són capaços de

formar els tumors, emet senyals químics que estimulen l'angiogènesi, al mateix temps, els tumors, també poden estimular les cèl·lules normals properes perquè produeixin molècules de senyalització d'angiogènesi.

Els nous vasos sanguinis que es formaran, alimentaran els tumors en creixement amb oxigen i nutrients, així doncs, permetran l'engrandiment del tumor i que les cèl·lules canceroses envaeixin el teixit del seu voltant, es moguin pel cos i formin noves colònies de cèl·lules canceroses, les quals anomenem metàstasi. (Càncer, 2021)

Com que els tumors no poden créixer més enllà d'una mesura determinada ni tampoc créixer sense un subministrament de sang, els científics han formulat fàrmacs anomenats inhibidors de l'angiogènesi. L'objectiu d'aquests consisteix a impedir o fer lent el creixement del càncer suprimint el subministrament de sang que necessita.

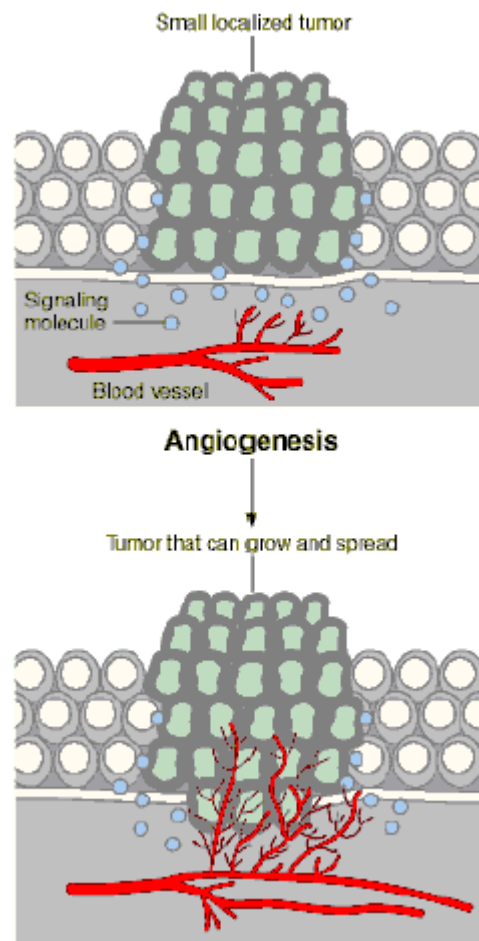


Figura 3: Procés d'angiogènesi.

Font: <https://www.seom.org/seom/cms/images/stories/imagenes/sociosyprofs/documentacion/baseoncologia/2006/foto03.gif>



### 1.1.2. Tipus de càncer

El terme “càncer” abasta més de 100 malalties que afecten gairebé totes les parts del cos, i totes són potencialment perilloses per a la vida. (Clínic, 2018)

Els principals tipus de càncer són els següents:

- **CARCINOMA:** És el tipus més habitual de càncer i s’origina en les cèl·lules epitelials, les encarregades de cobrir la superfície externa del cos (la pell) i també les superfícies internes (mucoses). Per tant, aquest tipus de càncer pot originar-se a la pell, pulmons, pits, pàncrees i altres òrgans i glàndules. Anomenarem adenocarcinomes aquells que afecten zones de la superfície dels òrgans que tenen una funció secretora. En canvi, si el teixit afectat pel tumor no té funcions glandulars, l’anomenarem carcinoma de cèl·lules escamoses o carcinoma epidermoide.
- **SARCOMA:** És un tipus de càncer poc comú que s’origina en els ossos, músculs, greixos, vasos sanguinis, cartílags o altres teixits tous o connectius del cos.
- **LEUCÈMIA:** Aquest tipus de càncer comença en els teixits que formen la sang en la medul·la òssia i que no formen tumors sòlids.
- **LIMFOMA:** El tipus de càncer que s’origina en les cèl·lules del sistema immunitari, en els limfòcits.
- **MIELOMA MÚLTIPLE:** Aquest tipus s’origina en les cèl·lules plasmàtiques, un tipus de cèl·lules immunitàries.
- **TUMOR CEREBRAL I DE LA MEDUL·LA ESPINAL:** N’hi ha de diferents tipus i s’anomenen segons el tipus de cèl·lula en la qual s’originen i segons el primer lloc on es localitza el tumor en el sistema nerviós central.

### 1.1.3. Incidència

Tot i els progressos que està desenvolupant la medicina i els esforços de prevenció pels càncers, les estimacions globals són cada cop més elevades. Unes de les causes més importants d'aquest progrés són l'augment demogràfic i de l'esperança de vida de la gent, el canvi als estils de vida després dels desenvolupaments econòmics i socials en els països més pobres poden veure's representats també en les gràfiques d'afectació del càncer.

Si ens fixem en les estadístiques generals, el càncer és una de les causes principals de mort en el món. L'any 2018 hi va haver 18,1 milions de casos nous i 9,5 milions de morts per càncer.

A Espanya en concret, el nombre de càncers diagnosticats aquest any, 2021, s'estimula que assolirà els 276.239 casos, sempre que es tingui en compte la incidència que hi hauria aquest any si no hi hagués hagut factors que haguessin alterat les possibilitats diagnosticades del sistema sanitari, com és el cas de la COVID-19 aquests últims mesos. (SEOM, 2020)

	Homes	Dones	Tots dos sexes
<45 anys	5.802	9.667	15.469
45 a 64 anys	46.802	45.030	91.832
>/= 65 anys	106.263	62.675	168.938
Totes les edats	158.867	117.372	276.239

*Taula 1. Estimació del número de nous casos de càncer en Espanya per l'any 2021.*

*Font: [https://seom.org/images/Cifras\\_del\\_cancer\\_en\\_Espnaha\\_2021.pdf](https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espnaha_2021.pdf)*

#### 1.1.4. Diferències entre cèl·lules canceroses i cèl·lules normals

Les cèl·lules canceroses es diferencien de les normals en diversos casos, principalment en el seu creixement descontrolat i invasiu. Aquest, és degut a la seva inespecificitat a l'hora d'actuar, a diferència de les normals que maduren en tipus cel·lulars molt diferents amb funcions específiques, les canceroses no ho fan.

A més a més, les cèl·lules canceroses són capaces d'ignorar tots els senyals o avisos generats per les cèl·lules normals, per tal que aquestes morin, mitjançant apoptosi, un mètode que el nostre cos utilitza per desfer-se de les que no són necessàries.

Les cèl·lules capaces de desenvolupar càncers, tenen la capacitat d'influir en les normals, en les molècules i en els vasos sanguinis que les rodegen i alimenten. És a dir, poden contribuir a aquests perquè formin, per exemple, vasos sanguinis que subministrin oxigen i nutrients necessaris pel creixement dels tumors.

El sistema immunitari format per una red d'òrgans, teixits i cèl·lules especialitzades que protegeixen el cos contra infeccions i altres malalties, pot arribar a ser evitat per les cèl·lules canceroses, tot i que la seva funció és eliminar de l'organisme totes les cèl·lules afectades o anormals.

Els tumors poden arribar a usar el sistema immunitari per seguir vius i créixer. Per exemple, amb l'ajuda de cèl·lules que constitueixen el sistema per tal d'impedir una resposta immunitària descontrolada, les cèl·lules canceroses poden fer que aquest no les destrueixi. (Càncer I. N., 2021)

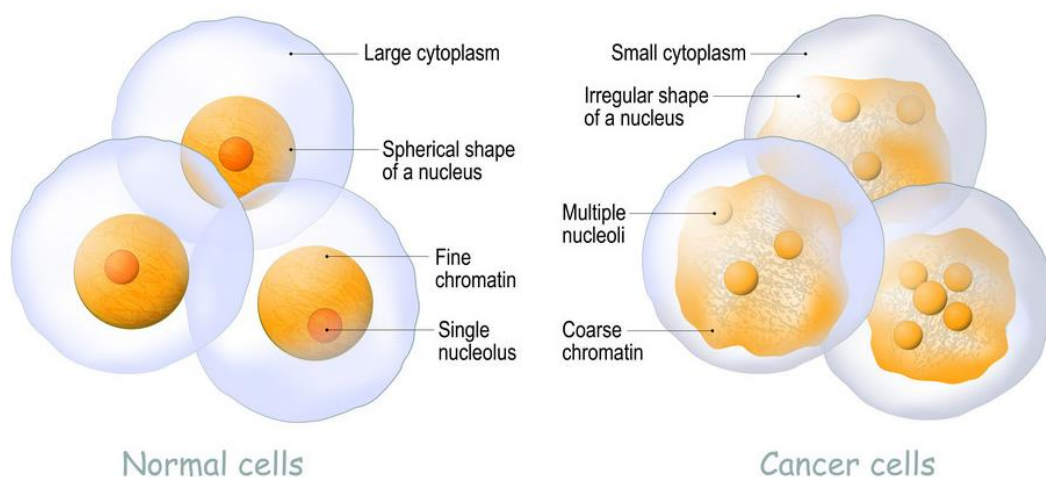










Figura 4: Diferències a nivell d'estructura entre cèl·lules normals i cèl·lules canceroses.

Font: <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/cancer-cells-and-normal-cells-comparison-vector-35547567>

<b>CÈL·LULES NORMALS</b>	<b>CÈL·LULES CANCEROSES</b>
<p>Nuclis petits amb forma uniforme. Volum citoplasmàtic relativament gran.</p> 	<p>Nuclis grans amb forma variable. Volum citoplasmàtic relativament petit.</p> 
<p>Conformitat en la mida i forma de la cèl·lula. Cèl·lules disposades en teixits discrets.</p> 	<p>Variació en la mida i forma de la cèl·lula. Desorganització de les cèl·lules.</p> 
<p>Pot tenir estructures cel·lulars diferenciades. Presentació normal dels marcadors de superfície de les cèl·lules.</p> 	<p>Pèrdues de característiques normals especialitzades. Expressió elevada de certs marcadors de cèl·lula.</p> 
<p>Nivells més baixos de cèl·lules divisòries. Els teixits cel·lulars estan clarament demarcats.</p> 	<p>Un gran nombre de cèl·lules divisòries. Les fronteres tumorals estan mal definides.</p> 

Taula 2: Diferències a nivell d'estructura entre cèl·lules normals i cèl·lules canceroses.  
 Font: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cancer-cells.html>

### 1.1.5. El càncer i el cicle cel·lular

El càncer és una malaltia de divisió cel·lular incontrolada. El seu desenvolupament i progressió solen estar vinculats a una sèrie de canvis en l'activitat reguladora del cicle cel·lular. Aquest, comprèn el període de temps que va des que es forma la cèl·lula, és a dir, des que neix, fins que es divideix i genera noves cèl·lules.

El cicle cel·lular està dividit en fases, la Fase G1, la Fase S i la Fase G2, que constitueixen la interfase. En la Fase G1 la cèl·lula creix i sintetitza alguns components que es necessitaran més endavant. Seguidament, en la Fase S, es duplica el material genètic de la cèl·lula, en la fase anterior la cèl·lula tenia dues còpies de cada cromosoma que en aquesta fase es duplicarà tot l'ADN i, per tant, passarà a tenir quatre còpies de cada cromosoma. Un cop s'ha duplicat, la cèl·lula presenta el doble de material genètic de manera que, en la Fase G2, es prepararà per a la divisió cel·lular continuant el seu creixement i sintetitzant orgànuls. També va distribuint el seu contingut perquè a l'hora de dividir-se es separi equitativament.

Un cop s'han produït totes les fases de la interfase, la cèl·lula passarà a la Fase M on tindrà lloc la divisió cel·lular. Ho farà a través de la mitosi, és a dir, a partir d'una cèl·lula mare se n'obtidran dues de filles amb el mateix contingut genètic. Tot i això, la generació dels gàmetes ocorrerà per meiosi, ja que en dividir-se, donaran lloc a quatre cèl·lules amb la meitat de contingut genètic i diferents entre si.

Després de la Fase M, les cèl·lules filles poden entrar a la Fase G1 i seguir preparant-se per la seva divisió, o poden entrar en la Fase G0 on no es dividiran sinó que entraran en un estat de repòs en què la cèl·lula sí que realitzarà les funcions en el teixit en el qual es troba, però no durà a terme la divisió. Algunes cèl·lules que entren en la Fase G0 romanen allí indefinidament, altres, tornen a entrar en el cicle i segueixen dividint-se.

Degut a la importància d'una correcta regulació del cicle cel·lular, existeixen diversos punts de control on es comprova si es compleixen determinades condicions en la cèl·lula, si no és així, el cicle no avança.

En la transició G1/S es comprova si la cèl·lula adquireix la mesura suficient per dividir-se, si té suficients nutrients i l'estat de l'ADN. Si la cèl·lula passa aquest punt de control, i un cop el genoma s'ha duplicat, es comprovarà si ho ha fet correctament en la transició G2/M. Si tot està correcte s'entrarà en la fase de la mitosi on hi ha un punt de control entre la metafase i l'anafase. En la metafase els cromosomes estan alineats en el centre de la cèl·lula i units al fus acromàtic, en l'anafase aquests es separen. El punt de control

que hi ha entre fases és útil per comprovar que els cromosomes estan alineats correctament per tal que el repartiment del material genètic sigui igual entre les dues cèl·lules. També es comprova que estiguin ben units al fus acromàtic.

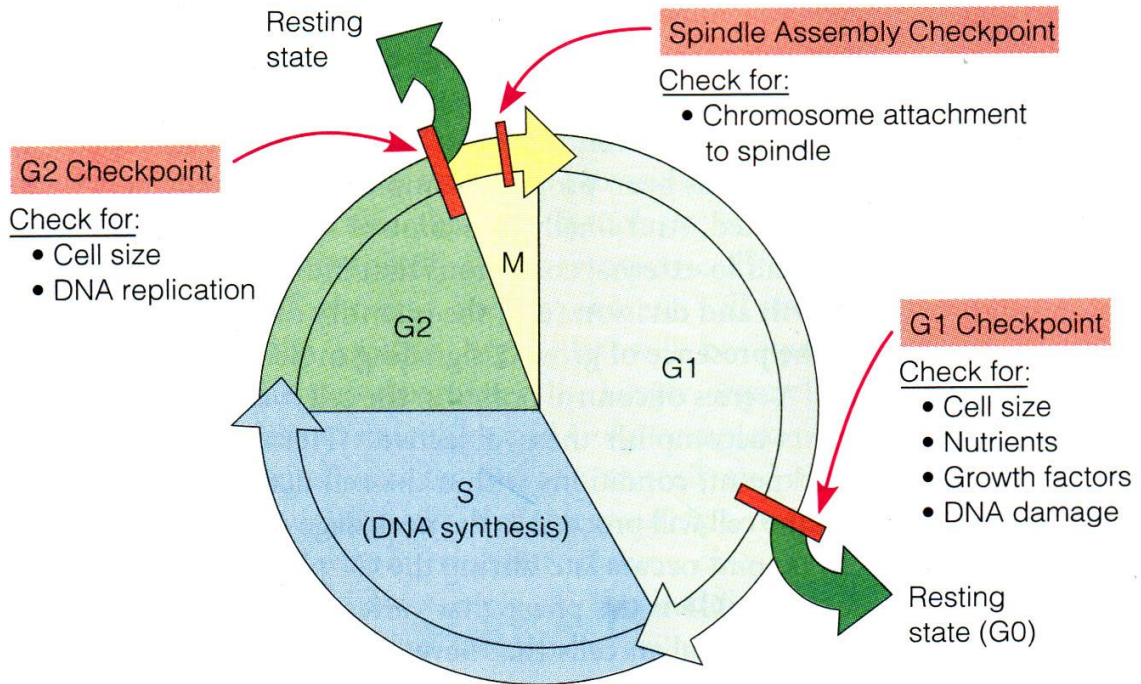


Figura 5: Punts de control en el cicle cel·lular. Font. [https://2.bp.blogspot.com/-ABTRQShY1o/WS23WNHKKpl/AAAAAAAAAyls/fO5P\\_r\\_QLaolYx9QfOGKyqtVT7qEseoNgCLcB/s1600/ciclo%2Bcelular%2B5.jpg](https://2.bp.blogspot.com/-ABTRQShY1o/WS23WNHKKpl/AAAAAAAAAyls/fO5P_r_QLaolYx9QfOGKyqtVT7qEseoNgCLcB/s1600/ciclo%2Bcelular%2B5.jpg)

És molt important que el cicle cel·lular estigui ben regulat, ja que si no és així, les cèl·lules poden esdevenir canceroses.

Els inhibidors en el cicle cel·lular s'encarreguen d'evitar la divisió de certes cèl·lules les quals no presenten les condicions adequades, si aquests redueixen la seva activitat, podrien ser capaços de promoure el càncer. A més a més, la sobre activació dels reguladors positius i la inactivació dels reguladors negatius podria ser també una entre les causes del desenvolupament del càncer.

Les formes sobre actives dels reguladors positius s'anomenen oncògens<sup>1</sup>, mentre que les formes normals s'anomenen protooncogens<sup>2</sup>. És a dir, si un protooncogén muta de forma que augmenta la seva activitat, es convertirà en un oncogen.

Aquestes mutacions poden produir-se de diverses formes, algunes canvien la seqüència d'aminoàcids de la proteïna de manera que alteren la seva forma i passen a ser sempre actives. En alguns altres casos, impliquen una ampliació de còpies extres d'un gen i, per tant, es comença a produir massa proteïna. Pot ser també que hi hagi errors en la reparació de l'ADN de manera que fixi protooncogens a la part d'un gen diferent i produeixi una proteïna "combo" amb activitat no regulada.

Les proteïnes que transmeten senyals dels factors de creixement són les que condueixen a la progressió del cicle cel·lular, són codificades per protooncogens. Si alguna d'aquestes esdevé sobreactivada a causa d'una mutació, pot transmetre senyals quan no hi hagi factor de creixement, d'aquesta manera la proteïna canviarà la seva estructura i ja no podrà canviar a la seva forma inactiva, la proteïna quedarà estancada en un estat "encès".

Els reguladors negatius del cicle cel·lular poden ser menys actius en les cèl·lules canceroses. Els gens que bloquegen la progressió del cicle cel·lular són coneguts com a supressors tumorals, si aquests muten, no funcionen, i, per tant, es poden formar tumors.

Un dels supressors tumorals més important és la proteïna tumoral p53, actua en el punt de control G1 i bloqueja la progressió del cicle cel·lular en resposta a l'ADN afectat o sotmès a condicions no favorables.

Si l'ADN d'una cèl·lula està danyat, la proteïna p53 paralitza el cicle cel·lular en el punt de control G1 en activar la producció d'un inhibidor del cicle cel·lular. L'ADN ha de ser reparat per tal d'alliberar la cèl·lula i continuar el cicle, la proteïna p53 en serà l'encarregada, activant els enzims reparadors de l'ADN. Si no s'aconsegueix reparar la cèl·lula, la proteïna activarà el procés de mort cel·lular programat, l'apoptosi, per tal que l'ADN perjudicat no s'hereti.

---

<sup>1</sup> Gen viral amb capacitat d'induir tumors. En l'actualitat, també els protooncogens amb activitat oncogènica comprovada poden rebre aquesta denominació.

<sup>2</sup> Gen contingut en el nostre genoma similar als oncògens virals i, per tant, amb potencial de convertir-se en un oncogen mitjançant una mutació.

En alguns tumors canceroses la proteïna p53 està mutada i, per tant, no pot unir-se a l'ADN i fer el seu treball. En aquests casos que la p53 és defectuosa, una cèl·lula amb l'ADN afectat podrà desenvolupar la divisió cel·lular, d'aquesta manera les cèl·lules filles heretaran les mutacions i al llarg de les generacions, la proteïna p53 tendirà a acumular mutacions, de manera que convertiran protooncogens en oncogens o inactivaran altres supressors tumorals. (Academy, 2008)

P21 és un inhibidor del cycle cel·lular que augmenta la seva detenció durant la fase G1/S, un punt de parada en el qual la cèl·lula deixa d'estar implicada en activitats de duplicació o divisió. Estudis mostren que la utilització d'aquesta proteïna pot ser objectiu de l'activitat de p53. Per tant, l'estudi de p21 ajuda a activar processos de la cèl·lula un cop danyat l'ADN.

La proteïna p21 és essencial pel desenvolupament de l'apoptosi, al mateix temps que s'ha vist que pot fer-li d'inhibidor amb la seva activació de la detenció del cycle cel·lular i la reparació de l'ADN.

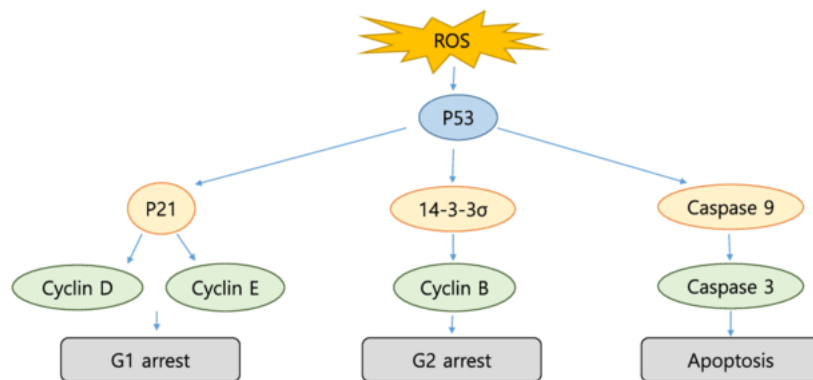


Figura 6: Modelatge de la ruta de la proteïna p53 en el cycle cel·lular, aturades i apoptosi. Font. <https://www.researchgate.net/publication/324531833/figure/fig2/AS:615724741562369@1523811626985/Modeling-of-p53-pathway-to-cell-cycle-arrest-and-apoptosis.png>

Tots els papers de p21 en la funció cel·lular es relacionen amb el desenvolupament d'un càncer. Aquesta proteïna, regula totes les funcions cel·lulars vitals que s'impliquen en la progressió i reacció terapèutica de cèl·lules canceroses.

P21 es considera una ajuda i un obstacle en la progressió del càncer, per una banda, estimula la detenció del cycle cel·lular per inhibir la progressió del càncer, però per una altra, s'associa a la inhibició de l'apoptosi, condició que permet el progrés del càncer. La reparació de l'ADN és vital a la protecció contra el càncer i, per tant, p21 pot contribuir a les activitats tumor-supressió. (Pública, 1997)



# CANCER

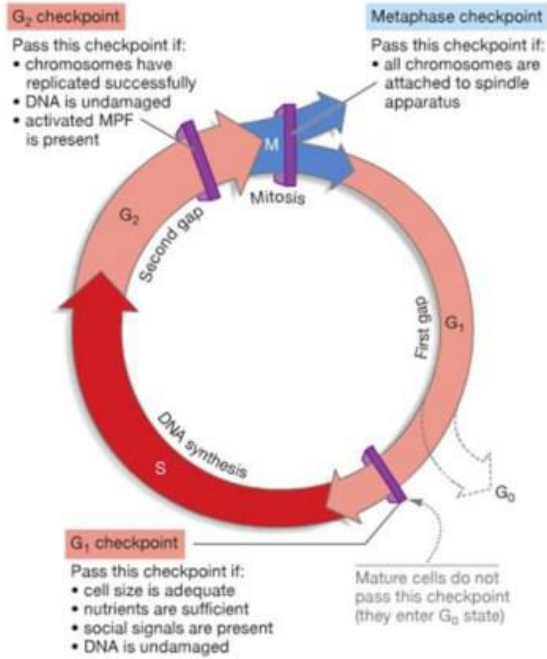


FIGURE 11.12 The Three Cell-Cycle Checkpoints.

Image from "Mastering Biology", Pearson 2011

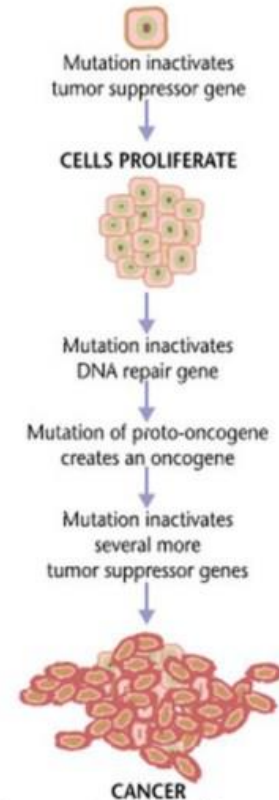


Image courtesy of Google images

Figura 7: Interrupcions en el cicle cel·lular.

Font. <https://bibalex.org/supercourse/lecture/lec41621/img005.JPG>

## **1.2. Mort cel·lular en càncer**

Està generalment acceptada la idea que les cèl·lules tenen propis mecanismes interns que decideixen quan produir la divisió, però fins fa poc es va afirmar que les cèl·lules tenien mecanismes interns que podien provocar la seva pròpia mort.

El càncer s'origina quan els mecanismes que sentencien la divisió cel·lular s'expandeixen cap a les seves funcions, tot i això, pot ser també que el càncer sigui produït per errors en els mecanismes que de manera natural impulsen la mort cel·lular.

La mort cel·lular en les seves diverses formes, és un procés crucial en els organismes multicel·lulars, ja que ajuda a mantenir l'homeòstasi dels teixits i a eliminar les cèl·lules potencialment nocives. De manera consensuada és possible distingir entre diverses classes de mort cel·lular: mort cel·lular accidental, regulada i programada (L. Galluzzi et al., 2015).

La majoria de les teràpies contra el càncer desencadenen diversos mecanismes de mort cel·lular per a eliminar les cèl·lules tumorals, deixant les cèl·lules normals il·leses tant com sigui possible. No obstant això, a vegades el tumor és capaç d'escapar d'aquests tractaments el que condueix a una proliferació descontrolada que dona com a resultat la supervivència del tumor i la resistència quimioterapèutica.

L'evasió dels mecanismes de mort cel·lular és una característica distintiva del càncer que contribueix a l'inici del tumor, la progressió i la resistència del tumor a la quimioteràpia. Per tant, moltes de les recerques en aquesta àrea estan enfocades a reactivar els programes de mort cel·lular en neoplàsies malignes humanes. L'evidència acumulada mostra que no pocs composts naturals exerceixen efectes nocius en les cèl·lules canceroses; amb efectes adversos mínims en les cèl·lules normals. Per tant, són una gran promesa per a les futures teràpies contra el càncer. S'han informat més de 3000 espècies de plantes per a tractar el càncer i fins ara s'han aïllat i provat al voltant de trenta composts derivats de plantes en assajos clínics de càncer. Els mecanismes moleculars d'acció dels medicaments contra el càncer d'origen vegetal s'associen sovint amb vies de mort cel·lular, especialment amb apoptosi.

### 1.2.1. Apoptosi

L'apoptosi és la mort cel·lular programada que ocorre en un organisme viu. Les cèl·lules són capaces de posar en marxa un programa suïcida com a resposta a determinades circumstàncies en qualsevol moment.

Aquest tipus de mort cel·lular és conseqüent de diversos canvis morfològics específics, diferents i diferenciables de la necrosi.

Les característiques principals de l'apoptosi són les següents:

- S'adquireix una forma rodona en les cèl·lules que podem veure a través de microscopis electrònics.
- El DNA es fragmenta i la cromatina (material genètic situat al nucli de les cèl·lules eucariotes) es condensa.
- El nucli se separa en masses petites de cromatina.
- La cèl·lula es trenca en vesícules que resulten rodejades de membranes, anomenades cossos apoptòtics, i que són reconegudes i devorades per cèl·lules veïnes.

Aquests canvis morfològics provoquen un senyal que arriba al genoma i impulsa una extensió de gens mortals amb uns productes els quals causen directament la destrucció apoptòtica.

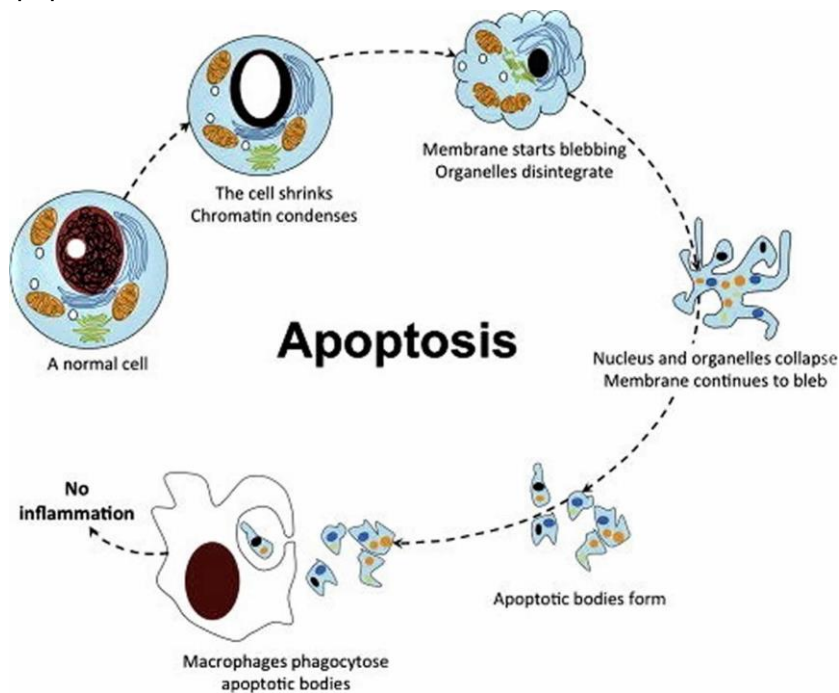


Figura 8: Procés d'apoptosi.

Font: <https://healthjade.net/wp-content/uploads/2019/04/apoptosis.jpg>

### 1.2.2. Autofàgia

L'autofàgia és un procés catabòlic altament conservat des dels llevats i fongs a plantes i mamífers sent responsable de la degradació lisosomal de proteïnes i òrgànuls danyats (Yang and Klionsky 2010).

Aquest procés representa el mecanisme principal mitjançant el qual les cèl·lules poden degradar proteïnes disfuncionals, ADN i òrgànuls danyats. El procés comença amb la formació d'una estructura membranosa denominada fagòfor o membrana d'aïllament que creix gradualment per a formar una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma. Els autofagosomes engoleixen regions del citoplasma i encapsulen material cel·lular envellit o danyat i es fusionen amb el lisosoma per a convertir-se en l'autofagolisosoma, on es degraden els continguts (Otten et al. 2016).

Com hem comentat l'autofàgia juga un paper important en la degradació d'òrgànuls danyats i proteïnes envellides i en el manteniment de l'homeòstasi cel·lular.

En la biologia del càncer, l'autofàgia exerceix un paper dual tant en la promoció com en la supressió de tumors. Per aquesta raó l'autofàgia és una arma de doble tall i té efectes paradoxals respecte al càncer. Hi ha evidències que indiquen que quan l'autofàgia és deficient el procés de carcinogènesis es facilita i es desenvolupen tumors amb major facilitat. Paradoxalment, els tumors que neixen en un entorn on l'autofàgia està impedita o dificultada, no aconsegueixen un fenotip agressiu i romanen com a tumors de baixa malignitat (Devrim Gozuacik).

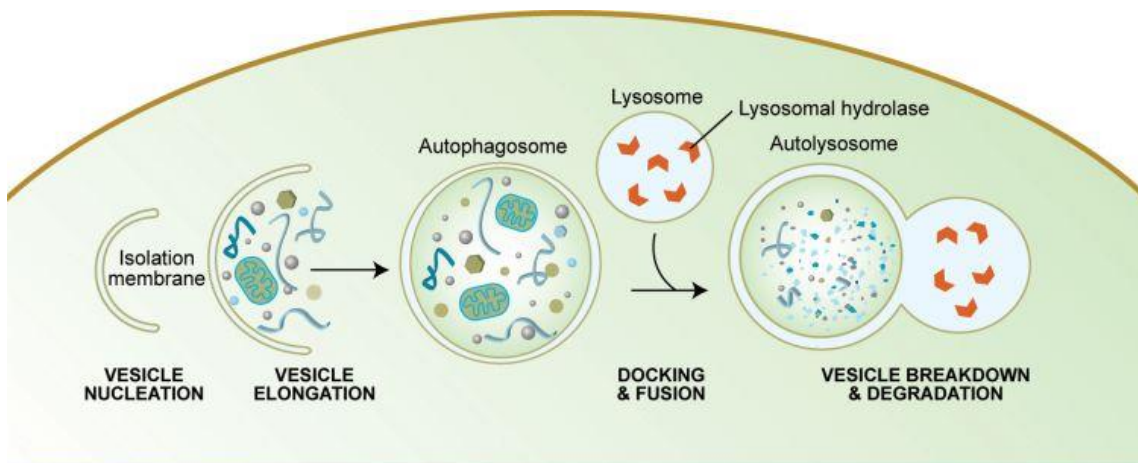


Figura 9: Procés d'autofàgia.

Font: <https://i.pinimg.com/originals/69/c5/33/69c533bdc15d0ea463d0cea2325073f3.jpg>

Alguns medicaments anticancerosos poden alterar la senyalització autofàgica per a induir un mort tumoral. Encara que aquest és un camp en plena recerca, cada vegada hi ha més evidència que relacionen l'autofàgia amb l'apoptosi com a mecanismes d'inhibició de cèl·lules tumorals. A més, la regulació de l'autofàgia contribueix a l'expressió de proteïnes supressores de tumors o oncògenes.

### 1.2.3. Necrosi

La necrosi s'ha considerat durant molt de temps una forma incontrolada i no programada de mort cel·lular amb conseqüències funestes per al teixit. Això és degut principalment als esdeveniments de ruptura de membranes cel·lulars i la consegüent sortida de material intracel·lular el que desencadena una reacció inflamatòria. Alguns patòlegs la defineixen com els esdeveniments ulteriors a la mort cel·lular. (Chaabane, 2012).

Morfològicament, la mort cel·lular per necrosi es refereix a un augment del volum cel·lular, inflor d'òrgànuls, ruptura de les membranes plasmàtiques amb la subsegüent pèrdua de contingut intracel·lular. Nombrosos mediadors i processos han estat implicats en la mort cel·lular necròtica, però encara no és clar com es relacionen entre si. (Proskuryakov et al. 2003).

Per l'anteriorment exposat, en la teràpia contra el càncer la necrosi sol ser una mort cel·lular no desitjada i els esforços en recerca és enfocant a provocar una mort més "neta" com l'apoptosi o la mort cel·lular associada a autofàgia.

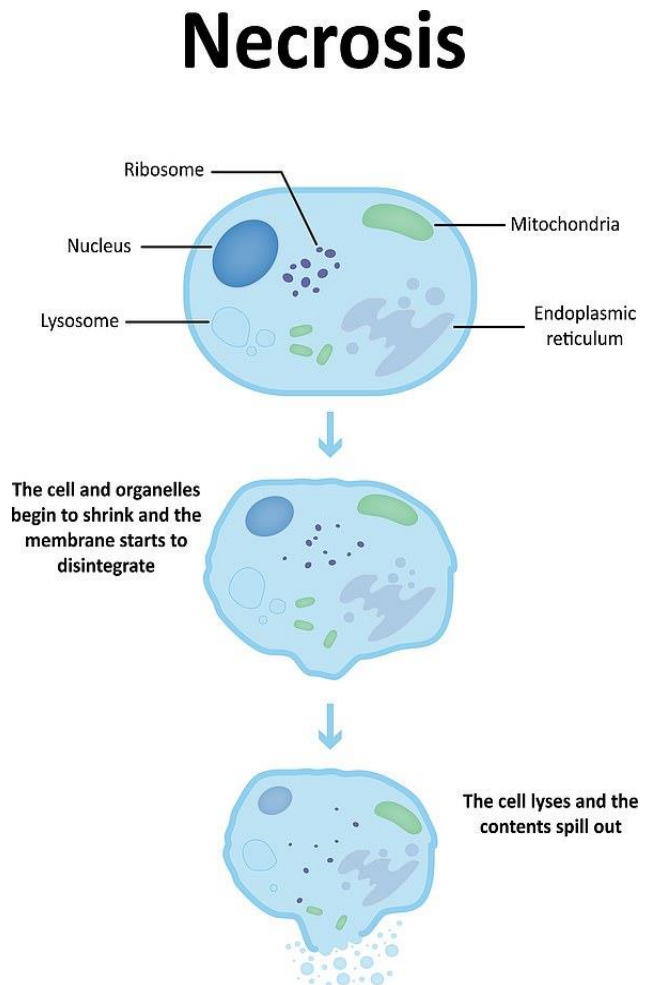


Figura 10: Procés de necrosi.

Font: [https://i.dailymail.co.uk/1s/2019/06/30/06/15433566-5332717-image-a-2\\_1561873272627.jpg](https://i.dailymail.co.uk/1s/2019/06/30/06/15433566-5332717-image-a-2_1561873272627.jpg)

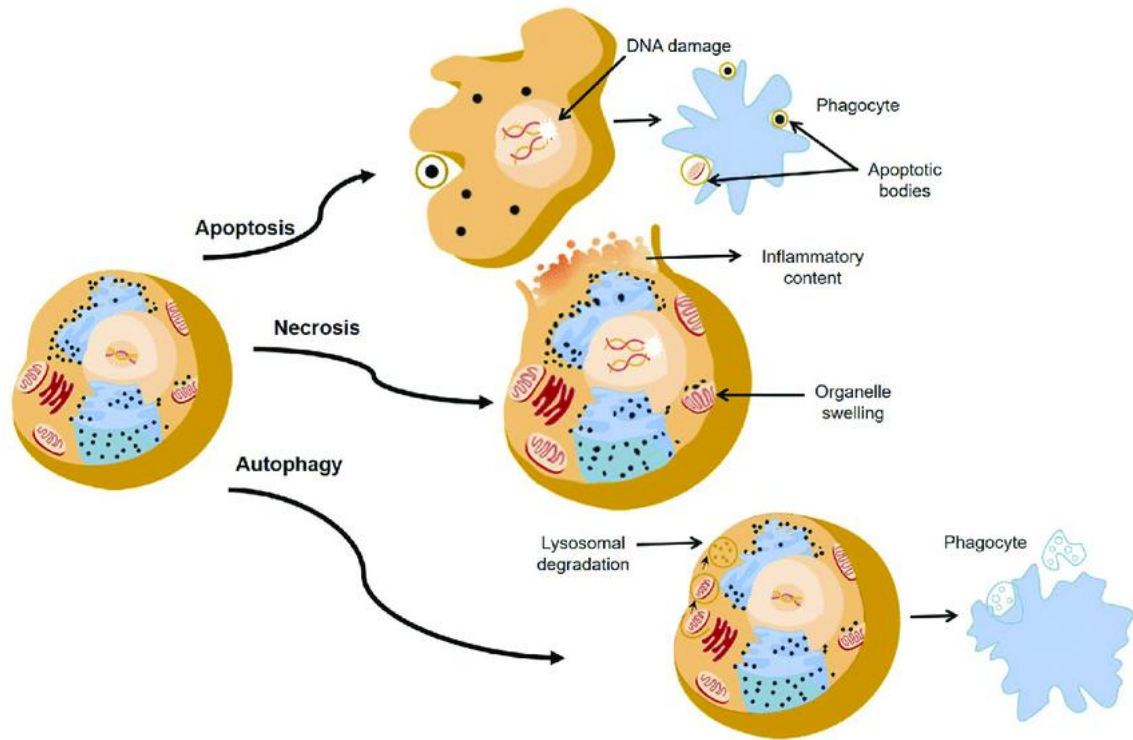


Figura 11: Diferència entre els 3 tipus de mort cel·lular.

Font: [https://www.researchgate.net/figure/The-major-pathways-of-death-cells-through-apoptosis-necrosis-and-autophagy\\_fig2\\_341868761](https://www.researchgate.net/figure/The-major-pathways-of-death-cells-through-apoptosis-necrosis-and-autophagy_fig2_341868761)

### **1.3. Investigació**

#### **1.3.1. Importància productes naturals**

Els productes naturals i els seus derivats han demostrat un enorme potencial en el desenvolupament de fàrmacs quimioterapèutics. De fet, el 52% del total de molècules aprovades des de 1981 fins al 2004 són productes naturals o derivats d'aquests. Cal destacar que en aquest mateix període, de les 131 molècules anticanceroses aprovades, el 49% es van derivar de productes naturals (Pan y col. 2012). Alguns exemples són el Paclitaxel (Taxol®) i el Docetaxel (Taxotere®) tots dos aprovats en la dècada dels 90 i utilitzats en el tractament del càncer de mama.

El Vincristine (Oncovin®) i el Vinblastine (Velban®) són altres exemples de fàrmacs derivats de productes naturals i àmpliament emprats en el tractament de diversos tipus de càncer, inclosos el càncer testicular, de mama i de bufeta (Dias y col. 2012).

Les fonts d'obtenció dels productes naturals són molt àmplies i s'estén des dels ecosistemes marins fins a plantes que habiten en la superfície de la terra. Productes naturals d'origen marí han sigut objecte de recerca amb bons resultats. Aquest és el cas del Plitidepsin (Aplidin® APL), un compost químic extret de l'ascídia *Aplidium albicans* mediterrània que ha demostrat una importància activitat anticancerosa tant in vitro com in vivo (Barboza y col. 2012).

Un altre compost en estudi és el Mesilat d'Eribulina, (Halaven®, E7389) un subproducte aïllat d'una espècia d'esponja i que va ser aprovat per la FDA al 2012 pel tractament del càncer de mama i de càncers avançats que no poden ser extrets mitjançant cirurgia (Majolo y col. 2019).

Les plantes són els organismes més empleats en la cerca de molècules amb potencial terapèutic. Una sola planta té centenars de metabòlits que poden ser aïllats i purificats i empleats en l'estudi de substàncies bioactives. Molts són exemples de metabòlits extrets de plantes emprats en recerca.

La següent taula exposa només una mostra de l'ampli espectre de metabòlits estudiats en la recerca del càncer (Majolo y col. 2019).



**Table 1**  
Important and promising researches related to new compounds extracted from natural products with anticarcinogenic potential.

Families	Species name	Part(s) used	Compound isolated	Action/ Activity	References
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> L.	Fruit	Unidentified	Cytotoxic activity in breast cancer cells	Abdullah et al., 2014
Apocynaceae	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> Lindl.	Roots	Alkaloid: cryptolepine	Cytotoxic activity in breast cancer cells	Ansah and Mensah, 2013
Asteraceae	<i>Holrthana floribunda</i> (G. Don) Dur. and Schinz	Leaves	Unidentified	Antioxidant and antimutagenic activities	Badmus et al., 2013
	<i>Artemisia annua</i>	Fruit	Carotin	Inhibits proliferation and self-renewal of liver stem cells	Shituman et al., 1999
	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Aerial parts; leaves and buds	Essential oil	Cytotoxic activity and induction of apoptosis in leukemic cells	Saleh et al., 2014; Teyaran-Najaran et al., 2013
	<i>Mikania spp</i>	Leaves and aerial parts	Sesquiterpene Coumarins	Cytotoxic activity	Rufato et al., 2013
	<i>Inula linearifolia</i> Turcz	Aerial parts	Sesquiterpenoids	Cytotoxic activity; induction of apoptosis; inhibition of cell growth in breast cancer cells	Qin et al., 2013
Campanulaceae	<i>Tanacetum parthenium</i> L.	Leaves	Parthenolide	Anti-inflammatory, anti-migraine properties and anticancer activities	Koprowska et al., 2010
	<i>Platycodon grandiflorum</i>	Roots	Platycodon saponin	Cytotoxic effects against cancer cells, neuroprotective activity, antiviral activity, and cholesterol lowering effects	Nyakudya et al., 2014
Capparidaceae	<i>Capparis spinosa</i> , <i>Piper genus</i>	Leaves	Quercetin	Antioxidant and hepatoprotective effects	Kalantari et al., 2018
Cephalotaxaceae	<i>Cephalotaxus harringtonii</i> (Forbes) K. Koch	Leaves	Alkaloid	Treatment of adult patients with chronic myeloid leukemia with resistance and/or intolerance to two or more tyrosine kinase inhibitors.	Camp, 2013
Clusiaceae	<i>Garcinia hanburyi</i> Hook	Aerial parts	Gambogic acid (gamboge)	Antitumor activity in non-small cell lung cancer, colon cancer and kidney cancer, under clinical phase IIA.	Chi et al., 2013
Compositae	<i>Atractylodes macrocephalae</i>	Roots	Atractylenolide	Antiinflammatory, antibacterial, and antitumor effects and acts against disorders of the gastrointestinal tract.	Ma et al., 2014; Yu et al., 2016a; Yu et al., 2016b
	<i>Silybum maritimum</i> (L.) Gaertn.	Fruit	Silibinin	Hepatoprotective properties	Wesolowska et al., 2007
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia pepus</i> L.	Sap	Diterpenoid	Topical treatment of actinic keratosis for use on the face, scalp, trunk, and extremities.	McKerrall et al., 2015
	<i>Psoralea corylifolia</i> L.	Whole plant	Psoralidin	antibacterial, antitumor, antioxidant, anti-inflammatory, antifungal and immunomodulatory activity	Choopra et al., 2013
	<i>Tamarindus indica</i>	Pericarp and seeds	Apigenin	Chemopreventative, antioxidant, anti-mutagenic, antiinflammatory, and antiviral properties.	Patil et al., 2015a,b; Romanova et al., 2001; Hashemi et al., 2010
	<i>Spatholobus suberectus</i>	Cauli	Isoliquiritigenin	antiproliferative effects, suppression of metastasis, angiogenesis, and the induction of apoptosis	De Paec et al., 2013; Jung et al., 2014; Fessler et al., 2013; Zheng et al., 2014
Gramineae	<i>Bambusa Caulis in Teantum</i>	Bark from bamboo stems	Unidentified	Anti-metastasis activity in murine melanoma and human fibrosarcoma cells.	Kim et al., 2013
Lamiaceae	<i>Hyssis crenata</i>	Leaves	Linalool	Cytotoxic and antiproliferative effects, insecticidal, antimicrobial and antioxidant activity; gastroprotective and ulcer healing effects.	Freire et al., 2013; McNeil et al., 2009
	<i>Mentha piperita</i>	Leaves and stems	Linalool	Antioxidant properties	Nilo, 2015
	<i>Mentha spicata</i>	Leaves	Linalool	Antimicrobial activity	Chirini et al., 2016
	<i>Ocimum basilicum</i>	Whole plant	Ursolic acid	Antiviral activity	Chiang et al., 2005;
	<i>Salvia dorriti</i>	Whole plant	Linalool	Chemopreventative, antioxidant, anti-mutagenic, antiinflammatory, and antiviral properties.	Patil et al., 2015a,b; Romanova et al., 2001; Hashemi et al., 2010
	<i>Salvia officinalis</i>	Whole plant	Apigenin	Antiseptic and anti-inflammatory	Garza-González et al., 2017
	<i>Thymus vulgaris</i>	Leaves	Ursolic acid	Inhibits proliferation and self-renewal of liver stem cells.	Shituman et al., 1999
	<i>Vitex trifolia</i>	Fruit	Carsticin	Antioxidant, antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic, analgesic, cytotoxic, antidiabetic, antileishmanial and protein glycation inhibitory activity	Iqbal et al., 2017
Lythraceae	<i>Lawsonia inermis</i>	Leaves	Apigenin		

## **1.4. Lípids en el càncer**

Part de les substàncies extretes de plantes emprades contra el càncer o per causar la mort de cèl·lules canceroses són de naturalesa lipídica, per tant, podem concloure una clara correlació entre lípids i càncer.

El terme "lípids" es refereix a una classe de molècules biològiques compostes principalment d'hidrocarburs com àcids grassos, glicolípid, esfingolípid i lípid esterol. Els lípids participen en una varietat de funcions fisiològiques i tenen funcions específiques depenent de la seva estructura química i localització dins o fora de les cèl·lules.

Com que els lípids són una font d'energia i un component bàsic de totes les cèl·lules vives, no és sorprenent que el desenvolupament del càncer (proliferació incontrolada de cèl·lules) estigui estretament lligat al metabolisme dels lípids.

Sabem que els productes amb els quals hem feinejat estan composts de lípids, proteïnes, carbohidrats i altres, encara que no en sabem les proporcions.

### 1.4.1. El metabolisme dels lípids en els tumors

Els àcids grassos i els seus derivats tenen rols indispensables en la biologia cel·lular, algunes funcions clau inclouen la formació de l'estructura bàsica de la membrana cel·lular, com a dipòsit d'energia i com a mediadors en cascades de senyalització cel·lular.

Estudis han indicat que la biosíntesi dels blocs bàsics de construcció cel·lular, incloent-hi proteïnes, àcids grassos i àcids nucleics, es modifica indicant que el metabolisme en cèl·lules canceroses altament proliferants és probablement alterat per donar suport al seu creixement anormal.

Els lípids i els àcids grassos en particular són necessaris per a la biosíntesi i modificació de la membrana de la bicapa lipídica en cèl·lules recentment formades i també per a altres rols relacionats amb la senyalització cel·lular i la supervivència del tumor.

Per augmentar la producció d'àcids grassos i altres lípids, les cèl·lules tumorals segresten la biosíntesi d'àcids grassos en benefici seu. Els enzims components en la ruta són normalment regulats en tumors i la inhibició o silenciament d'aquests enzims s'ha demostrat que restringeix el creixement de cèl·lules canceroses.

Estudis previs realitzats en diversos càncers han implicat la desregulació de mTOR en la mediació de la proliferació de cèl·lules canceroses. Més específicament, s'ha demostrat que els mTOR i SREBP augmenten la biosíntesi lipídica a través de la senyalització Akt que regula la proliferació, la migració, supervivència cel·lular, metabolisme i apoptosi. Aquest augment promou la proliferació de cèl·lules canceroses. La senyalització del complex mTOR 1 també condueix a una biosíntesi d'àcids grassos en cèl·lules canceroses activant una via de la proteïna SREBP o fosforilant l'inhibidor SREBP.

A més dels lípids, el complex mTOR també està implicat en la promoció de la biosíntesi de proteïnes i nucleòtids. En conjunt, aquestes troballes indiquen que la desreglamentació del complex mTOR 1 juga un paper metabòlic central en la promoció del creixement i la proliferació de les cèl·lules canceroses, permetent-los-hi "reprogramar" el seu metabolisme.

De fet, hi ha estudis sobre l'ús potencial d'inhibidors de mTOR com a fàrmacs de teràpia del càncer, donada la seva importància en el desenvolupament del càncer.

## **PART PRÀCTICA:**

El meu Treball de Recerca es basa en una investigació que ha dut a terme un membre del grup de recerca biomèdica de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB). Jo he estat col·laborant i formant part d'aquesta investigació.

El tema principal n'és el càncer i la seva relació amb els productes naturals, una de les primeres fases en el marc d'aquesta investigació és la selecció de composts capaços de suprimir o atenuar el descontrolat creixement de les cèl·lules canceroses. En aquest marc, ens hem donat a la tasca d'estudiar el possible efecte anticancerós de diversos composts naturals procedents de l'empresa LYOTEK.

Diferents grups de recerca d'arreu del món han dut a terme investigacions semblants.

Per començar, cal esmentar que aquest Institut està situat a Lleida i té diversos programes d'investigació i recerca sobre el càncer, patologies vasculars, respiratòries, sobre la diabetis i moltes altres.

Per introduir la part pràctica cal recordar la gran incidència que suposa, avui en dia, el desenvolupament de malalties, més concretament, del càncer. És una de les causes principals de mort en el món i diversos estudis n'afirmen el seu gran augment a mesura del pas del temps.

## **2. HIPÒTESI I OBJECTIUS**

Per a la realització d'aquest TDR ens hem plantejat com hipòtesi la possibilitat que els composts assajats afectin la viabilitat cel·lular in vitro amb l'objectiu de seleccionar can productes per futures investigacions.

En concret, es pretén determinar si els diferents composts provoquen mort cel·lular en dues línies cel·lulars.

Per tal de corroborar aquesta hipòtesi es plantegen els següents objectius.

1. Avaluació de la viabilitat cel·lular en cèl·lules HEK293.
2. Avaluació de la viabilitat cel·lular en fibroblasts de ratolins immortalitzats.
3. Observació de les modificacions estructurals de les cèl·lules exposades al tractament. (Pèrdua estructura cel·lular)
4. Elaboració de gràfics que relacionen la mort cel·lular amb les dosis emprades i els temps d'exposició.

Per tal de poder adquirir una bona familiarització amb el mètode científic, es plantegen els següents objectius:

1. Demostrar que l'esquema del mètode científic concorda racionalment amb l'estructura i composició d'una investigació en un laboratori.
2. Adaptació de les idees als fets mitjançant l'observació i l'experimentació.
3. Poder ampliar coneixements per la realització d'experiments.
4. Saber expressar, registrar i documentar correctament dades i resultats.
5. Analitzar dades estadísticament i valorar la fiabilitat de resultats obtinguts.

### **3. MATERIALS I MÈTODES**

#### **3.1. Materials i maneig**

Els materials utilitzats en la investigació són els següents:

##### **I. Micropipeta**

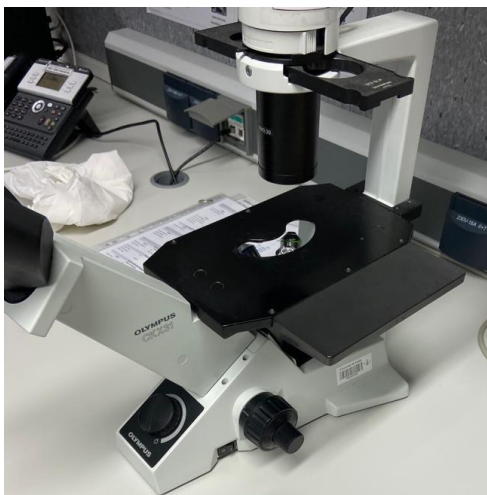
És un instrument que s'utilitza al laboratori per mesurar volums de líquids d'entre 1 i 1.000  $\mu\text{l}$ . Per succionar un determinat volum s'ajusta un botó que es troba a la part superior de la micropipeta. Per tal d'usar-lo pressionem l'èmbol i introduïm la punta dins del líquid que volem succionar, a continuació deixem lliure l'èmbol i ja tenim la mesura exacta que necessitem. Per buidar el volum succionat pressionem novament l'èmbol.



*Figura 12: Exemple micropipetes.  
Font: pròpia*

##### **II. Microscopi òptic**

Els trobem a la sala de cultiu, són una eina que permet observar elements que no poden observar-se o són invisibles a simple vista, a través de lents, visors i raigs de llum, que acosten o engrandeixen la imatge en escales convenientes per a la seva examinació i anàlisi.



*Figura 13: Exemple microscopi òptic.  
Font: pròpia*



*Figura 14: Exemple microscopi òptic.  
Font: pròpia*

### III. Eppendorf

Anomenem Eppendorf als tubs de microcentrífuga, el seu nom és la marca que els fabrica i són mundialment coneguts amb aquest nom. Són tubs petits de plàstic amb una tapa, completament estèrils. Tenen diversos usos com per exemple, per fer centrífugues o per mantenir mostres. Normalment són d'un sol ús.



Figura 15: Exemple pot amb diferents mesures d'eppendorfs.  
Font: pròpia



Figura 16: Exemple eppendorf.  
Font: pròpia

### IV. Bany termostàtic

És un dispositiu on s'hi realitzen banys maria. Consisteix en un sistema de calefacció que escalfa un líquid (en el nostre cas aigua) el qual està regulat per un termòstat. Aquest líquid subvenciona calor amb la substància que volem escalfar a una temperatura determinada o que volem mantenir a una temperatura fixada un cert temps.

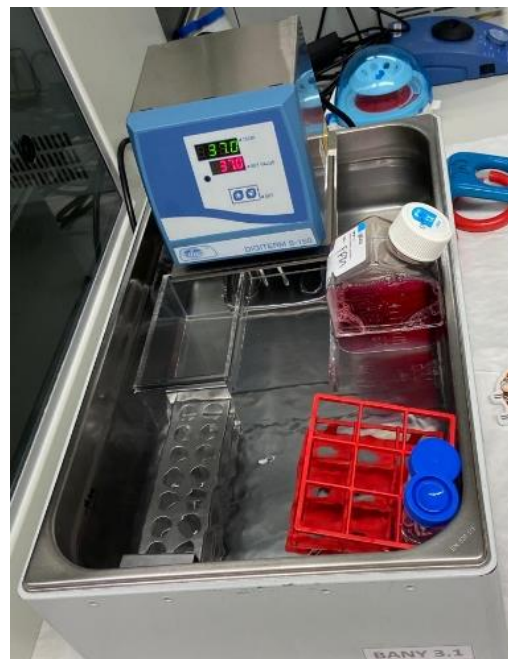


Figura 17: Exemple bany termostàtic.  
Font: pròpia



## V. Reactiu PrestoBlues

És una solució basada en “resazurina” preparada per a penetrar a les cèl·lules. Funciona com un indicador de viabilitat cel·lular mitjançant l'ús del poder reductor de les cèl·lules vives per mesurar quantitativament la proliferació de les cèl·lules. Quan el reactiu PrestoBlues s'afegeix a les cèl·lules, es modifica mitjançant la reducció de l'ambient de la cèl·lula viva i es torna de color roig amb alta fluorescència.



Figura 18: Exemple reactiu PrestoBlues.  
Font: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/product-images/A13262-650x600.jpg-650.jpg>

## VI. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

És un medi de cultiu utilitzat per afavorir el creixement de diferents tipus de cèl·lules de mamífers i conté sals, glucosa i piruvat de sodi.



Figura 19: Exemple DMEM.  
Font: [https://tse3.mm.bing.net/th?id=OIP.O5r92v5oXevzIxWpS4\\_xfQHafj&pid=Api](https://tse3.mm.bing.net/th?id=OIP.O5r92v5oXevzIxWpS4_xfQHafj&pid=Api)



## VII. Rack de laboratori

És un instrument que té com a finalitat mantenir dret tota mena de tubs, en el nostre cas eppendorfs.

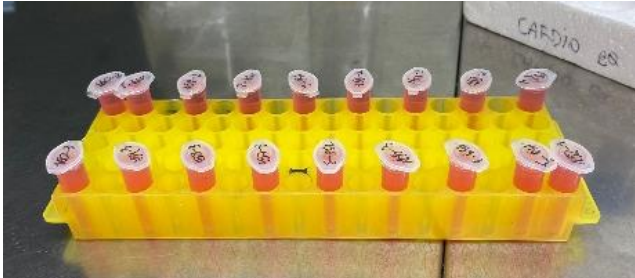


Figura 20: Exemple rack de laboratori amb els eppendorfs corresponents. Font: pròpia

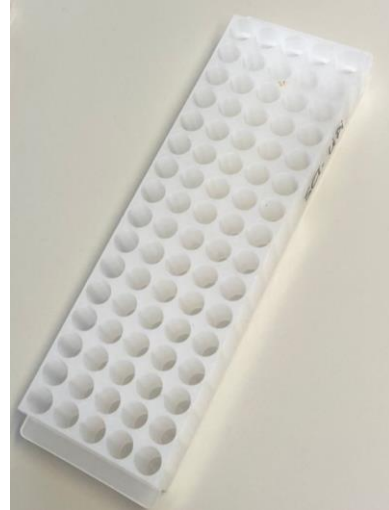


Figura 21: Exemple rack de laboratori. Font: pròpia

## VIII. Placa de Petri

És un recipient rodó de vidre o poliestirè amb tapadora no hermètica que s'utilitza en microbiologia per cultivar cèl·lules, i examinar el comportament dels microorganismes.



Figura 22: Exemple placa de Petri amb cultiu cel·lular.

Font: <https://www.dhmaterialmedico.com/material-medico/fotos/material-consultas-medicas-1429779592.jp.g>



Figura 23: Exemple placa de Petri amb cultiu cel·lular. Font: pròpia

## IX. Incubador

L'incubador és a dins de la sala de cultius. És com una petita nevera on guardem les cèl·lules a una temperatura de 37° i a un 5% de CO2 per a que estiguin en el mateix estat que tindrien dins del cos humà, condició més favorable per al creixement.



Figura 24: Exemple incubador.  
Font: pròpia



Figura 25: Exemple incubador.  
Font: <https://tse1.mm.bing.net/th?id=OIP.d12zZzLdFpoB-KpdJehSEwHaHa&pid=Api>

## X. Campana de laboratori

La trobem a la sala de cultius. L'aire està lliure de partícules contaminants, gràcies a un motor que filtra i que genera un flux cap a l'exterior per oferir totes les garanties d'asèpsia i esterilitat. Tot el treball amb les cèl·lules és realitzat en aquesta cabina, totalment estèril.



Figura 26: Exemple campana de laboratori. Font: pròpia



Figura 27: Exemple campana de laboratori. Font: pròpia

## XI. Lector de plaques de fluorescència

El lector de plaques de fluorescència consisteix en el mesurament de la llum emesa per una molècula fluorescent després de l'excitació per la llum a una energia més alta i una longitud d'ona més petita. La mostra excitada emet llum normalment a una energia més baixa i una longitud d'ona més llarga que la llum d'excitació i fluorescent al cap d'uns segons després de l'excitació. La llum emesa es filtra, es recol·lecta i es mesura amb el lector.



Figura 28: Exemple lector de plaques de fluorescència.

Font: <https://micromedica.com.co/wp-content/uploads/2019/10/89-CLARIOstar-Plus.jpg>

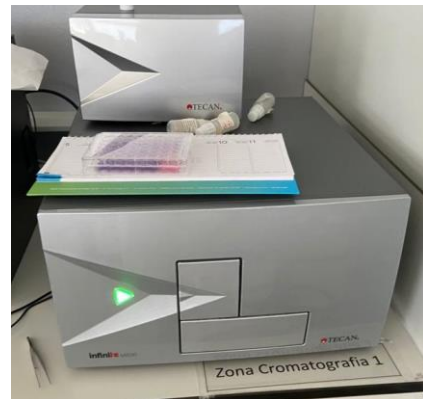


Figura 29: Exemple lector de plaques de fluorescència.

Font: pròpia

## XII. Centrífuga

Una centrífuga és una màquina que posa en rotació una mostra per separar per força centrífuga els seus components o fases en funció de la seva densitat.



Figura 30: Exemple centrífuga específica de tubs cònics.

Font: <https://tse2.mm.bing.net/th?id=OIP.GL-q1q49yC-Kz5VIZdEKeMAHaDP&pid=Api>



Figura 31: Exemple centrífuga específica d'ependorfs.

Font: <https://img.directindustry.it/images/di/photo-g/22548-14760749.jpg>

### XIII. Tampó fosfat salí (PBS)

És una solució tampó utilitzada en la recerca biològica, en el nostre cas per netejar els recipients que contenen cèl·lules, ja que és una substància isotònica i no tòxica per a les cèl·lules.

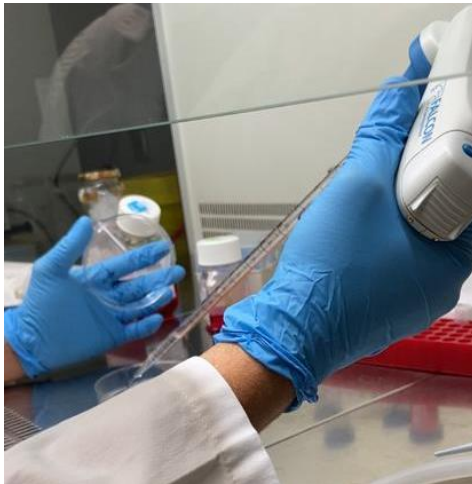


Figura 32: Aplicació PBS per netejar la placa de petri que contenia cèl·lules. Font. pròpia



Figura 33: Exemple PBS.  
Font: [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/BID/product-images/20012043\\_650x600.jpg-650.jpg](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/BID/product-images/20012043_650x600.jpg-650.jpg)

### XIV. Tripsina

És un enzim peptidasa, que trenca enllaços de les proteïnes mitjançant hidròlisi per formar pèptids o aminoàcids de menor grandària, en el nostre cas van ser utilitzades per desenganxar les cèl·lules que estaven al fons de la càpsula.



Figura 34: Exemple tripsina.  
Font: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/product-images/252000566\\_50x600.jpg-650.jpg](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/product-images/252000566_50x600.jpg-650.jpg)



### XV. Sèrum Fetal Boví (FBS)

Prové de la sang extreta d'un fetus boví i és el més utilitzat per la cultura cel·lular in vitro de les cèl·lules eucariotes, ja que té un nivell molt baix d'anticossos i conté més factors de creixement.



Figura 35: Exemple FBS.

Font: <https://assets.thermo.com/TFS-Assets/BID/product-images/A47362-01-FBS-Tet-System-650-x600.jpg>

### XVI. Thermomixer Comfort Eppendorf

És un aparell destinat a l'escalfament, el refredament i a la barreja de les mostres localitzades dins dels eppendorfs.

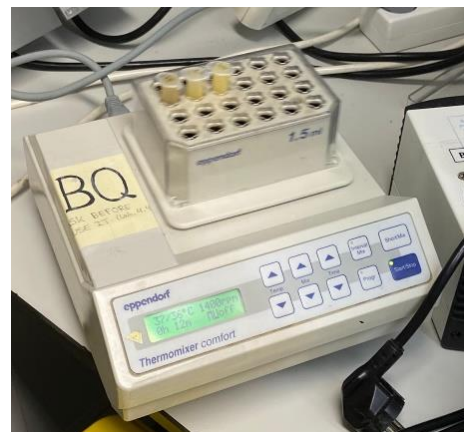


Figura 36: Exemple Thermomixer Comfort Eppendorf.

Font: pròpia

### XVII. Sistema al buit

És utilitzat al laboratori per filtrar i transferir líquids amb seguretat, ja que evita la formació d'aerosols, manté la pressió absoluta en un procés químic, sense utilització de vapor i amb recompressió de gasos aspirats a una pressió superior a l'atmosfèrica.

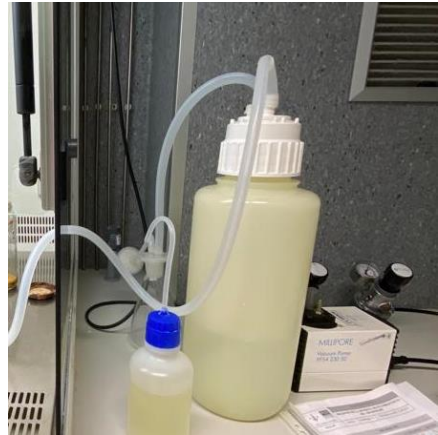


Figura 37: Exemple sistema al buit.  
Font: pròpia



Figura 38: Exemple sistema al buit.  
Font: <https://www.labolan.es/uploads/productos/big/1022408.jpg>

### XVIII. Tub cònic per a centrífuga

És un tub de fons cònic amb graduacions i parets internes planes per una preparació de mostra senzilla.



Figura 39: Exemple tub cònic per a centrífuga.  
Font: <https://tse4.mm.bing.net/th?id=OIP.5pKseb72kYqVGZP5UlypNgHaHa&pid=Api>



Figura 40: Exemple tub cònic per a centrífuga.

Font: [https://www.onelab.com.ar/images/thumbs/0004721\\_tubos-conicos-50ml-para-centrifuga-x-25u.jpeg](https://www.onelab.com.ar/images/thumbs/0004721_tubos-conicos-50ml-para-centrifuga-x-25u.jpeg)

### XIX. Microbalança

És una balança que ofereix la precisió més gran possible entre totes. Té una elevada sensibilitat que li permet pesar quantitats de mostra amb un pes molt baix, arriba a pesar fins a 30µg.



Figura 42: Exemple microbalança.  
Font: <http://basculas-balanzas.com/pdto-d/d-pioneer-a-1.jpg>



Figura 41: Exemple microbalança.  
Font: pròpia

### XX. Bany d'aigua

És un bany d'aigua multiús, resistent i d'alt rendiment. S'utilitza per mantenir aigua des de temperatura ambient fins 100°C.



Figura 43: Exemple bany d'aigua.  
Font: pròpia

## **3.2. Metodologia**

Per tal de treballar en la hipòtesi i objectius cal fer investigació sobre les línies de cèl·lules amb les quals volem feinejar, cultivades a unes condicions necessàries per al seu manteniment.

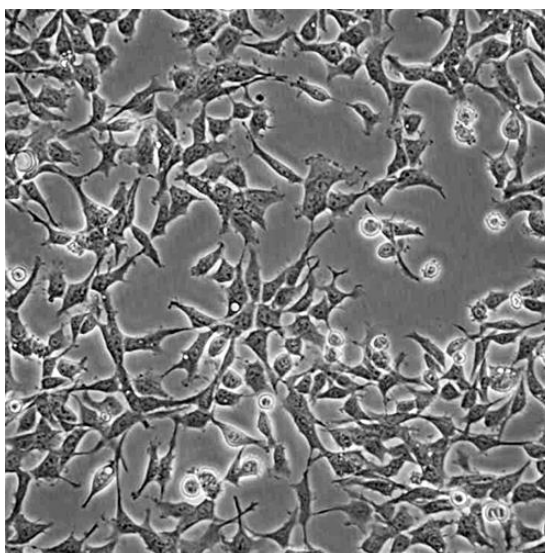
### **3.2.1. Línies cel·lulars**

A continuació es presenten aquestes línies que van ser cultivades en un medi de cultiu DMEM.

#### **Mostres biològiques de HEK293**

Les cèl·lules HEK293 són una línia cel·lular provinent de cèl·lules de ronyó d'embrió humà. Són molt senzilles de cultivar i es transfecten fàcilment. La seva mesura aproximadament és d'uns 10  $\mu\text{m}$ . Normalment, creixen adherides a una superfície, però es poden adaptar a créixer en suspensió.

**Com cultivar-les?** Per cultivar aquesta línia cel·lular utilitzem el medi de cultiu DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (Gibco) inactivat a 55°C i 20  $\mu\text{g/mL}$  de penicil·lina/estreptomicina (Gibco). El manteniment d'aquestes és col·locar-les en plaques de p100 dividint-les cada 2-3 dies en dilució 1:10. Les cèl·lules s'incuben a 37°C, en una atmosfera de 95% d'aire i 5% de  $\text{CO}_2$ .



*Figura 44: Mostres biològiques de HEK293 visualitzades des d'un microscopi òptic.*

Font: <https://innoprot.com/wp-content/uploads/2019/04/hek293-2.jpg>



### Mostres biològiques de fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF)

**Què són?** Els fibroblasts embrionaris de ratolí són un tipus de fibroblast preparat a partir d'embrions de ratolí. Són una línia cel·lular limitada, és a dir, després de varies transmissions envel·leixen i moren. Tot i això, els investigadors han trobat diverses estratègies perquè creixin indefinidament com són la infecció per virus o la transmissió repetida.

**Com obtenir cèl·lules MEF?** Inicialment, es necessiten ratolins femella embarassats. Un cop els hem sacrificat s'hi fa una incisió a l'estómac i s'hi separa l'embrió de la placenta, a continuació, s'extreuen el fetge i el cap i els restos es digereixen mitjançant enzims per tal d'obtenir cèl·lules individuals aïllades. Seguit d'això sols fa falta cultivar-les en plaques.

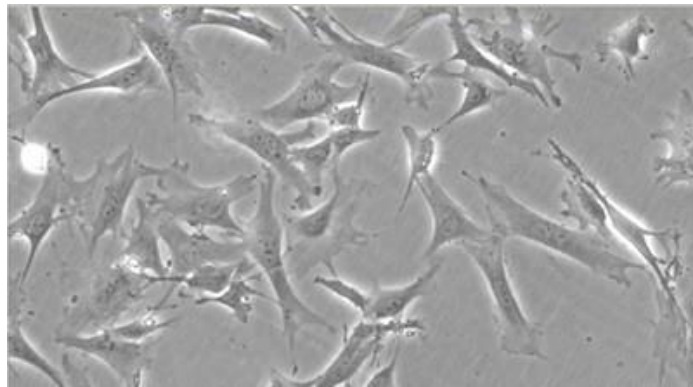


Figura 45: Mostres biològiques de MEF visualitzades des d'un microscopi òptic.

Font: <https://res.cloudinary.com/ximbio/image/upload/cfit/38ca8544-c02a-4e8e-bec1-c1262a22e585.jpg>

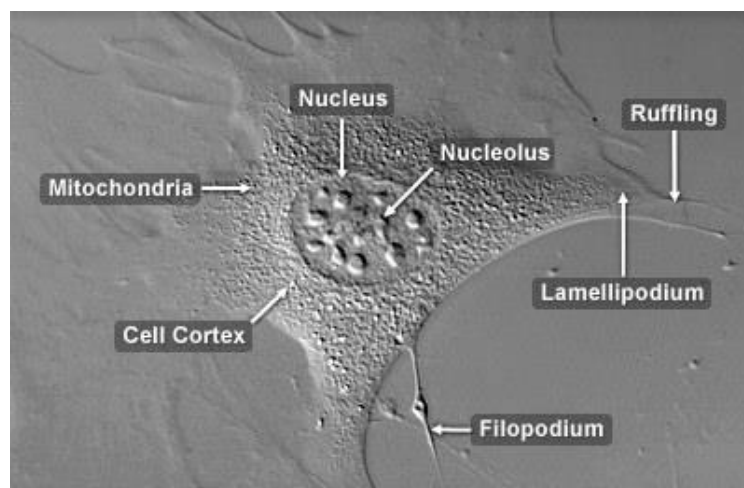


Figura 46: Parts de mostres biològiques de MEF visualitzades des d'un microscopi òptic.

Font: <https://www.microscopyu.com/assets/gallery-images/splash-3t3line.jpg>

### 3.2.2. Manteniment de les cèl·lules.

El manteniment de les cèl·lules és un punt molt important en qualsevol investigació realitzada en un laboratori, cal assegurar-nos en tot moment que les cèl·lules amb les quals treballem estan en bon estat i que es mantenen a uns nivells de temperatura i CO<sub>2</sub> adequats.

El material essencial pel manteniment d'aquestes, és el medi de cultiu, un substrat o solució de nutrients en el qual creixen i es multipliquen les cèl·lules en un laboratori. En el nostre cas, utilitzem DMEM, una solució comercial líquida amb nutrients i condicions favorables de pH i temperatura pel creixement del que volem. És necessari també controlar la presència o no d'oxigen o el grau d'humitat.

Per tal de tindre una mica més controlades aquestes condicions, una estona abans de la realització del treball, cal deixar el recipient que conté el medi de cultiu a un bany termostàtic, aquest el mantindrà a una temperatura de 37 graus centígrads.

Com hem mencionat anteriorment, el medi de cultiu ajuda a les cèl·lules a què puguin créixer, no és recomanable deixar-les molta estona sense cap mena de medi, ja que acaben morint. És per això, que durant la realització de les pràctiques és molt important que aquestes disposin en tot moment del medi i de les condicions necessàries per a créixer.

Un cop hem acabat de sembrar o de realitzar qualsevol mena de canvi a les cèl·lules, cal guardar-les a l'incubador, un equip àmpliament utilitzat en anàlisis biològics del laboratori per adaptar les temperatures de les mostres i guardar les càpsules de Petri prèviament sembrades. Aquest abastament es manté a 37 graus centígrads de temperatura i a un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.3. Productes

A continuació us expliquem el procés de preparació dels composts naturals subministrats per l'empresa LYOTEK, objecte d'aquesta investigació.



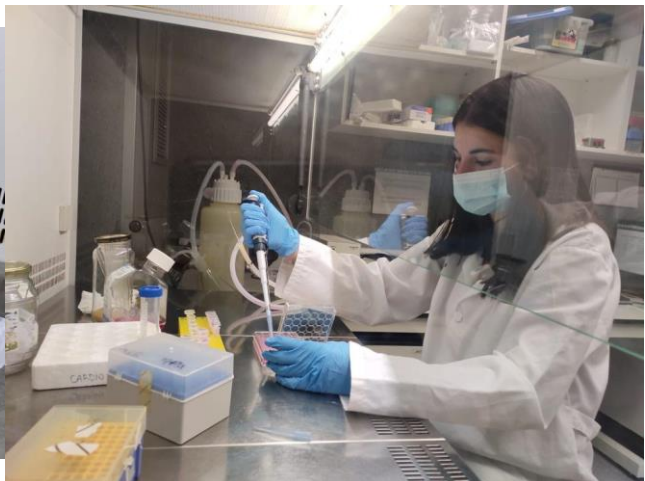
*Figura 47: Composts naturals subministrats per l'empresa LYOTEK. Font. Pròpia*

Tots els productes es van pesar i es van dissoldre en FBS a una concentració mare de 50 mg/mL i es van mantenir en agitació a 1400 rpm i 40 graus Celsius durant 30 minuts.

Posteriorment, es van diluir en DMEM fins a aconseguir una concentració de tractament de 0,2 mg/mL i 0,3 mg/mL.



*Figura 48: Procés de dissolució dels productes, amb les concentracions de 0,2 i 0,3 mg/mL, en DMEM. Font. pròpia*



*Figura 49: Procés d'agregació dels productes, a les concentracions corresponents, a les cèl·lules cultivades. Font: pròpia*

*Fórmula per calcular el FBS necessari per tal d'aconseguir concentracions de 0,2 i 0,3 mg/mL:*

**Concentració 1 x Volum 1 = Concentració 2 x Volum 2**

Els càlculs van resultar ser els següents:

- *Per una concentració de 0,2 mg/mL:*

$$50 \text{ mg/ml} \times \text{Volum 1} = 0,2 \text{ mg/mL} \times 2000 \text{ microlitres}$$

$$\underline{\text{Volum 1} = 8 \text{ microlitres}}$$

- *Per una concentració de 0,3 mg/mL:*

$$50 \text{ mg/mL} \times \text{Volum 1} = 0,3 \text{ mg/mL} \times 2000 \text{ microlitres}$$

$$\underline{\text{Volum 1} = 12 \text{ microlitres}}$$

Els productes es van deixar en agitació a 37 graus fins al tractament cel·lular.

Per mirar els canvis diferencials en la viabilitat de les cèl·lules, es realitza un curs temporal en les cèl·lules tractades, analitzant la fluorescència de cada mostra en els següents intervals de temps: 24h i 48h.

### 3.2.4. Determinació viabilitat

La determinació de la viabilitat cel·lular va ser realitzada mitjançant fluorescència utilitzant el reactiu Prestoblues. Aquest és una solució basada en resazurina (indicador redox), que té la capacitat de penetrar dins les cèl·lules i canviar de color, degut al poder reductor de l'ambient cel·lular. Aquest canvi de coloració és mesurat mitjançant un lector de fluorescència i és una mesura de la quantitat de cèl·lules viables que queden després del tractament.

El tractament cel·lular de Prestoblues es va administrar en una solució 1/10 V/V DMEM durant 45 minuts a 37°C, al termini d'aquest temps es porta al lector de plaques de fluorescència, un equip capaç de mesurar la llum emesa per les molècules fluorescents un cop excitades per la llum a una energia més alta i una longitud d'ona més petita. Aquesta llum que emet es filtra, es recol·lecta i es mesura amb un detector.

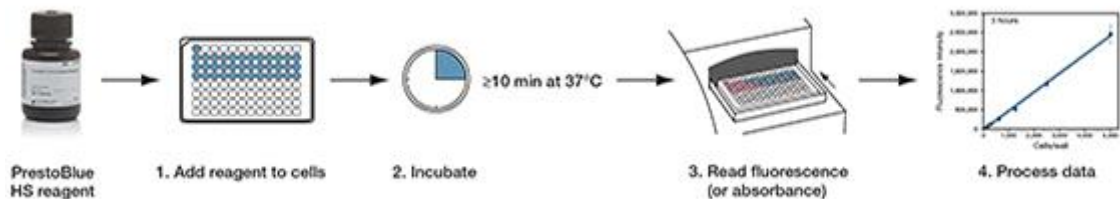


Figura 50: Procés a seguir a l'hora d'utilitzar el reactiu Prestoblues.

Font: [https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorescence-microplate-assays/microplate-assays-cell-viability/prestoblue-cell-viability-reagent/jcr:content/MainParsys/image\\_33c8/foregroundimg.img.320.high.jpg/1635769257261.jp](https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorescence-microplate-assays/microplate-assays-cell-viability/prestoblue-cell-viability-reagent/jcr:content/MainParsys/image_33c8/foregroundimg.img.320.high.jpg/1635769257261.jp)

### 3.2.5. Estadística

El lector capaç de mesurar la fluorescència de les plaques, va acompanyat d'un programa que a mesura que aquest va analitzant-ne les llums emeses, genera instantàniament una mena d'Excel amb totes les dades per tal de fer-ne els càlculs necessaris.

L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el software GraphPad. En el contrast d'hipòtesi, es va tenir en compte un nivell de significació estadística quan el valor de p era inferior a 0,05. Les comparacions es van realitzar mitjançant anàlisis de variància (ANOVA).

## 4. RESULTATS

Les cèl·lules van repartir-se en plaques de 48 pouets segons les concentracions i repartides en 4 plaques. Dues corresponents a 24 hores i 2 altres a 48 hores.

La placa que contenia les cèl·lules HEK293 tant a concentracions de 0,2 com a 0,3 mg/mL , un cop analitzada pel lector de plaques de fluorescència, va concloure la següent taula amb les unitats de fluorescència corresponents.

Temperature: 33.3 °C											
Well	Mean	StDev	0;2	1;2	2;2	2;1	1;1	0;1	0;0	1;0	2;0
A1	2271	932	317	1956	2139	3321	2882	1898	1846	2917	3163
A2	2118	836	518	1852	1966	2988	2832	1769	1432	2824	2880
A3	622	224	248	556	464	905	833	513	463	828	794
A4	658	169	364	563	542	789	860	585	596	858	762
A5	559	130	369	479	398	614	736	553	556	734	592
A6	557	140	423	487	318	557	758	610	613	730	515
A7	1650	553	1339	1413	604	1569	2283	2069	2077	2207	1293
A8	1567	565	1302	1383	319	1494	2090	2031	2007	2008	1470
B1	529	196	153	484	450	777	685	458	397	639	720
B2	541	167	489	421	442	757	712	340	341	664	699
B3	594	152	594	447	488	775	778	434	413	726	693
B4	614	127	596	462	532	735	806	518	475	749	648
B5	585	102	523	439	561	636	765	569	518	714	545
B6	580	110	471	439	573	550	764	632	583	721	491
B7	2629	616	1963	1969	2494	2031	3516	3205	2972	3259	2246
B8	1930	587	1405	1732	793	1853	2588	2506	2340	2363	1784
C1	533	168	242	490	537	785	679	457	363	576	669
C2	559	140	518	496	507	767	713	322	440	618	654
C3	776	169	782	694	668	1005	1013	565	561	875	822
C4	668	138	579	623	564	835	900	590	488	774	663
C5	571	107	458	537	505	658	768	577	464	674	501
C6	580	110	435	548	551	575	790	651	529	674	464
C7	2171	411	1697	1954	2117	1693	2872	2623	2182	2475	1930
C8	2255	517	1887	2121	1383	2122	2996	2892	2481	2522	1892
D1	551	168	324	552	637	807	710	455	305	544	630
D2	620	128	604	595	625	826	783	383	552	595	620
D3	2334	474	2123	2422	2243	3063	3067	1710	1828	2368	2180
D4	2311	487	1840	2492	2088	2929	3151	2096	1719	2463	2023
D5	567	116	435	621	488	668	779	583	435	612	481
D6	571	103	461	617	495	582	777	640	468	607	491
E1	971	318	740	1084	1224	1425	1249	824	367	876	951
E2	709	159	666	767	807	948	889	439	661	595	612
E3	569	124	470	659	623	734	744	417	530	498	450
E4	568	119	458	679	569	714	759	497	477	511	448
E5	566	105	478	667	508	659	756	576	452	518	486
E6	572	99	537	667	480	569	755	636	432	529	546
F1	644	245	539	773	877	942	834	553	142	542	590
F2	669	236	604	842	872	943	898	467	242	557	598
F3	542	158	439	678	663	722	731	424	296	460	464
F4	560	134	444	704	620	696	738	529	367	470	468
F5	629	135	556	791	627	726	846	628	446	530	510
F6	562	121	566	710	502	581	756	631	428	477	405

Taula 3: Unitats de fluorescència, és a dir, viabilitat cel·lular corresponent a cada pouet de cèl·lules HEK293 exposades 24 hores als productes. Font. Pròpia

Les mateixes cèl·lules, cultivades al mateix temps, solament modificant-ne el temps d'exposició, van concloure la següent taula.

	Temperature: 37.5 °C										
Well	Mean	StDev	0;2	1;2	2;2	2;1	1;1	0;1	0;0	1;0	2;0
A1	3982	1668	587	3246	3536	5646	4922	3424	3262	5278	5939
A2	3846	1565	1009	3156	3410	5398	4952	3113	2676	5128	5770
A3	717	234	294	611	634	954	956	602	553	923	927
A4	635	166	356	547	508	772	856	592	542	812	732
A5	429	100	289	368	299	457	571	435	433	566	445
A6	411	113	319	354	201	408	554	463	469	548	384
A7	3136	1110	2509	2666	946	2953	4335	4005	3996	4226	2590
A8	3072	1150	2559	2654	519	2892	4070	3982	4011	4007	2953
B1	407	140	136	365	355	591	521	354	320	491	530
B2	421	108	362	334	348	571	535	309	309	502	517
B3	556	131	513	443	471	710	726	427	400	680	638
B4	572	107	545	443	507	672	737	505	452	687	602
B5	446	74	397	335	426	467	577	446	408	541	414
B6	446	85	370	331	446	406	590	501	452	540	379
B7	3921	893	3062	2980	3685	3027	5214	4786	4459	4799	3275
B8	3421	1141	2598	2859	1097	3294	4591	4547	4292	4198	3309
C1	431	124	229	398	421	630	545	365	308	460	523
C2	437	94	398	383	389	586	552	297	369	475	484
C3	450	93	451	405	380	586	576	346	335	502	473
C4	1318	246	1206	1203	1104	1592	1750	1209	1010	1522	1264
C5	432	77	342	406	388	477	578	452	368	502	372
C6	445	78	340	406	426	426	594	499	413	515	382
C7	3803	759	3063	3378	3633	2773	5056	4686	3924	4316	3399
C8	3443	813	2943	3181	1963	3322	4572	4420	3830	3812	2943
D1	435	116	284	436	486	617	543	362	266	426	490
D2	470	93	446	453	480	629	584	309	407	450	473
D3	3315	636	2969	3372	3134	4298	4360	2609	2616	3351	3129
D4	3018	598	2502	3204	2649	3721	4115	2821	2318	3214	2618
D5	434	82	341	476	370	495	584	457	347	468	370
D6	441	74	364	459	400	431	591	504	371	467	380
E1	792	252	619	891	984	1147	1037	634	328	716	769
E2	1081	244	1014	1158	1217	1454	1375	678	980	923	933
E3	436	85	368	490	457	559	565	349	393	384	356
E4	436	87	353	502	430	539	584	411	348	398	355
E5	441	81	385	525	394	493	587	457	334	409	384
E6	437	75	405	502	374	418	574	492	328	399	444
F1	544	200	470	643	732	787	706	469	133	460	496
F2	665	214	592	832	840	919	872	491	280	556	599
F3	425	111	329	532	504	551	558	341	267	360	384
F4	446	100	355	556	472	543	597	404	315	379	390
F5	461	94	416	577	451	520	612	476	330	391	380
F6	433	93	438	547	372	435	586	489	336	365	324

Taula 4: Unitats de fluorescència, és a dir, viabilitat cel·lular corresponent a cada pouet de cèl·lules HEK293 exposades 48 hores als productes. Font. pròpia



Va ser realitzat el mateix procés de cultiu pels fibroblasts de ratolins i la taula de dades resultant al cap de 24 hores a l'exposició dels productes va ser la següent.

	Temperature: 37.4 °C										
Well	Mean	StDev	0;2	1;2	2;2	2;1	1;1	0;1	0;0	1;0	2;0
A1	5	2	2	4	6	7	4	5	3	6	6
A2	5	2	3	5	6	6	5	7	5	2	4
A3	826	266	366	676	693	1075	1101	689	666	1104	1062
A4	829	223	474	681	635	1000	1107	756	738	1093	977
A5	574	139	392	474	382	615	775	587	589	751	600
A6	567	157	440	489	279	548	771	640	656	757	527
A7	1255	424	1027	1050	401	1168	1719	1552	1596	1667	1115
A8	1199	445	992	1003	225	1137	1588	1560	1575	1550	1160
B1	6	2	3	7	9	5	3	7	7	8	6
B2	5	2	8	7	4	6	3	3	3	5	5
B3	718	173	714	550	588	929	924	547	511	877	821
B4	716	138	720	546	637	850	922	614	558	860	737
B5	604	98	537	471	598	634	783	587	541	729	560
B6	597	112	466	481	579	554	786	671	618	721	495
B7	1537	338	1218	1224	1312	1234	2035	1879	1754	1869	1310
B8	1419	446	1128	1266	498	1352	1897	1852	1733	1735	1309
C1	6	1	5	6	4	7	6	8	6	5	5
C2	7	2	7	8	9	4	6	7	8	5	6
C3	813	180	754	739	686	1070	1061	632	574	930	870
C4	848	163	757	800	716	1045	1124	772	635	976	810
C5	577	99	456	556	522	653	751	602	491	670	489
C6	596	103	453	559	573	571	785	682	561	685	497
C7	1455	265	1134	1308	1404	1131	1902	1749	1480	1633	1350
C8	1412	339	1234	1316	776	1333	1865	1816	1586	1571	1209
D1	625	171	387	611	704	892	803	535	386	620	683
D2	694	139	671	674	703	925	866	454	586	666	700
D3	1607	307	1500	1658	1520	2070	2105	1223	1281	1621	1487
D4	1583	295	1361	1694	1402	1970	2093	1454	1225	1670	1378
D5	582	110	466	641	497	663	776	617	452	630	492
D6	597	97	505	629	535	576	788	689	502	631	520
D7	1981	322	1847	2030	1807	1526	2560	2402	1809	2029	1814
D8	1811	383	1839	1884	1265	1680	2378	2309	1817	1847	1279
E1	925	280	701	1032	1140	1321	1188	804	407	832	899
E2	989	236	873	1115	1147	1337	1266	631	838	841	851
E3	579	119	480	664	626	744	749	437	529	513	472
E4	576	112	447	670	582	717	757	523	491	524	476
E5	573	104	486	680	526	656	748	599	430	523	509
E6	599	104	562	702	513	571	787	676	451	541	585
E7	1954	369	2005	2248	1706	1547	2581	2361	1565	1735	1839
E8	1896	459	2109	2171	1617	1778	2500	2456	1664	1715	1053
F1	763	275	669	931	1013	1082	990	661	196	644	683
F2	803	261	719	1005	1033	1109	1055	591	337	670	708
F3	564	152	463	708	682	732	736	459	326	471	494
F4	572	129	478	728	633	697	743	524	393	479	474
F5	643	132	614	806	636	719	844	667	462	531	504
F6	569	123	605	722	492	573	751	646	447	488	397
F7	1914	512	2254	2392	1720	1750	2546	2402	1543	1613	1005
F8	1919	563	2340	2322	1759	1819	2518	2459	1620	1678	752

Taula 5: Unitats de fluorescència, és a dir, viabilitat cel·lular corresponent a cada pouet de cèl·lules MEF exposades 24 hores als productes. Font. pròpia

Les mateixes cèl·lules cultivades el mateix dia, van ser exposades al producte durant 48 hores i els resultats van ser els següents.

	Temperature: 37.5 °C										
Well	Mean	StDev	0;2	1;2	2;2	2;1	1;1	0;1	0;0	1;0	2;0
A1	2990	1184	501	2603	2810	4323	3722	2602	2390	3819	4144
A2	3036	1165	824	2598	2801	4273	4024	2487	2170	4001	4144
A3	600	194	259	516	537	791	799	491	449	796	759
A4	571	147	333	484	467	682	757	517	481	749	667
A5	414	94	275	353	307	459	552	412	402	534	434
A6	411	102	315	362	233	409	542	456	451	548	383
A7	2677	849	2161	2270	1019	2542	3623	3302	3293	3557	2326
A8	2456	861	2047	2175	558	2356	3245	3146	3123	3167	2289
B1	392	142	121	363	353	581	507	332	290	458	525
B2	407	106	348	331	343	555	522	287	295	476	508
B3	454	111	457	358	382	589	593	336	310	538	525
B4	466	95	440	364	401	559	616	402	358	565	492
B5	428	72	374	337	407	467	550	418	372	523	401
B6	425	74	345	342	413	410	556	460	422	513	361
B7	2359	497	1818	1907	2188	1910	3097	2845	2623	2861	1983
B8	2336	681	1826	2078	1011	2191	3077	3042	2880	2804	2117
C1	398	125	195	367	405	592	509	332	262	424	495
C2	420	95	390	368	383	572	535	280	335	446	475
C3	421	91	424	386	363	550	543	307	303	466	444
C4	826	169	705	785	698	1025	1115	756	603	955	795
C5	411	78	322	397	358	480	550	426	331	479	360
C6	405	73	300	389	389	408	535	461	367	466	330
C7	2316	412	1862	2126	2177	1881	3033	2806	2304	2607	2052
C8	2313	528	1964	2192	1426	2192	3056	2968	2540	2592	1885
D1	377	124	232	380	445	566	510	254	214	367	429
D2	447	93	438	430	467	594	565	276	387	424	447
D3	2795	531	2635	2891	2726	3617	3604	2133	2152	2786	2607
D4	2497	503	2037	2723	2261	3147	3345	2329	1851	2606	2176
D5	388	76	305	438	336	456	516	401	293	417	332
D6	406	66	348	445	354	408	535	454	331	424	359
D7	1341	186	1255	1426	1249	1077	1688	1535	1219	1385	1236
D8	1333	256	1309	1386	1064	1223	1751	1688	1279	1326	967
E1	1072	357	805	1197	1370	1578	1382	906	401	956	1055
E2	1061	251	958	1162	1240	1436	1345	653	956	891	909
E3	402	89	324	464	454	522	519	302	372	343	316
E4	395	86	289	478	406	500	524	349	337	359	312
E5	402	74	327	478	378	459	533	405	317	371	351
E6	397	72	363	472	334	404	527	438	297	352	387
E7	1069	201	1069	1234	916	876	1417	1282	846	938	1047
E8	1287	294	1379	1459	1175	1206	1710	1636	1091	1168	758
F1	570	218	484	693	773	833	741	485	122	480	521
F2	515	184	482	652	677	729	685	362	176	422	447
F3	394	115	335	497	484	528	522	306	207	326	342
F4	405	96	342	511	462	500	527	363	261	334	344
F5	479	107	446	613	486	554	637	482	320	398	377
F6	404	87	420	512	361	411	541	449	304	344	295
F7	1297	345	1515	1658	1105	1196	1748	1608	1008	1081	753
F8	1332	398	1598	1654	1278	1261	1772	1701	1077	1112	532

Taula 6: Unitats de fluorescència, és a dir, viabilitat cel·lular corresponent a cada pouet de cèl·lules MEF exposades 48 hores als productes. Font. Pròpia

Tots els resultats de les taules obtingudes, van ser representats en gràfics que es mostren a continuació.

## **4.1. Graficació resultats i anàlisi**

### **4.1.1. Estudis de viabilitat cel·lular**

Les dues línies cel·lulars es van sembrar en plaques de 48 pouets en unes concentracions de 0,2 i 0,3 mg/mL producte/200µL pouet. La relació entre viabilitat cel·lular i producte es va establir per cada una de les línies de cèl·lules (HEK293 i MEF) exposades a diferents temps d'exposició (24 i 48 hores) i concentració (0,2 i 0,3 mg/mL). Es va trobar que el grau de viabilitat de cada una de les línies era diferent en funció de la concentració i les hores d'exposició al producte. En general, les cèl·lules Hek293 van respondre millor al tractament que les MEF. De fet, el producte 160P va ser el que més mals resultats va donar mentre que el 154P va ser dels millors, en les dues línies.

L'anàlisi de la viabilitat cel·lular revela que amb tractaments de 24 hores, la majoria de productes, mostren una davallada en la tasa proliferativa de les cèl·lules, no obstant això, sols algun d'ells ho fa de manera significativa (160P). Si s'analitzen els mateixos productes en uns temps d'exposició més extensos, 48 hores, s'observa l'augment de la mort cel·lular, exceptuant-ne un d'ells.

Per una part es va estudiar l'efecte que promouen les dues línies (MEF i HEK293) davant de tractaments amb concentracions de 0,2 mg/mL i 0,3 mg/mL, i, per una altra banda, aquestes dues van ser exposades a 24 i 48 hores de tractament, analitzant així els seus resultats.

Es van deixar a incubar cèl·lules MEF a 0,2 mg/mL de producte i al cap de 24 hores van ser observades. La gràfica va mostrar com la majoria de productes havien provocat valors entre 50 i 60% de mort cel·lular respecte el control (1478 unitats de fluorescència), mentre que un d'ells, el 160P, es mantenia completament.

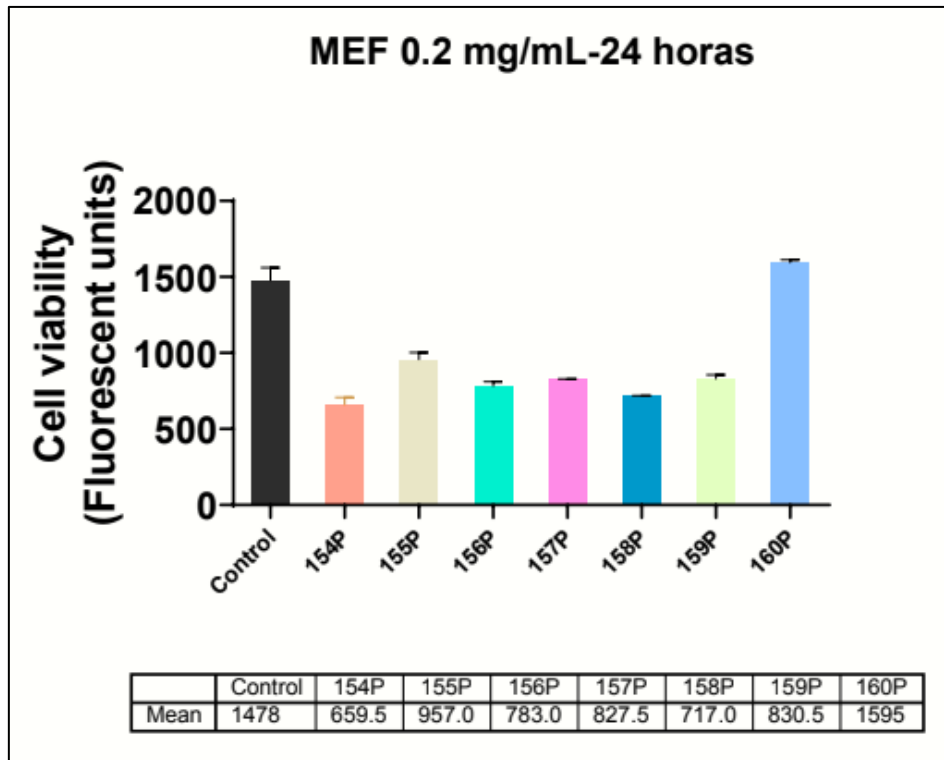


Figura 51: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en MEF. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,2 mg/mL a les 24 hores del tractament. Font: pròpia

A continuació es va realitzar el mateix procés, però aquest cop variant-ne la concentració, van ser incubats a 0,3 mg/mL. Els valors obtinguts van ser menors als de la Figura 51 i, per tant, van disminuir la proliferació cel·lular respecte aquesta. El producte 160P continuava presentant un gran valor d'unitats de fluorescència i això volia dir que la mort era menor en comparació amb la resta de productes. Aquest, provocava aproximadament 27% de mort cel·lular respecte el control.

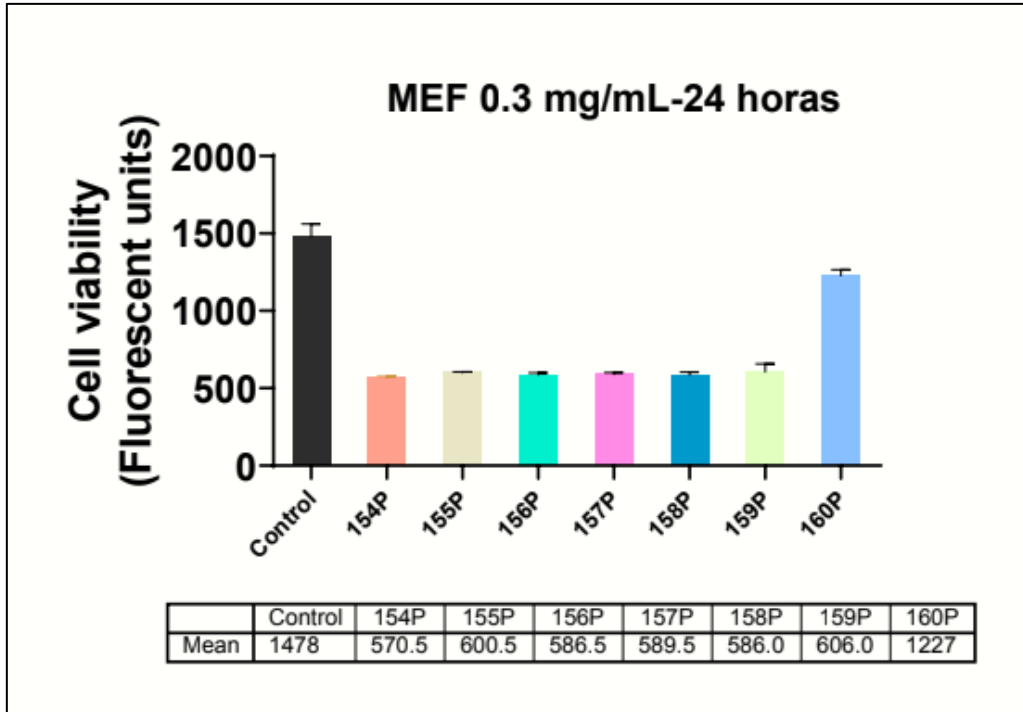


Figura 52: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en MEF. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,3 mg/mL a les 24 hores del tractament. Font: pròpia

Un cop passades les 24 hores es va deixar una altra placa amb productes exposats a les cèl·lules durant 48 hores seguides, de manera que un cop transcorregut aquest temps, es van tornar a observar els resultats. Les cèl·lules control s'havien duplicat, i en general, en els dos casos, es va poder demostrar clarament que el major temps d'exposició afectava positivament a la mort cel·lular. És a dir, les cèl·lules vives eren cada cop menys de manera que el percentatge de proliferació cel·lular a una concentració de 0,2 mg/mL era d'un 15-20% excepte els productes 155P i 160P. En aquests casos els percentatges de viabilitat cel·lular van resultar ser 35 i 87% respectivament.

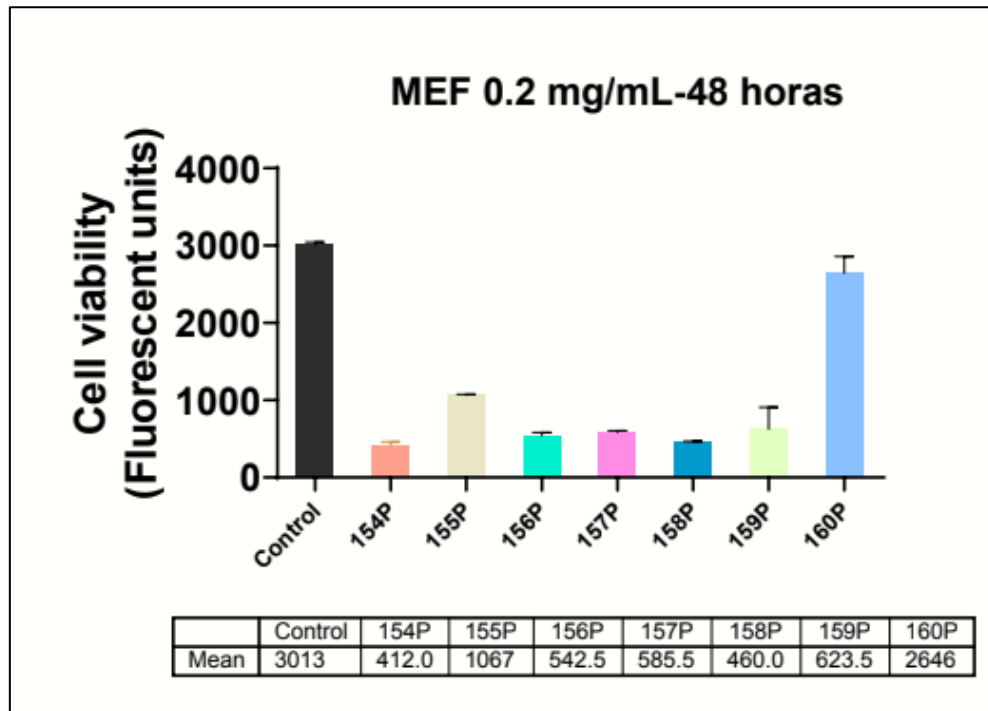


Figura 53: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en MEF. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,2 mg/mL a les 48 hores del tractament. Font: pròpia

Seguidament, analitzant els resultats de les cèl·lules MEF a 48 hores d'exposició als productes i a una concentració de 0,3 mg/mL vaig adonar-me que en aquest cas, la mort cel·lular era gairebé idèntica en tots els productes, a banda del 160P. La proliferació cel·lular era d'un 13% en tots els productes excepte del 160P que provocava una mort cel·lular únicament del 15% respecte al control.

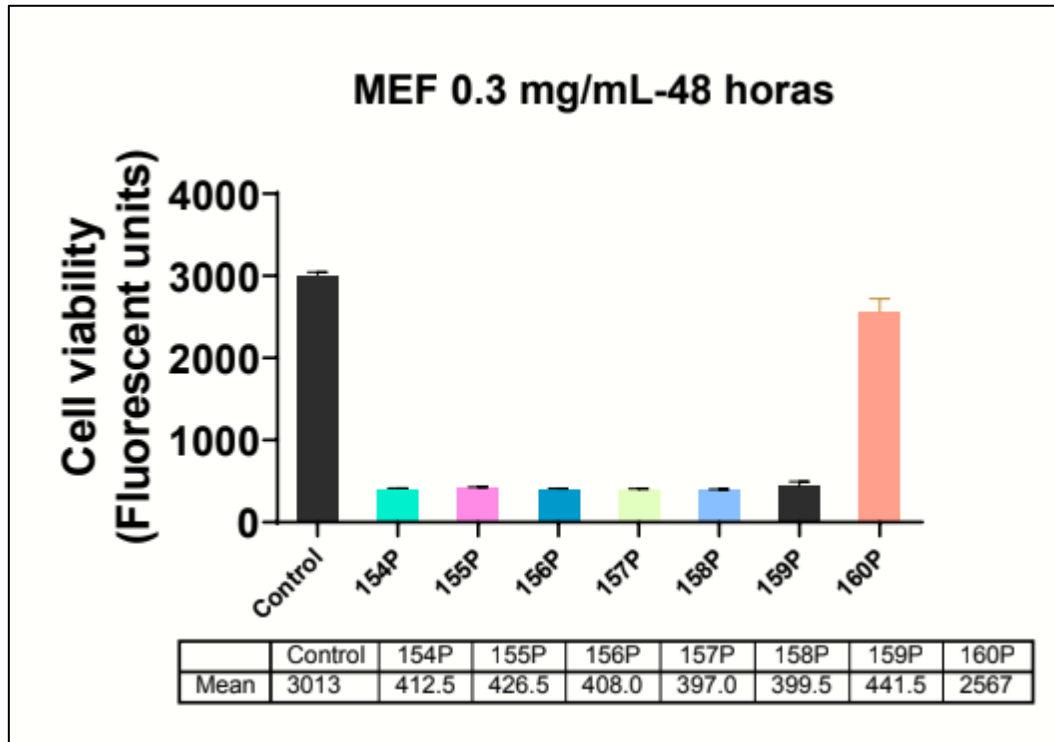


Figura 54: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en MEF. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,3 mg/mL a les 48 hores del tractament. Font: pròpia

Una vegada analitzats cadascun dels gràfics resultants de les cèl·lules MEF, vaig poder comparar-los basant-me en les concentracions i els temps d'exposició.

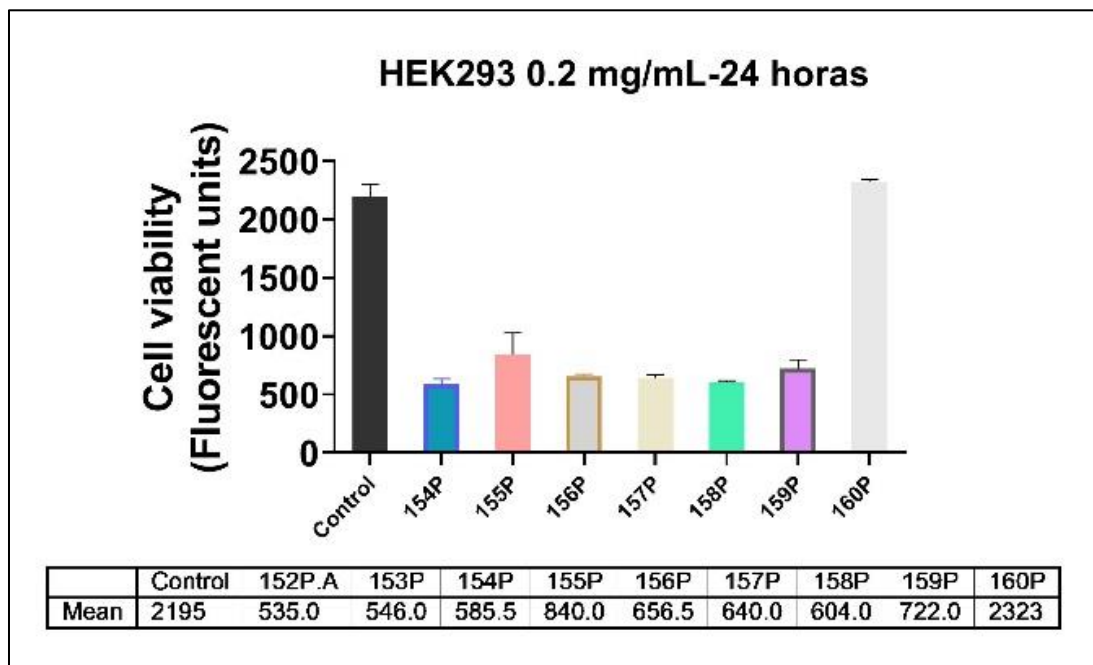
Es pot veure clarament diferenciada la mort cel·lular que provoquen els productes quan les hores d'exposició són majors, encara que variï la concentració, està completament clar si faran falta més o menys hores per tal d'aconseguir major o menor mort cel·lular. Els gràfics representats un cop transcorregudes 48 hores presenten més eficàcia per matar la línia cel·lular dels fibroblasts dels ratolins que no quan el temps al qual han sigut exposades, als productes, és menor (24h).

Les concentracions de 0,2 i 0,3 mg/mL, en canvi, únicament fan variar reservadament les unitats de fluorescència resultants. Quan la concentració és més baixa, els productes 155P i 159P es desmarxen una mica de la mitjana de viabilitat cel·lular que presentaran els productes quan la concentració sigui major (0,3mg/mL) en el cas de les cèl·lules MEF.



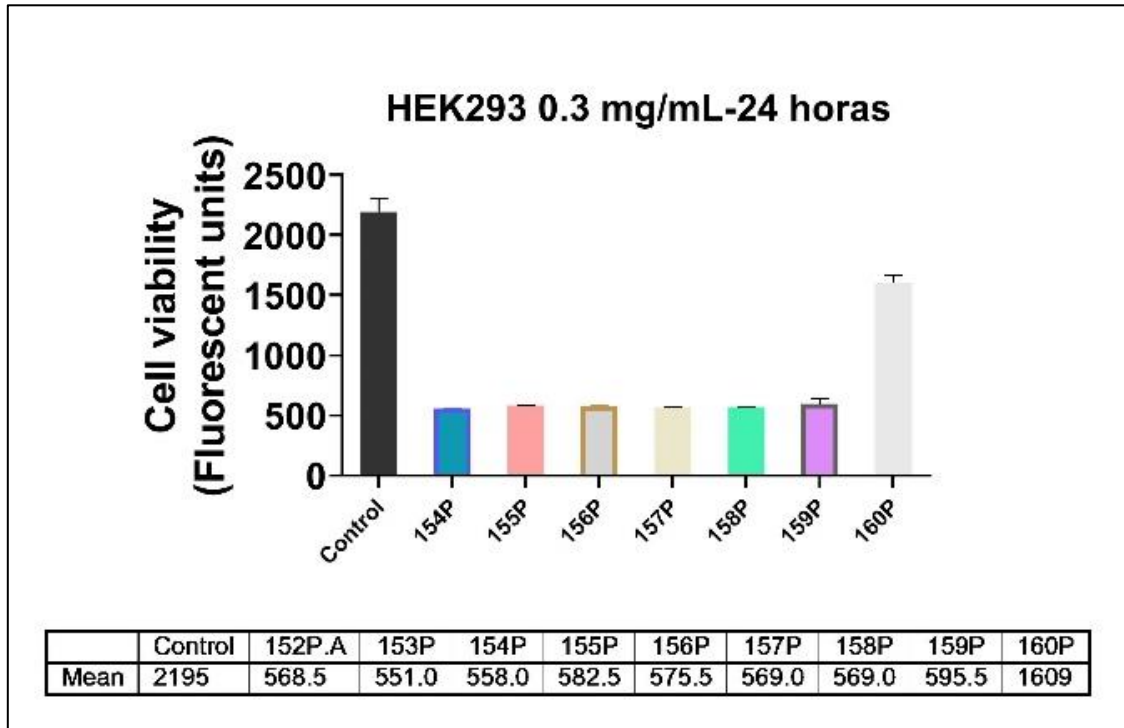
Un cop analitzades aquestes, cal fer el mateix procés amb la línia de cèl·lules HEK293. En aquest cas es va començar exactament igual que amb els fibroblasts de ratolins. Es van deixar a incubar cèl·lules HEK293 a 0,2 i a 0,3 mg/mL amb dos diferents temps d'exposició als productes.

Primerament es van analitzar les viabilitats cel·lulars de les cèl·lules un cop passades 24 hores incubant els productes. La gràfica que contenia la concentració menor va provocar una mort cel·lular d'un 77% aproximadament, entre una variació dels valors del 5% amunt, 5% avall, excepte en el producte 160P que no hi va haver cap tipus de mort, fins i tot en aquest cas, va augmentar la proliferació cel·lular d'unes 2195 unitats de fluorescència que presentava el control a unes 2323 que presenta el producte 160P un cop exposat al producte.



*Figura 55: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en HEK293. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,2 mg/mL a les 24 hores del tractament. Font: pròpia*

A continuació es va realitzar el mateix procés variant-ne la concentració, de 0,2 mg/mL inicialment, a 0,3 mg/mL. Els valors obtinguts van ser menors, és a dir, quan la concentració era major la mort cel·lular també, així es pot veure en la Figura 56 en la qual els productes presenten un 25%, aproximadament, de viabilitat cel·lular. El producte 160P continuava presentant un major valor d'unitats de fluorescència respecte a la resta de productes, la mort era molt més baixa comparat amb els altres. Aquest, provocava solament un 27% de mort cel·lular.



*Figura 56: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en HEK293. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,3 mg/mL a les 24 hores del tractament. Font: pròpia*

Seguidament, es va realitzar el mateix procés que en la línia cel·lular anterior, es va deixar incubant una placa 48 hores seguides per tal d'observar-ne de nou els resultats i poder-ne fer la comparació. En els dos casos de concentracions diferents vaig poder concloure que les cèl·lules que s'exposen a un major temps, provoquen més mort cel·lular. Els gràfics resultants un cop les cèl·lules van ser exposades a 0,2 mg/mL de producte després de 48 hores, van concloure que la viabilitat cel·lular era cada cop menor i que en aquest cas, les unitats de fluorescència rondaven pel 15% respecte del control. Els productes 155P i el 160P variaven una mica aquests resultats provocant un 73% i un 20% de mort cel·lular respectivament.

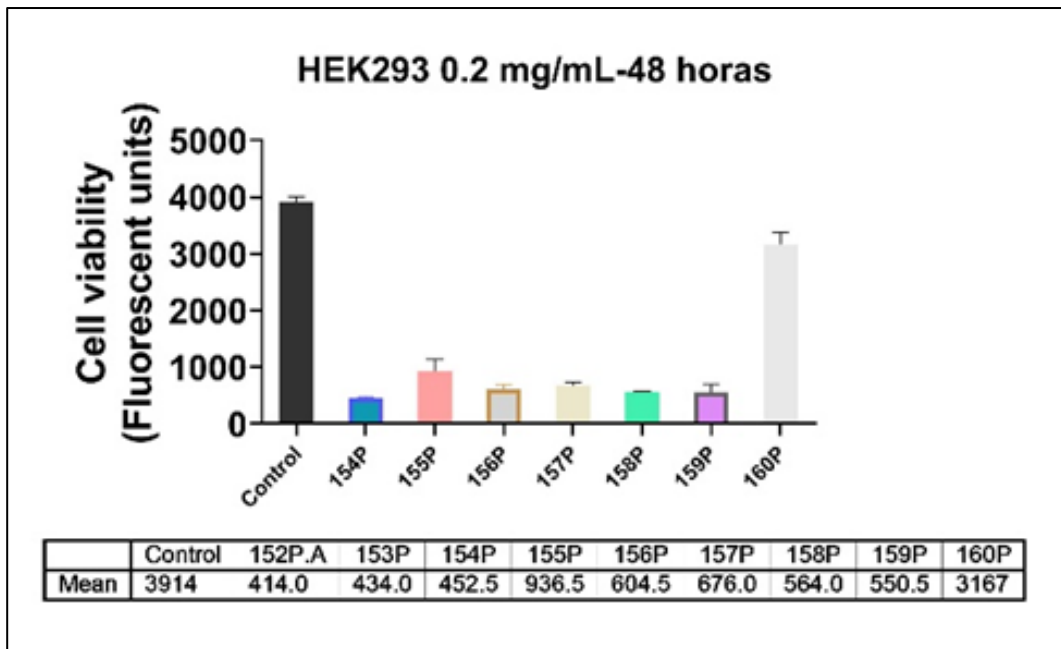


Figura 57: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en HEK293. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,2 mg/mL a les 48 hores del tractament. Font: pròpia

A continuació es va realitzar el mateix procés variant-ne la concentració a 0,3 mg/mL. Pels resultats vaig poder concloure, una vegada més, que com més alta és la concentració, més baixa és la proliferació cel·lular, és a dir, menys cèl·lules vives. Si n'analitzem la gràfica podem veure l'alt grau de mort cel·lular que provoquen les variacions de concentració i temps d'exposició a les cèl·lules HEK293. Els productes presenten un 10% de proliferació cel·lular respecte el control, excepte del 160P que com en tots els casos presenta molt poca mort cel·lular, solament mata un 20% de la viabilitat cel·lular representada en el control.

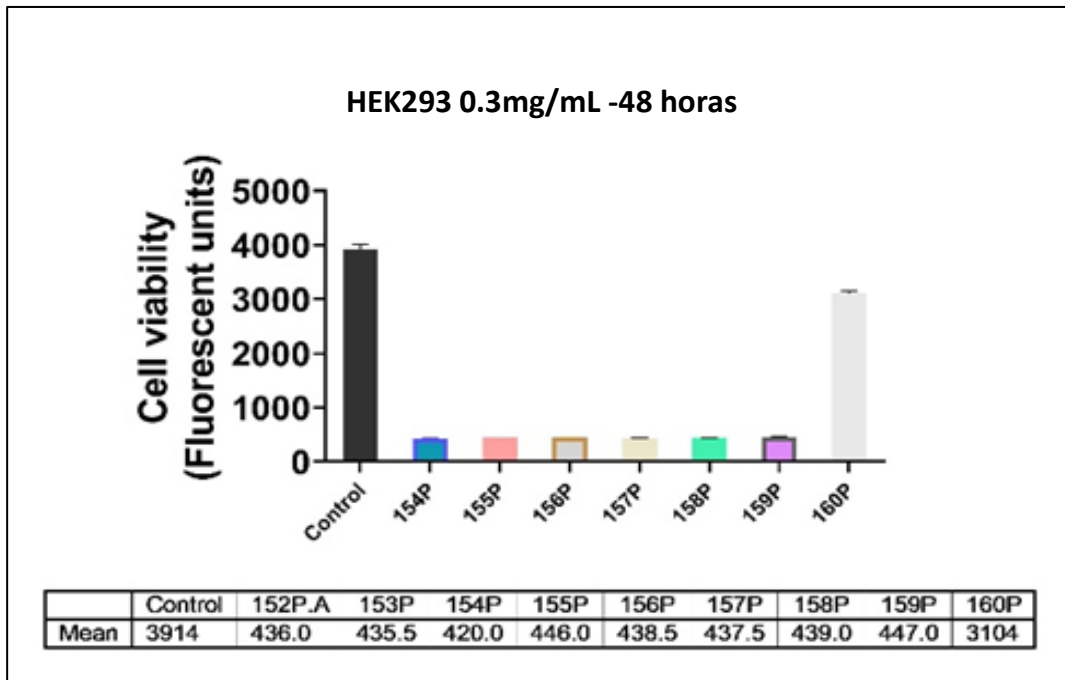


Figura 58: La gràfica representa la viabilitat cel·lular obtinguda mitjançant fluorimetria en HEK293. Es representen les mitjanes amb les desviacions estàndards a 0,3 mg/mL a les 48 hores del tractament. Font: pròpia

Igual que en l'altra línia de cèl·lules es pot comprovar com l'augment de temps d'exposició i al mateix temps, de concentració, fa variar notablement la viabilitat i mort cel·lular. En el cas del temps, de les hores d'exposició, com més temps, més mort cel·lular en el cas de les dues línies cel·lulars. Si s'analitza la concentració genèricament es pot veure una variació entre les mateixes cèl·lules i temps d'exposició a diferent concentració (0,2 o 0,3 mg/mL), tot i que ho fa més quantiosament la variació de les hores.

## **4.2. Anàlisi cel·lular**

Per tal de poder analitzar-ne les modificacions estructurals un cop les cèl·lules van ser exposades al tractament, vaig anar realitzant imatges mitjançant el microscopi òptic. L'objectiu era poder capturar totes les cèl·lules control i també les exposades a temps determinats i concentracions alternades de 0,2 i 0,3 mg/mL. Vaig tindre certes dificultats i sols vaig poder obtenir algunes imatges de cèl·lules.

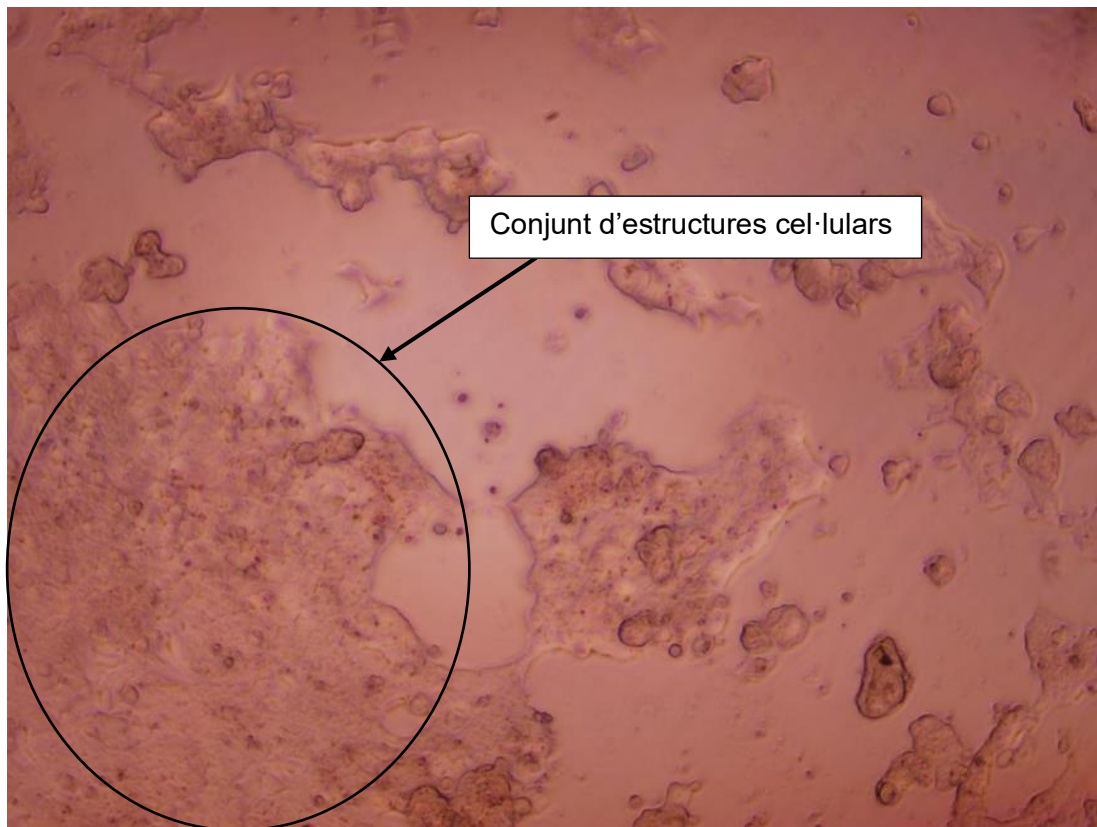


*Figura 59: Placa de petri amb cèl·lules preparades per ser analitzades en el microscopi òptic.*

*Font. Pròpia*

Inicialment, era necessari observar les cèl·lules sense cap classe de modificació per tal de poder-ne comparar posteriorment les estructures.

En el cas de la línia cel·lular HEK293, la imatge obtinguda va ser la següent:



*Figura 60: Estructura cel·lular de la línia HEK293 sense cap tipus de modificació ni exposició als productes, un cop passades 24 hores del cultiu. No hi ha restes cel·lulars o si hi són, són molt difícil de veure. Font. Pròpia*

Seguidament, un cop es van exposar aquestes mateixes cèl·lules a una concentració de 0,2 mg/mL i després d'haver esperat 24 hores a què el tractament, en concret del producte 156P, fes efecte sobre aquesta línia. Els resultats van ser els següents.





*Figura 61: Estructura cel·lular de la línia HEK293 un cop exposada al producte 156P a una concentració de 0,2mg/mL i un cop passades 24 hores. Les fletxes indiquen les restes de cèl·lules mortes provocades per l'administració del compost en estudi, aquestes, coincideixen amb la pèrdua de l'estructura cel·lular. Font. pròpia*

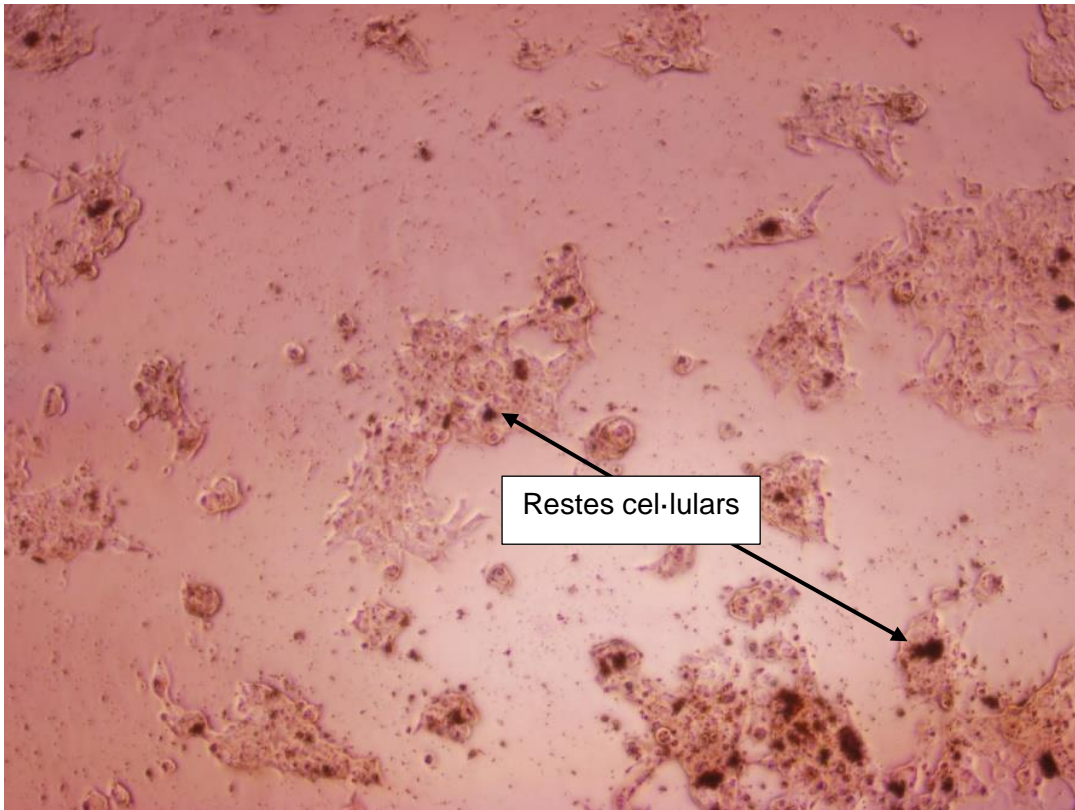
La imatge em va permetre observar i concloure que aquest compost provocava mort cel·lular, ja que s'observava la pèrdua de l'estructura cel·lular a les 24 hores d'administració.

Les fletxes indiquen els restos de cèl·lules mortes provocades per l'administració dels composts en estudi.

Si es compara amb les cèl·lules control es pot veure clarament la diferència estructural i de viabilitat, que ha disminuït per complet. La mesura de les cèl·lules un cop exposades al producte ha sigut molt menor i la quantitat també. Es pot veure clar que la qualitat de les cèl·lules no és la mateixa i que hi ha hagut un efecte negatiu sobre la viabilitat en aquesta línia.

A continuació vaig realitzar el mateix procés amb el producte 157P. Vaig exposar a les cèl·lules HEK293 a aquest producte a una mateixa concentració de 0,2 mg/mL i les vaig observar un cop passades 24 hores.

Els resultats van ser els següents.



*Figura 62: Estructura cel·lular de la línia HEK293 un cop exposada al producte 157P a una concentració de 0,2 mg/mL i un cop passades 24 hores. Les fletxes indiquen les restes de cèl·lules mortes provocades per l'administració del compost en estudi. Aquestes restes coincideixen amb la pèrdua de l'estructura cel·lular. Font. pròpia*

La fotografia que vaig poder realitzar a través del microscopi òptic em va permetre concloure que aquest producte que vam exposar a unes condicions concretes a aquestes cèl·lules, va provocar mort cel·lular i pèrdua de la seva estructura.

Les fletxes assenyalen els restos de cèl·lules mortes provocades per l'administració del compost en estudi. La imatge em permet veure clarament la seva variació d'estructura, qualitat i s'observa la disminució de viabilitat cel·lular posterior a l'exposició al producte.

Seguidament, vaig poder obtenir imatge també del producte 159P el qual vaig exposar a les cèl·lules HEK293 a una concentració de 0,2 mg/mL i que vaig observar al cap de 24 hores.

Els resultats van ser els següents.





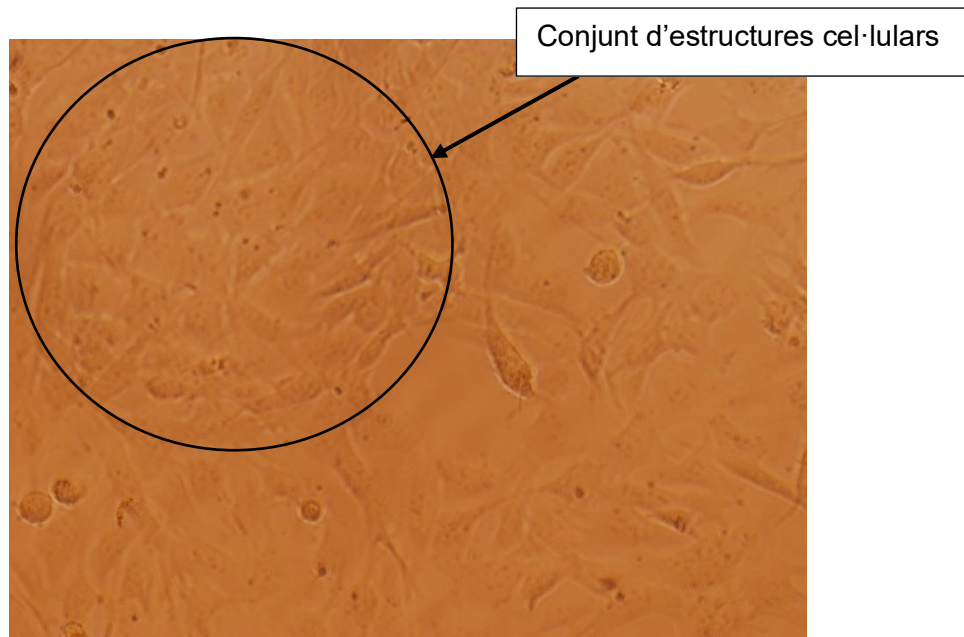
*Figura 63: Estructura cel·lular de la línia HEK293 un cop exposada al producte 159P a una concentració de 0,2 mg/mL i un cop passades 24 hores. Les fletxes indiquen les restes de cèl·lules mortes provocades per l'administració del compost en estudi, aquestes, coincideixen amb la pèrdua de l'estructura cel·lular. Font. pròpia*

Comparant aquesta imatge amb la de les cèl·lules control es pot veure molt clara la diferència d'estructura. En la imatge inicial es veu una quantitat de cèl·lules major i amb un creixement excessiu o més gran, en canvi, en aquesta fotografia es veu una viabilitat menor. Es veu molt clara la pèrdua d'estructura a les 24 hores d'administració.

Les fletxes indiquen els restos de cèl·lules mortes que ha provocat l'administració del producte 159P.

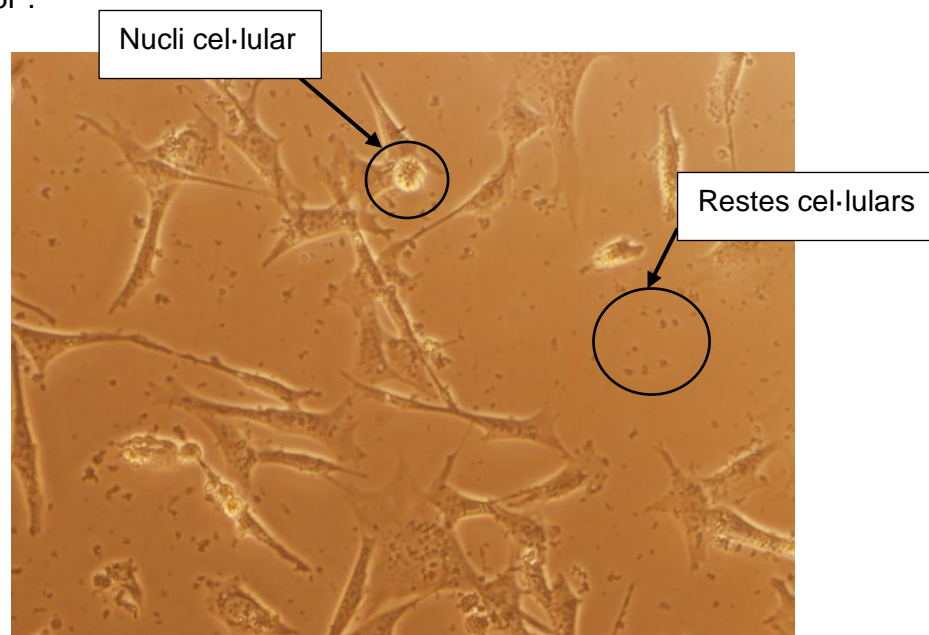
Un cop analitzades les estructures cel·lulars de la línia de cèl·lules HEK293, es pot fer també amb els fibroblasts de ratolins, als quals he fet una imatge del control un cop passades 24 hores i de les cèl·lules exposades al producte 155P a una concentració de 0,2 mg/mL un cop passades les 24 hores.

La il·lustració resultant dels fibroblasts de ratolins al cap de 24 hores de ser cultivades és la següent:



*Figura 64: Estructura cel·lular de la línia MEF sense cap tipus de modificació ni exposició als productes, un cop passades 24 hores del cultiu. No s'hi veuen restes cel·lulars, com a molt en pot haver alguna, encara que n'hi ha moltes més en les cèl·lules tractades. Font. Pròpia*

En la Figura 59 s'hi pot veure el creixement cel·lular dels fibroblasts, les cèl·lules control, i a continuació es pot veure la imatge obtinguda de les mateixes cèl·lules exposades al producte 155P.

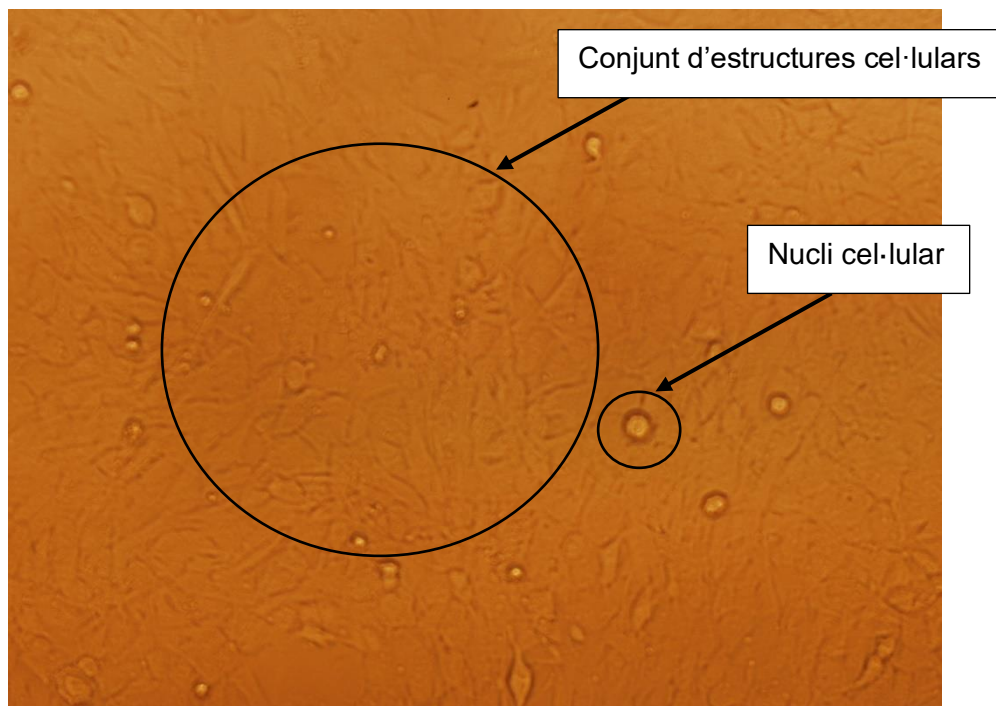


*Figura 65: Estructura cel·lular de la línia MEF un cop exposada al producte 155P a una concentració de 0,2 mg/mL i un cop passades 24 hores. Una fletxa indica el nucli de la cèl·lula i l'altra les restes cel·lulars que són tots els puntets negres o més foscos que es poden veure al voltant de les estructures cel·lulars. També es pot veure que els fibroblasts s'han tornat més allargats i que ja no estan junts com en les cèl·lules control. Font. pròpia*

Si es comparen aquestes estructures cel·lulars amb el control, es pot veure que la forma de la cèl·lula és la mateixa, o si varia no és ni presencial amb els nostres ulls.

Tot i això, sí que es pot veure que inicialment hi havia més quantitat de cèl·lules, que després ha disminuït, ja que el producte 155P ha provocat mort cel·lular.

Finalment, es pot observar el creixement cel·lular dels fibroblasts passades 48 hores del seu cultiu i sense cap mena d'exposició a les cèl·lules.



*Figura 66: Estructura cel·lular de la línia MEF sense cap tipus de modificació ni exposició als productes, un cop passades 48 hores del cultiu. No hi ha restes cel·lulars o si hi són, són molt difícil de veure. Font. pròpia*

Es veu clara la diferència, les cèl·lules quan han passat més hores han crescut molt més i es pot veure molta més quantitat que no a les 24 hores.

Igualment, l'estructura es veu completament igual i l'únic que varia és la viabilitat de cèl·lules que en aquest cas, serà major.

## **5. DISCUSSIÓ**

En aquest treball m'he donat a la tasca d'avaluar l'efecte citotòxic<sup>3</sup> d'uns productes d'origen natural en cèl·lules immortalitzades i d'origen tumoral. La majoria dels composts avaluats van provocar mort cel·lular in vitro en les línies cel·lulars emprades en aquest estudi. La capacitat dels composts de provocar mort cel·lular és una bona notícia que dona peu a seguir aquesta línia de recerca amb un futur prometedor. A més la recerca s'emmarca en un context on els productes d'origen natural tenen cada vegada més protagonisme. Els composts naturals amb activitat anticancerosa han guanyat un gran interès entre els investigadors i els metges. Nombrosos estudis in vitro i in vivo han reportat diversos composts naturals que mostren efectes anticancerosos prometedors (Guamán-Ortiz LM, et al. Curr Genomics. 2017).

La inducció de l'apoptosi és considerat el principal mecanisme dels composts d'origen natural en el tractament del càncer. (JieYU, 2020) No obstant això, cada vegada és major l'acumulació d'evidències que impliquen altres tipus de mort cel·lular, com la mort associada a autofàgia i la "necroptosis" una interrelació entre necrosi i apoptosi. (Luis Miguel Guamán-Ortiz 2017) Per citar alguns exemples s'ha estudiat que composts com la berberina, un alcaloide que es troba en les plantes de la família Berberis; la curcumina que és el principal component de la *Curcuma longa* L i el Epigallocatechin-3-\*gallate, el principal component bioactiu del te verd; tenen efectes sobre les proteïnes reguladors de l'autofàgia i l'apoptosi en cèl·lules tumorals provocant efectes anticancerosos en estudis in vitro.

Un pas a seguir en aquesta recerca podria ser la determinació de la mena de mort cel·lular associada a aquests productes específics. La detecció de proteïnes associades a l'apoptosi o l'autofàgia van poder donar-me pistes dels processos involucrats i seria un pas d'avanç en aquest llarg procés de la cerca de tractaments anticancerosos.

---

<sup>3</sup> Els citotòxics són agents o substàncies que danyen o maten les cèl·lules o els teixits. Per tant, quan parlem de quimioteràpia citotòxica fem referència a aquells fàrmacs o substàncies capaces de destruir cèl·lules canceroses.

## **6. CONCLUSIONS**

No és fàcil sintetitzar al màxim i conservar el valor pràctic de qualsevol exposició, i la dificultat creix quan es tracta de qüestions relacionades amb la salut.

Tot i això, amb aquest treball, gràcies a la col·laboració de l'investigador i de la tutora, he aconseguit conèixer en profunditat en què consisteix el càncer i la gran importància i relació que hi mantenen els productes naturals amb ell.

He analitzat el càncer, diferents tipus que n'existeixen i la seva implicació en el cicle cel·lular, diferències entre les cèl·lules canceroses i normals i els tipus de mort cel·lular que existeixen.

He conegut de primera mà com mantenir cèl·lules, determinar les seves viabilitats cel·lulars i he tingut l'oportunitat de realitzar-ho.

Aquesta investigació m'ha aportat molts aspectes nous sobre la percepció que tenia de la medicina actual i sobre el fet de treballar en la precisió i l'ambient d'un laboratori.

Basant-me en tot el treball fet, puc concloure el següent sobre les meves hipòtesis inicials:

### *1. Avaluació de la viabilitat cel·lular en cèl·lules HEK293.*

Començant per la primera hipòtesi, al llarg de la meva investigació, he pogut desenvolupar diversos processos i metodologies per determinar-ne la viabilitat cel·lular d'aquesta línia de cèl·lules. A més a més, finalment, n'he pogut extreure uns gràfics amb dades i números exactes que m'han permès observar-ho amb més claredat i especificació.

Per tant, puc afirmar que tots els productes avaluats a excepció del 160P provoquen mort cel·lular en HEK293 a la dosi assajada tant a 24 hores com a 48 hores.

### *2. Avaluació de la viabilitat cel·lular en fibroblasts de ratolins immortalitzats.*

Passant a la següent hipòtesi, de la mateixa manera que en la primera, he pogut desenvolupar processos i metodologies que m'han permès determinar-ne la viabilitat en fibroblasts de ratolins immortalitzats. D'aquesta manera, he pogut concloure i generar uns gràfics que m'han representat dades i números exactes per tal de poder observar amb més especificitat els resultats obtinguts.

Per tant, puc afirmar que tots els productes avaluats a excepció del 160P provoquen mort cel·lular en MEFs a la dosi assajada tant a 24 hores com a 48 hores.

*3. Observació de les modificacions estructurals de les cèl·lules exposades al tractament.*

Passant a la tercera hipòtesi, durant la investigació he pogut anar fent ús del microscopi òptic per tal d'analitzar-ne les estructures cel·lulars. D'aquesta manera, he pogut comparar, realitzant fotos, les diverses estructures.

Així doncs, he pogut concloure que l'observació al microscopi reafirma les conclusions anteriors al denotar-se la pèrdua de l'estructura cel·lular de les cèl·lules exposades als productes d'estudi.

*4. Elaboració de gràfics que relacionen la mort cel·lular amb les dosis empleades i els temps d'exposició.*

Per finalitzar, en l'última hipòtesi que considero la principal, els resultats de la investigació realitzada m'han proporcionat dades de la viabilitat en cada línia de cèl·lules exposada a les dosis empleades i els temps d'exposició.

Per tant, he pogut demostrar de primera mà tots els resultats obtinguts.

Basant-me en tot el treball fet, puc concloure, també, el següent sobre els meus objectius inicials:

*1. Demostrar que l'esquema del mètode científic concorda racionalment amb l'estructura i composició d'una investigació en un laboratori.*

Començant pel primer objectiu, al llarg de la meva investigació, he pogut emprar el mètode científic, que consisteix en un conjunt de tècniques utilitzades per investigar la falsedat o la certesa d'hipòtesis. M'ha quedat molt clara la seva estructura i, per tant, he pogut seguir perfectament el seu esquema.

Puc afirmar doncs, que aquest mètode concorda racionalment en l'estructura de la meva investigació realitzada en el laboratori.

*2. Adaptació de les idees als fets mitjançant l'observació i l'experimentació.*

Passant al segon objectiu, he pogut aplicar totes les idees i coneixements que tenia a l'hora d'observar i experimentar, a l'hora de realitzar les pràctiques. Tota la informació prèvia l'he pogut adaptar als fets, ja que analitzar i observar m'ha permès aplicar la informació, que tenia, a l'experiment.

Per tant, puc afirmar que he utilitzat l'aplicació de les idees als fets de manera que m'ha sigut més senzilla l'experimentació.

*3. Poder ampliar coneixements per la realització d'experiments.*

Passant al tercer objectiu, durant la investigació he pogut anar ampliant els meus coneixements, he pogut afegir-ne de nous als que ja tenia, de manera que he pogut comprendre millor la realització dels experiments. D'aquesta manera, m'ha sigut més fàcil la comprensió general i de processos concrets.

Així doncs, puc concloure i afirmar l'ampliació de contingut i coneixement durant la investigació i més concretament durant la realització experimental.

*4. Saber expressar, registrar i documentar correctament dades i resultats.*

En el quart objectiu, he pogut obtenir taules de dades i resultats de la meua investigació i experimentació. M'ha fet falta expressar-los, registrar-los i documentar-los, per tant, puc afirmar que he assolit aquest objectiu. Els resultats han sigut correctament analitzats i expressats, sense cap tipus de problemes o complicacions.

*5. Analitzar dades estadísticament i valorar la fiabilitat de resultats obtinguts.*

Per finalitzar, en l'últim objectiu que considero també dels més importants o principal, l'anàlisi de les dades. Al final del treball han calgut analitzar tots els resultats i valorar-los. Tot i que hagi pogut ser més difícil de l'esperat, puc afirmar que he assolit l'objectiu correctament, n'he pogut analitzar estadístiques perfectament i he pogut valorar la fiabilitat dels resultats.

Per concloure el treball, he assolit tots els objectius que vaig plantejar a l'inici de la investigació. He entès tota la metodologia a realitzar per tal de mantenir les cèl·lules i a la fi determinar-ne la viabilitat.

A més, he assolit els coneixements pertinents sobre la malaltia que he investigat i he trobat la relació que existeix entre la malaltia i els productes naturals investigats.

Al marge de les hipòtesis i dels objectius, he arribat a la conclusió que el món de la investigació és molt complex i específic, és molt sorprenent la quantitat de procediments que s'han de realitzar per tal d'arribar a resultats concrets.

Tot i que encara no tinc el nivell ni els coneixements adequats per realitzar certes investigacions que podrien aportar més informació a les conclusions anteriors, se'n podrien recomanar exemples com els següents:

- Avaluar els productes en cèl·lules no tumorals per descartar la toxicitat en cèl·lules sanes.
- Estudiar els mecanismes de mort cel·lular els quals ens donarien pistes sobre les vies moleculars involucrades en aquest procés.
- Avaluar els productes en un model murí de càncer.

Per concloure el treball, cal remarcar que aquests tipus d'investigacions no són senzilles i sempre poden sorgir complicacions i equivocacions en elles. Sobretot en estudiants com jo, gent sense experiència en laboratoris o zones més especialitzades i això pot portar a desviar l'objectiu inicial. Tot i això, la meva experiència ha estat molt positiva i tot i certs imprevists, hem pogut arribar a les conclusions esperades.



## **7. FONTS DOCUMENTALS**

American Society of Clinical Oncology [2018, Maig] Conocimiento para triunfar sobre el càncer. <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-cancer/conceptos-basicos-sobre-el-cancer>

Data de búsqueda: 10/08/2021

American Society of Clinical Oncology [2018, Maig] Conocimiento para triunfar sobre el càncer. <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/prevenci%C3%B3n-y-vida-saludable/alimentaci%C3%B3n-y-el-riesgo-de-c%C3%A1ncer>

Data de búsqueda: 01/12/2021

Asociación española contra el càncer [2014] Todo sobre el càncer <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/origen>

Data de búsqueda: 20/09/2021

Biolatto L., Mejor con Salud [2021, Gener] Tumor maligno y benigno, ¿cuáles son las diferencias? <https://mejorconsalud.as.com/tumor-maligno-y-benigno-cuales-son-las-diferencias/>

Data de búsqueda: 02/12/2021

Clínic Barcelona, Hospital Universitari [2018, Novembre] Càncer <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cancer/impacto-del-cancer>

Data de búsqueda: 12/08/2021

Clínic Barcelona, Hospital Universitari [2018, Novembre] Càncer <https://www.clinicbarcelona.org/ca/asistencia/malalties/cancer/tipus-de-cancer>

Data de búsqueda: 9/12/2021

D. Quintela Senraa, J.J.B. López Sáezb, A. Senra Varelac. La proteína p53 y el càncer de mama. Revisión crítica [https://www.sespm.es/wp-content/uploads/revista/2001\\_14\\_2/5.pdf](https://www.sespm.es/wp-content/uploads/revista/2001_14_2/5.pdf)

Data de búsqueda: 10/12/2021

Daniel A Dias , Sylvia Urban, Ute Roessner. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* 2012 Apr 16;2(2):303-36.

DEVİRİM GÖZÜAÇIK, KUTTAM <https://kuttam.ku.edu.tr/en/team-members/devrim-gozuacik/>

Data de búsqueda: 02/12/2021

El Blog de Genotipia [2021] El ciclo celular <https://genotipia.com/el-ciclo-celular/>

Data de búsqueda: 15/12/2021

Elena G. A., Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Rosario [ Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis

[https://www.anestesia.org.ar/search/articulos\\_completos/1/1/284/c.php](https://www.anestesia.org.ar/search/articulos_completos/1/1/284/c.php) Data de  
búsqueda: 02/12/2021

Emory, Winship càncer institute [2017] Productos Naturales Pueden Frenar al Cáncer  
<https://www.cancerquest.org/es/sala-de-prensa/2017/07/productos-naturales-pueden-frenar-al-cancer> Data de búsqueda: 10/11/2021

Fernanda Majoloa, Luciana Knabben de Oliveira Becker Delwinga, Diorge Jonatas Marmitta, Ivan Cunha Bustamante- Filhoc, Marcia Ines Goetterta. Phytochemistry Letters. Volume 31, June 2019, Pages 196-207.

Institución Universitaria, Escuela Colombiana de Rehabilitación, Fisiopatología básica (necrosis y apoptosis)  
<https://repositorio.ecr.edu.co/reda/OVAS/rehabilitacion/fisiopatologia/necrosis.html>  
Data de búsqueda: 29/11/2021

Instituto Nacional de Salud Pública, México [1997] Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: perspectivas terapéuticas  
<https://www.scielosp.org/article/spm/1997.v39n5/451-462/> Data de búsqueda: 10/11/2021

Instituto Nacional del Cáncer [2021, Maig] ¿Qué es el cáncer?  
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es> Data de búsqueda: 12/08/2021

Instituto Nacional del Cáncer [2021, Maig] Diccionario de cáncer  
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/mtor>  
Data de búsqueda: 08/12/2021

Instituto Nacional del Cáncer [2021, Maig] Inhibidores de la angiogénesis  
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-inhibidores-angiogenesis> Data de búsqueda: 06:12/2021

JCRR y col. [2012] Bacterias lácticas: Importancia en alimentós y sus efectos en la salud  
<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf> Data de búsqueda: 15/11/2021

Jin Yan Lim and Hiu Yee Kwan [2018] Roles of Lipids in Cancer  
<https://www.intechopen.com/chapters/64118> Data de búsqueda: 10/12/2021

Karel H.M. van Wely [2011] El cáncer y los cromosomas. Madrid: Editorial la catarata

Karel H.M. van Wely [2014] Las células madre. Madrid: Editorial la catarata

Khan Academy, [2008] El cáncer y el ciclo celular  
<https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/regulation-of-cell-cycle/a/cancer> Data de búsqueda: 10/11/2021

Klaassen R., Apuntes Necrosis  
<http://www2.udec.cl/~webpatologia/Apuntes%20Necrosis.pdf> Data de búsqueda: 5/12/2021

MARQUÉS, Marta. [2021] Máster en Investigación Biomédica. Lleida

Megías M., Molist P., Pombal MA. [2019] Atlas de histología vegetal y animal. La célula.  
<https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/8-ciclo.php> Data de búsqueda: 18/11/2021

National Human Genome Research Institute, Ciclo celular  
<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Ciclo-celular> Data de búsqueda: 15/12/2021

National Library of Medicine [2003] Necrosis: a specific form of programmed cell death  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12565815/> Data de búsqueda: 08/12/2021

National Library of Medicine [2010] Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20034776/> Data de búsqueda: 02/12/2021

National Library of Medicine [2012] Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on càncer  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23229678/> Data de búsqueda: 08/12/2021

National Library of Medicine [2013] Curcumin induces cross-regulation between autophagy and apoptosis in uterine leiomyosarcoma cells  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23532091/> Data de búsqueda: 09/12/2021

National Library of Medicine [2014] Berberine, an epiphany against càncer  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25153862/> Data de búsqueda: 09/12/2021

National Library of Medicine [2020] Communication Needs of Cancer Patients and/or Caregivers: A Critical Literature Review  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32454826/>  
Data de búsqueda: 04/12/2021

Nora M Barboza, Daniel J Medina, Tulin Budak-Alpdogan, Miguel Aracil, José M Jimeno, Joseph R Bertino, Debabrata Banerjee. Plitidepsin (Aplidin) is a potent inhibitor of diffuse large cell and Burkitt lymphoma and is synergistic with rituximab. Cancer Biol Ther. 2012 Jan 15; 13(2): 114–122. Published online 2012 Jan 15. Data de búsqueda: 28/11/2021

Pan, L., Chai, H.B., Kinghorn, A.D., 2012. Discovery of new anticancer agents from higher plants. *Front. Biosci. (Schol Ed.)* 4, 142–156. Data de búsqueda: 28/11/2021

Panda, P.K.; Mukhopadhyay, S.; Das, D.N.; Sinha, N.; Naik, P.P.;Bhutia, S.K. Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2015, 39, 43-55. Data de búsqueda: 28/11/2021

Pichardo G., WebMD [2020, Gener] Understanding Cancer – the Basics <https://www.webmd.com/cancer/guide/understanding-cancer-basics> Data de búsqueda: 9/12/2021

Pucci B., Kasten M., Giordano A., The National Center for Biotechnology Information [2019, Agost] Cell Cycle and Apoptosis <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1550296/> Data de búsqueda: 10/11/2021

Rojo, M.I. [1999] *Biología molecular del cáncer*. Madrid: Editorial síntesis

Scielo [2010] La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-07932010000200008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000200008) Data de búsqueda: 02/12/2021

Shamloo B., Usluer S., The National Center for Biotechnology Information [2019, Agost] p21 in Cancer Research <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721478/> Data de búsqueda: 28/11/2021

Sherr C. J., *Cancer Cell* [2002] The RB and p53 pathways in cancer [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(02\)00102-2](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(02)00102-2) Data de búsqueda: 28/11/2021

Sociedad Española de Oncología Médica [2020, Maig] Angiogénesis <https://seom.org/43-Socios%20-%20Formaci%C3%B3n%20y%20Recursos/Bases%20de%20la%20Oncolog%C3%ADa/157-angiogenesis?showall=1&showall=1> Data de búsqueda: 06/12/2021

Sociedad Española de Oncología Médica [2020, Maig] Las cifras del cáncer en España [https://seom.org/images/Cifras\\_del\\_cancer\\_en\\_Espnaha\\_2021.pdf](https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espnaha_2021.pdf) Data de búsqueda: 14/11/2021

The Zebrafish Information Network (ZFIN) [2016] Differences in Strength and Timing of the mtDNA Bottleneck between Zebrafish Germline and Non-germline Cells <https://zfin.org/ZDB-PUB-160706-14> Data de búsqueda: 02/12/2021

Universidad Técnica Particular de Loja [2017] Natural compounds as modulators of non-apoptotic cell death in cancer cells  
[https://scholar.google.es/citations?view\\_op=view\\_citation&hl=es&user=au0zI2oAAAAJ&citation\\_for\\_view=au0zI2oAAAAJ:d1gkVwhDpl0C](https://scholar.google.es/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=au0zI2oAAAAJ&citation_for_view=au0zI2oAAAAJ:d1gkVwhDpl0C) Data de búsqueda: 02/12/2021

Universidad Técnica Particular de Loja | UTPL · Departamento de Ciencias de Salud PhD [2017] Natural Compounds As Modulators of Non-apoptotic Cell Death in Cancer Cells  
[https://www.researchgate.net/publication/314254766\\_Natural\\_Compounds\\_As\\_Modulators\\_of\\_Non-apoptotic\\_Cell\\_Death\\_in\\_Cancer\\_Cells](https://www.researchgate.net/publication/314254766_Natural_Compounds_As_Modulators_of_Non-apoptotic_Cell_Death_in_Cancer_Cells) Data de búsqueda: 02/12/2021

Universitat Oberta de Catalunya (UOC) [2020, Febrer] Salud con Ciencia, Blog de los Estudios de Ciencias de la Salud de la UOC  
<https://blogs.uoc.edu/cienciasdelasalud/cancer-nutricion-prevencion-enfermedad/> Data de búsqueda: 10/11/2021

## **8. ANNEXOS**

### **ANNEX I**

Diari de laboratori:

1r dia de pràctiques (7/07/2021)

#### **Com utilitzar la campana del laboratori?**

Primer de tot cal encendre un sistema al buit i netejar amb lleixiu i alcohol una mena de tub que s'utilitza per a xuclar mescles o líquids innecessaris en alguna part de les pràctiques. A continuació, cal desinfectar tots els productes que utilitzarem amb alcohol i un cop fet això, ja es poden posar dins la campana. Quan estan tots a l'interior s'engeguen uns rajos ultraviolats uns 10/15 minuts. Després d'aquesta estona es tanquen, es canvia la llum ultraviolada per la llum blanca, necessària per a veure-hi durant el treball dins la campana.

Durant la realització de les pràctiques cal vigilar molt com moure i controlar l'entrada i sortida dels productes a la campana. Si se'n vol treure algun, cal mirar que estigui ben tancat per tal de no contaminar-se'n l'interior un cop està a fora. Per entrar els materials, com ja he dit, cal desinfectar-los bé abans. I per moure'ls per dins la campana cal estar al cas, ja que hem d'evitar que materials com les pipetes (micropipetes) entrin amb contacte amb altres superfícies o materials i també que la nostra bata o algun agent extern passi per sobre de les substàncies amb les quals treballem.

Un cop finalitzada la pràctica cal tornar a realitzar el mateix procés inicial. Primer de tot treure tots els materials fora de la campana vigilant que estiguin tots tancats. En segon lloc, desinfectar-ho tot amb alcohol i finalment engegar un altre cop els rajos ultraviolats uns 20 minuts.

#### **MATERIAL UTILITZAT EL PRIMER DIA:**

- Pipeta Pasteur
- Micropipeta
- Microscopi òptic
- Eppendorf (1,5 / 2 mL)
- Bany
- Reactiu presto blues
- Medi de cultiu (DMEM)
- Gradeta de tubs

### **Què he fet avui?**

Inicialment, tenim unes cèl·lules del ronyó, més exactament cèl·lules HEK293, i mitjançant un producte enviat, es vol veure si aquestes es moren o no. Per fer-ho esperem 24 i 48 hores per a veure si hi ha alguna diferència en la seva viabilitat si variem els temps d'exposició. Un cop han passades 24 hores les traiem de la incubadora i ho posem a la campana per a poder treballar-hi. Xucllem el medi de cultiu juntament amb les cèl·lules que teníem i hi posem el reactiu PrestoBlues amb petites quantitats. Si al cap d'uns 40 minuts aprox. veiem un canvi de color, és que aquest producte mata a les cèl·lules. Per analitzar més precisament aquests resultats no ho fem simplement mirant sinó que posem les mostres dins d'una màquina de fluorescència que el que fa, mitjançant un programa, és fer-nos gràfics i una taula de valors en els quals es poden veure exactament els valors numèrics.

Per una altra banda, van injectar els productes que els hi havia enviat l'empresa, a uns ratolins i al cap d'un temps els hi van treure sang. Aquesta, ha arribat a les nostres mans i mitjançant una centrifugadora hem fet que el sèrum es diferenciï, l'hem agafat amb unes quantitats molt exactes i mitjançant uns càlculs n'hem fet la barreja juntament amb un medi de cultiu que aquest cop no tenia sèrum.

### Preguntes que em van sorgir i resposta:

- *Què és el que posem a incubar, només les cèl·lules o les cèl·lules amb els productes? I per què és necessari aquest pas?*

Les cèl·lules un cop cultivades les posem a incubar, ho fem perquè estan en un medi amb unes condicions exactes per a poder créixer, aquestes són 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. Les cèl·lules són canceroses les dues línies i en aquest cas, quan les fiquem a incubar ja els hem introduït el producte

- *Als ratolins als quals se'ls injecta el producte, són tots sans? I amb quina intenció se'ls hi injecta?*

El producte se'ls hi injecta tant a ratolins sans com a no sans, les mostres de sang en les que hem treballat nosaltres, de moment, és sang de ratolins sans. L'objectiu d'això és poder veure si, després d'haver realitzat tot el metabolisme, les cèl·lules d'aquests ratolins moren o no.

2n dia de pràctiques (12/07/2021)

**Què he fet avui?**

Inicialment, hem agafat el p-30 (una càpsula on tenim unes cèl·lules en un medi de cultiu, les quals anem passant d'una càpsula a una altra perquè vagin creixent) i l'hem observat al microscopi òptic. En aquest, hem pogut veure una mena de diferenciació de capes la qual vol dir que les cèl·lules que estan flotant a l'aire s'han mort, i les que segueixen a la superfície estan creixent. Un cop feta aquesta observació hem realitzat el pas. Primer de tot hem tret el medi de cultiu i hem netejat la càpsula amb PBS dos cops, una vegada fet això hem ficat 2 mL de medi de cultiu a cada càpsula (en tenim 2 per a poder comparar i anar veient els resultats). Un cop fet el pas, es fica a la incubadora perquè les cèl·lules puguin créixer, si el medi de cultiu canvia de color a groc és que és un medi àcid.

A més a més, hem tornat a cultivar cèl·lules, per a fer-ho hem agafat una càpsula on tenim cèl·lules les quals anem passant per a fer-les créixer i l'hem netejat 2 cops amb PBS. Un cop fet això, hem tret el líquid i hi hem ficat 2 mL de tripsina per desenganxar les cèl·lules que estaven al fons de la càpsula. A continuació, a la tripsina li afegim 8 mL de medi de cultiu de manera que ja tenim un total de 10 mL a la càpsula. Després d'haver fet això n'agafem 4 mL d'aquesta barreja anterior i els fem a un tub de 45 mL, és a dir, n'afegim 41 mL de medi de cultiu (ja que hem d'omplir una placa de 48). Omplirem cada forat de la placa amb un 50% de confluència.

El medi de cultiu que utilitzem conté sals, glucosa i piruvat.

Breu recerca sobre tipus de mort cel·lular i sobre línia de cèl·lules HEK293:

**APOPTOSI:** és un tipus de mort cel·lular en la qual la cèl·lula és la que decideix morir. Ho fa perquè si no passarà a la descendència el problema que hi tingui. Es diu que és una mort neta.

**NECROSIS:** la cèl·lula no decideix morir, si ho fa és perquè ha passat alguna cosa. Es diu que és una mort bruta.

**Cèl·lules HEK293:** línia cel·lular de cèl·lules de ronyó d'embrió humà. Són molt senzilles de cultivar i es transfecten fàcilment.



3r dia de pràctiques (13/07/2021)

### **Què he fet avui?**

Avui hem rebut uns productes que ens ha enviat un senyor per a realitzar la prova. Primerament, el que hem fet és agafar-ne una mostra, posar-la als eppendorf i pesar-la. Després hem fet els càlculs adients per a veure el volum de FBS (sèrum fetal boví) que era necessari per a una concentració de 50 mg/ml (especificada pel senyor). Hem ficat el volum correcte i hem ficat els eppendorf, cadascun amb el seu producte, a la "thermomixer comfort" perquè es dissolguessin del tot. Hi ha hagut 3 o 4 productes que no s'han dissolt del tot, el què hem fet ha sigut utilitzar una altra màquina, el sonador, amb la qual hem pogut fer-ho.

Un cop fet això, hem fet calculat quin seria el volum necessari per a calcular la concentració a 0,2 mg/ml i a 0,3 mg/ml. Per fer-ho hem realitzat els càlculs següents:

Concentració 1 x Volum 1 = Concentració 2 x Volum 2

50 mg/mL x Volum 1 = 0,2 mg/mL x 2000 microlitres (concentració a 0,2 mg/mL dona 8 microlitres)

50 mg/mL x Volum 1 = 0,3 mg/mL x 2000 microlitres (concentració a 0,3 mg/mL dona 12 microlitres)

Abans de tirar la quantitat necessària als eppendorf, els hem omplert de 2000 microlitres de medi de cultiu i després seguint un ordre hem anat posant les quantitats als llocs corresponents. Quan hem tingut això fet, hem ficat tots els eppendorf a la màquina "thermomixer comfort" per tal que es barreguessin del tot.

A l'acabar de fer això hem mirat com estaven les cèl·lules que el dia anterior havíem passat d'una càpsula a una altra i ens hem trobat que no pintaven gaire bé. Tenien una forma molt rodona la qual no hauria de ser així, o si més no, a totes les cèl·lules. A més a més, estaven la majoria mortes encara que les passessin a un altre medi de cultiu cada cop era pitjor, així que va ser necessari repetir el procés.

### Breu recerca sobre l'efecte Warburg:

L'EFECTE WARBURG: Les cèl·lules canceroses no respiren sinó que obtenen la seva energia per mitjà de la fermentació (glucòlisis), encara amb presència d'altra pressió d'oxigen. Les cèl·lules, encara quan els medis tenien suficient pressió parcial d'oxigen, elegeixen no respirar, elegeixen fermentar. Una teoria és que pot ser que la cèl·lula cancerosa estigui utilitzant l'efecte Warburg no sols per generar energia, sinó també per generar el substrat que necessita per créixer.

4rt dia de pràctiques (14/07/2021)

**Què he fet avui?**

Avui primer de tot el que hem fet ha sigut agafat les cèl·lules que havíem cultivat (les de 24 hores) i hi hem ficat el reactiu Prestoblues per veure si les cèl·lules estaven mortes o no. Això es sap perquè aquest reactiu és capaç d'entrar a la cèl·lula i reduir-se, per tant, si les cèl·lules estan vives, canviarà de color cap a un lila o roig, en canvi, si estan mortes es quedarà de color blau. Per a realitzar aquest procés, primer hem tret el medi de cultiu que hi havia i hem ficat el reactiu, després uns 40 minuts a la incubadora. Quan aquest temps ha passat ho hem tret i hem ficat la placa a la màquina per a llegir la fluorescència, l'ordinador ha generat una taula de dades on hem pogut veure que els resultats no han variat gaire.

A cada placa sempre hi ha 2 espais els quals anomenem controls als quals sols hi ha medi de cultiu, això ho fem per a després poder comparar amb la resta. Per això quan hem ficat el reactiu també ho hem fet als controls així després a l'hora de llegir la fluorescència hem pogut comparar-ho millor.

Al mateix temps, hem tornat a rebre sang de 3 ratolins als quals 2 d'aquests se'ls hi va donar el producte per via oral. El ratolí al qual no se li va donar és el que li direm control, que ens servirà per poder comparar els resultats. Un cop aquests 2 ratolins van metabolitzar el producte, se'ls hi va treure sang i aquesta ha arribat a les nostres mans. L'hem centrifugada per separar-ne el sèrum i aquest, l'hem tret i l'hem ficat als eppendorf. Després d'haver fet això, hem agafat uns 240 microlitres de cada sèrum i els hem portat a descomplementar a una temperatura de 60°C uns 30 minuts. Un cop fet, hem agafat eppendorfs i hi hem posat 240 microlitres de sèrum i 560 microlitres de medi de cultiu sense sèrum, ja que ja ho és el que hem tret dels ratolins. A continuació hem agafat una placa de 48 forats i hem dipositat cada substància a un lloc determinat, aquesta es distribueix en A, B, C, D, E i F vertical i 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 horitzontal. Les dues primeres columnes les hem omplert de 2 controls de cèl·lules 24 hores, 2 controls del sèrum de ratolí el qual no havia metabolitzat el producte, 2 espais de la mescla de medi i sèrum del ratolí 1 a les 24 hores i 2 espais amb mescla de medi i sèrum del ratolí 2 a les 24 hores. La tercera i quarta columna ha sigut tot el mateix però a les 48 hores. En canvi la cinquena i la sisena ha sigut igual que les dos primeres però amb els sèrums descomplementats. I les dues últimes columnes igual que la tercera i la quarta però amb els sèrums descomplementats.

Un cop fet això hem tornat a realitzar el procés que vam fer amb els productes que ens van enviar, ja que ens ha semblat que les cèl·lules no estaven bé com havien d'estar.

La seva forma no era la correcta i ens trobàvem que n'hi havia moltes de mortes. Per tant, hem agafat una placa de 24 hores i hem dipositat la barreja de medi i producte als llocs determinats com ja vam fer l'altre dia. Ho hem deixat a incubar i demà ho observarem al microscopi.

5è dia de pràctiques (15/07/2021)

### **Què he fet avui?**

Avui hem fet el pas de les cèl·lules a dues càpsules a les quals els hi hem ficat menor quantitat, ja que com que el cap de setmana no treballem, hem d'assegurar-nos que no es moren. Si creixen molt fins no caber-hi, les cèl·lules moriran.

Un cop fet això, hem agafat la placa de 24 hores que vam cultivar ahir amb els productes que ens van enviar i li hem ficat 250 microlitres de reactiu PrestoBlues. Hem fet el mateix amb la placa de 48 hores també cultivada amb els productes que ens van enviar. Després hem agafat la placa que vam cultivar ahir amb el sèrum de ratolí i hi hem ficat també el reactiu PrestoBlues. A continuació hem agafat les 3 plaques i una a una les hem ficat a la màquina que ens llegeix la fluorescència. Hem vist que els resultats de les plaques 24 i 48 hores dels productes que ens van enviar no eren del tot bons, ja que les cèl·lules haurien d'haver crescut el doble i estaven igual que ahir. En veure que fa dies que veiem que això no va bé les hem tirat i repetirem el procés.

L'investigador m'ha comentat que demà únicament el que farà serà observar la placa on hi ha el sèrum dels ratolins i ficar reactiu als pouets de 48 hores. Els deixarà uns 30 minuts a incubar i després analitzarà la seva fluorescència a la màquina. No em fa falta anar-hi, ja que el procés és ràpid i senzill, dilluns observarem les cèl·lules si han crescut i tornarem a cultivar cèl·lules amb els productes enviats.

M'ha demanat que intenti fer un gràfic de barres amb les dades que m'ha enviat de la fluorescència d'acord amb els productes, si veig que no em surt, ho farem conjuntament.

6è dia de pràctiques (20/07/2021)

### **Què he fet avui?**

Ahir l'investigador va fer el cultiu de les cèl·lules HEK293 per repetir el procés que ja vam fer amb els productes i que no va resultar com esperàvem. També va fer un altre pas de les cèl·lules.

Primer de tot el que hem fet ha sigut observar amb el microscopi òptic les cèl·lules, tant les HEK293 com les dels ratolins. Hem vist que tenen formes completament diferents.

Hem rebut un altre cop uns productes, diferents dels altres, i hem tornat a fer tot el mateix procés. N'hem agafat una mostra, l'hem pesat i hem fet el càlcul necessari per saber quant FBS havíem de ficar perquè la concentració fos de 50 mg/mL, demanada pel senyor.

L'objectiu en aquest cas serà veure si aquests productes maten o no a les cèl·lules tumorals i no tumorals. Estan fetes per a matar les tumorals.

Un cop hem tingut la quantitat de FBS i el producte junts, ho fem a l'agitador perquè es barregi tot. Mentrestant agafem ependorfs i els omplim amb 2 mL de medi de cultiu. El que farem serà fer uns càlculs per a calcular quina quantitat de producte (ja barrejat amb FBS) és necessari perquè la concentració sigui de 0,2 i 0,3 mg/mL. Un cop fet hem vist que perquè sigui 0,2 cal ficar 8 microlitres al medi de cultiu i perquè sigui 0,3 fan falta 12 microlitres. Per tant, li hem ficat el producte amb les quantitats necessàries al medi. Després ho hem ficat tot a l'agitador perquè es barregessin.

A continuació, hem agafat les dues plaques que ahir va cultivar l'investigador amb les cèl·lules HEK293 i els hi hem ficat 200 microlitres de cadascuna d'aquesta barreja que hem fet anteriorment. Sempre hi ha dos controls o més on sols hi ha les cèl·lules sense cap mena de modificació per a poder fer després la comparació. En aquest cas hem ficat 8 microlitres de sèrum a dos controls i 12 microlitres també de sèrum a dos altres, això ho hem fet perquè s'assemblin més a les altres cèl·lules de la placa.

Un cop fet això, hem fet exactament el mateix amb les cèl·lules dels ratolins, i ho hem deixat tot a incubar, demà observarem les cèl·lules.

7è dia de pràctiques (21/07/2021)

### **Què he fet avui?**

Avui el què hem fet primerament ha sigut agafar les plaques de 24 hores de les cèl·lules HEK293 i les dels ratolins a les quals els hi havíem ficat el producte i les hem observat al microscopi òptic. Hem vist que el resultat era l'esperat, la majoria de cèl·lules han mort.

A continuació hem agafat aquestes mateixes plaques i les hem netejat amb PBS. Per a fer-ho n'hem ficat 0,5 mL a cada pouet i un cop fet, ho hem tret. Després hem agafat el reactiu PrestoBlues i n'hem ficat 250 microlitres a cada pouet, ho hem deixat 40 minuts a incubar.

Fa 1 o 2 dies també vam ficar cèl·lules de ratolí a una càpsula de petri i n'anem fent el pas perquè aquestes creixin.

Avui també hem rebut sang de ratolins sans als quals se'ls hi havia donat el producte per via oral. Teníem una mostra de la sang de ratolí control, és a dir, al qual no se li ha donat cap mena de producte i després, 4 ratolins als quals sí. Un cop hem tingut aquesta sang, l'hem posat a centrifugar uns 10 minuts i després d'aquest temps hem pogut veure-hi la clara diferenciació del sèrum. L'hem extret i n'hem agafat 160 microlitres de cadascun d'aquests i l'hem portat a descomplementar (30 minuts submergits en aigua a 60°C).

Seguidament, hem agafat 120 microlitres de sèrum descomplementat de cada ratolí i els hem ficat cadascun a un eppendorf diferent, igual que ho hem fet amb 120 microlitres de sèrum no descomplementat de cada ratolí. Un cop fet això, a aquests eppendorf hi hem afegit 540 x 2 microlitres de medi sense sèrum.

Després d'haver fet això hem agafat una placa on sols hi havia cèl·lules HEK293 i el que hem fet és repartir-ho de la següent manera:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A		∅ cel.		∅ raton-D		1		2-D
B		∅ raton		1-D		2		3-D
C		1		2-D		3		<u>4-D</u>
D		2		3-D		4		
E		3		<u>4-D</u>		∅ raton-D		
F		4		∅ raton		1-D		

Figura 67: Repartició del tipus d'exposició de productes a les cèl·lules en una placa de 48 pouets. Font. pròpia

Ens hauria agradat poder haver fet el mateix, però amb les cèl·lules dels ratolins, però no vam pensar a cultivar-les i ja no tenim temps, ja que hauríem de treballar el dissabte i no ho fem. Però hem trobat una solució, i és que a la placa de 48 hores de les cèl·lules de ratolins a les quals els hi havíem ficat el producte, hi sobraven 6 pouets als quals sols hi havia els fibroblasts (cèl·lules de ratolins), per tant, el que hem fet:

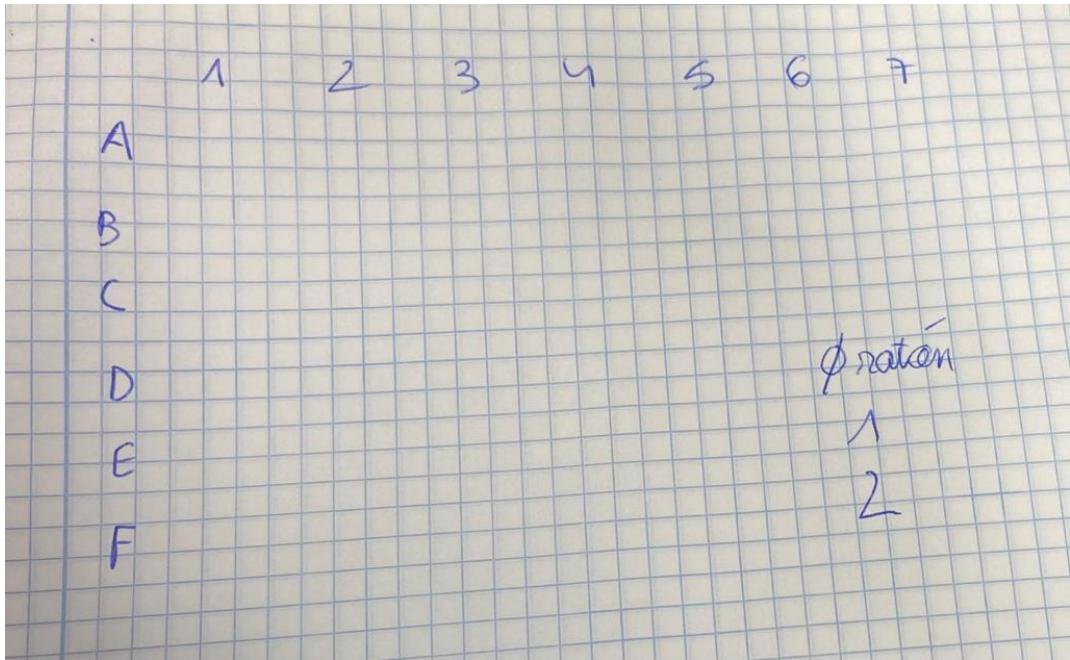


Figura 68: Placa de 48 pouets (fibroblasts de ratolins exposats al producte) on hi sobraven 6 pous i l'hem completat amb el control de fibroblasts i el ratolí 1 i 2 (48 hores). Font. Pròpia



8è dia de pràctiques (22/07/2021)

### **Què he fet avui?**

Hem agafat 3 plaques; la que hi teníem cèl·lules HEK293, havien passat 24 hores i hi havíem ficat sèrum de ratolí descomplementat i no descomplementat, la placa amb cèl·lules de ratolí que havien passat 48 hores i hi havia producte, 6 pous d'aquesta placa estaven plens amb sèrum de ratolí (control de ratolí, ratolí 1 i 2) i la placa amb cèl·lules HEK293 que havien passat 48 hores i tenien els productes. A aquestes plaques els hi hem tret el medi, ho hem netejat amb PBS i després hi hem ficat el reactiu per a llegir-n'hi la fluorescència.

A banda d'això hem fet un canvi de medi a les cèl·lules HEK293 que teníem en una càpsula de petri, per fer-ho hem tret el medi i n'hem ficat 9 mL de nou.

Hem fet també un pas a les cèl·lules de ratolí, per a fer-ho primer de tot traiem el medi, netegem dos cops amb PBS, en fiquem 5 mL cada vegada, posem 2 mL de tripsina (substància tòxica) i ho fiquem a incubar uns 2-3 minuts. Mentre preparem dues càpsules amb 9 mL de medi cadascuna i quan ha passat el temps agafem 100 microlitres de la tripsina on hi ha les cèl·lules i en fiquem 100 a una càpsula i 100 a l'altra.

Quan les plaques han estat incubant durant uns 40 minuts, les observem al fluorímetre.

9è dia de pràctiques (26/07/2021)

### **Què he fet avui?**

Avui hem sembrat cèl·lules HEK293 i cèl·lules de ratolí que teníem en càpsules.

Agafem aquestes càpsules i en traiem el medi, posem 5 mL de PBS i el traiem, repetim aquest procés un altre cop. Un cop fet això fem 2 mL de tripsina i ho incubem durant 2-3 minuts. Quan ha passat aquest temps fem 8 mL de medi a la càpsula on hi teníem la tripsina i en un pot a part barrejem 40 mL de medi de cultiu i 3 mL de la barreja que hem fet a la càpsula. Això ho fem tant de les HEK293 com de les de ratolí. Quan hem fet això agafem 200 microlitres de la barreja i omplim tots els pous de les plaques, cadascuna amb les seves cèl·lules corresponents.

Hem fet també el p-34 de les cèl·lules HEK293. Traiem el medi, netegem 2 cops amb PBS, fem tripsina, incubem, preparem dues càpsules a part amb 8 mL de medi cadascuna, i quan ha passat el temps d'incubació en fem 2 mL a cada càpsula.

