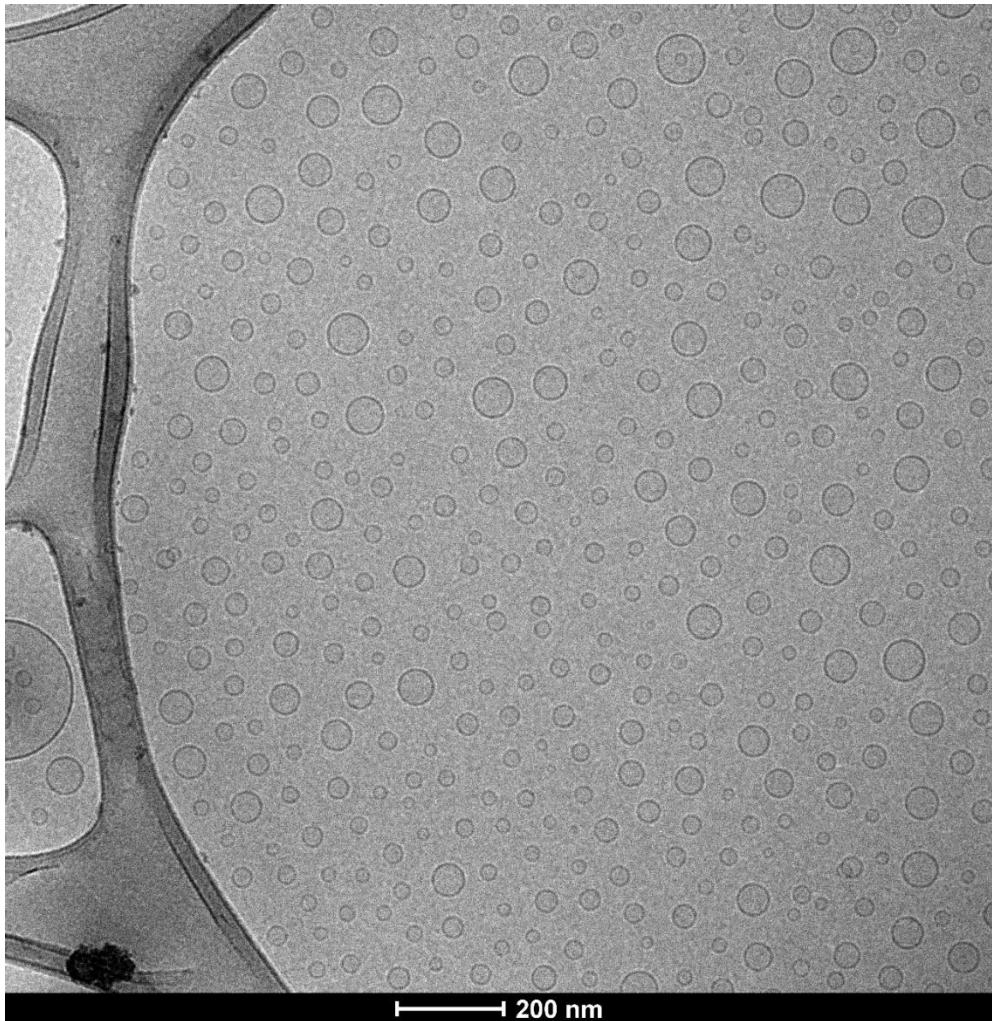


NANOCÀNCER

Nanotecnologia aplicada al tractament del càncer en la infància i l'adolescència



Pseudònim: Hortonenca

Aquest treball de recerca s'ha fet amb la col·laboració de l'entitat de recerca *Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)* sota la supervisió de Miguel Segura Ginard i el grup *d'Investigació Translacional del Càncer en la Infància i l'Adolescència*, en el marc del *Programa de formació científica, tecnològica i matemàtica (CTM)* organitzat pel Departament d'Ensenyament. Aquest programa ofereix als centres participants la possibilitat d'acollir-se al *Programa de suport a la realització dels treballs de recerca d'alumnat de batxillerat en col·laboració amb personal investigador d'entitats de recerca*.

També s'ha fet amb la col·laboració de l'entitat de recerca *Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCIT-UB)* sota la supervisió de Jordi Díaz Marcos, en el marc del programa *BATX2LAB* organitzat per la Universitat de Barcelona.

I like the word “nanotechnology.” I like it because the prefix “nano” guarantees it will be fundamental science for decades; the “technology” says it is engineering, something you’re involved in not just because you’re interested in how nature works but because it will produce something that has a broad impact.

— Richard E. Smalley

AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull agrair al meu tutor de treball de recerca, per la seva orientació, suport, ajuda i motivació durant aquest llarg procés que ha estat el treball de recerca.

També m'agradaria donar les gràcies a tots els membres del grup de Recerca Translacional en Càncer en la Infància i l'Adolescència per donar-me la oportunitat de viure aquesta nova experiència, especialment a en Miquel Segura i l'Ariadna Boloix per guiar-me i ajudar-me sempre que ho he necessitat.

D'altra banda, agrair també al Jordi Díaz, l'Eva, el Lluís, el Josep Maria, la Rosa, l'Adriana, el Misael i el Josep Manel per a haver-me obert els ulls davant la nanotecnologia, per les seves interessants i divertides classes de microscòpia.

I per últim, agrair també a la meva família que no ha deixat de confiar en mi, per animar-me i per donar-me la seva ajuda en tot moment.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	11
2. PREPARACIÓ I PURIFICACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES	16
3. CARACTERITZACIÓ FÍSICOQUÍMICA DE LES NANOPARTÍCULES	20
4. MODELS CEL·LULARS	25
5. ESTUDI DE BIOCOMPATIBILITAT CEL·LULAR	26
6. ASSAIG DE PROLIFERACIÓ AMB EL miRNA / siRNA D'INTERÈS	35
7. CONCLUSIONS.....	43
8. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA	45
9. ANNEXOS.....	47

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Diferents tipus de nanopartícules orgàniques i inorgàniques utilitzades en nanotecnologia. Font: nanowerk.com.....	13
Figura 2. Comparació de la distribució d'una droga administrada per via oral de manera convencional front a nanopartícules modificades. Font: Luísa and Cartaxo, 2011.....	14
Figura 3. Els mètodes "top-down" i "bottom-up" utilitzats per la síntesi de nanopartícules. Font: parsmineral.com	16
Figura 4. Reactor on es sintetitzen les nanopartícules mitjançant el mètode DELOS-SUSP.	17
Figura 5. (1) Introducció dels components de la solució orgànica al reactor. (2) Despressurització de la solució orgànica. (3) Esquema de les reaccions que es produeixen dins el reactor per a sintetitzar les nanopartícules amb el mètode DELOS-SUSP . (a) Primera fase: addició dels components orgànics al reactor. (b) Segona fase: Expansió de la fase orgànica en condicions supercrítiques de CO ₂ . (c) Tercera fase: Despressurització de la fase orgànica sobre una solució aquosa mitjançant l'ús de N ₂	18
Figura 6. Esquema de les diferències entre una vesícula unilamel·lar i una vesícula multilamel·lar. S'observa que les vesícules unilamel·lars tenen un centre aquós envoltat per una sola capa de lípids, mentre que les vesícules multilamel·lar tenen una altra capa de lípids al centre. Font: researchgate.net	19
Figura 7. KrosFlo Research Ili TFF System, diafiltrador per a purificar les nanopartícules.	19
Figura 8. Gràfics de la mida de les nanopartícules (NP) després de la síntesi o la purificació al llarg del temps (a) Mida de les NP en aigua i etanol una vegada acabades de sintetitzar. (b) Mida de les NP en aigua, ja diafiltrades, al cap d'una setmana. (c) Mida de les NP en aigua i etanol després de tres mesos de la seva síntesi (d) Mida de les NP en aigua tres mesos després de la diafiltració.	21
Figura 9. Gràfics del potencial Z de les NP (a) Potencial Z de les NP en aigua i etanol una vegada acabades de sintetitzar. (b) Potencial Z de les NP en aigua, ja diafiltrades, al cap d'una setmana. (c) Potencial Z de les NP en aigua i etanol tres mesos després de la seva síntesi. (d) Potencial Z de les NP en aigua tres mesos després de la diafiltració.	23
Figura 10. (a) Flascó amb les cèl·lules SK-N-BE(2) i medi de cultiu una vegada tret de l'incubador. (b) Rentat de les cèl·lules amb PBS. (c) Tripsinització de les cèl·lules per desenganxar-les de la paret del flascó.	26
Figura 11. (a) Tubs de 15 mL a la centrífuga. (b) Pellet de cèl·lules obtingut després de centrifugar.	27
Figura 12. (a) Cell Counter, comptador de cèl·lules automàtic. (b) Exemple d'una imatge obtinguda amb el Cell Counter. Com es mostra en aquesta imatge, les cèl·lules que són totalment negres són les que estan mortes, ja que com que no tenen membrana, el trypan blue ha pogut creuar la membrana. Per contra, les cèl·lules que tenen el centre brillant, són cèl·lules vives ja que al tenir membrana intacta, el trypan blue no l'ha pogut penetrar i entrar a dins. Font: genbiotech.net	28
Figura 13. S'omplen els pous de les vores de la placa amb medi per tal d'evitar que les cèl·lules s'assequin.....	28
Figura 14. (a) Preparació de la dilució de nanopartícules al tub de 1,5 mL. (b) Es pipeteja una dilució de nanopartícules per a posar-la als pous de la placa.	29
Figura 15. (a) Rentat amb PBS de les plaques. (b) Tinció de les plaques mitjançant cristall violeta al 0,5%.....	30
Figura 16. Introducció de la placa a l'espectrofotòmetre per a calcular l'absorbància de les cèl·lules.....	31
Figura 17. Exemple de la placa obtinguda després de seguir tots els passos.....	32
Figura 18. Gràfic de viabilitat cel·lular amb nanopartícules (NP) soles.	33
Figura 19. Gràfic de viabilitat cel·lular amb nanopartícules(NP) complexades amb miRNA control (Dy) que no afecta a la viabilitat.	33
Figura 20. Resultats de l'IC50, que indica a quina concentració la viabilitat de les cèl·lules s'haurà reduït un 50%.	34
Figura 21. (a) Es pipeteja la tripsina per a posar-la al flascó amb les cèl·lules. (b) Introducció del tub amb les cèl·lules a la centrífuga. (c) Preparació d'una dilució de les cèl·lules amb medi al tub de 15 mL després d'haver-les centrifugat.	35
Figura 22. (a) S'omplen els pous de les vores amb medi. (b) S'omplen els pous restants amb les cèl·lules dissoltes en medi.....	36

<i>Figura 23. (a) Preparació d'una dilució de lipofectamine i Opti-MEM en un tub de 1,5 mL. (b) Barreja de les dilucions de lipofectamine en Opti-MEM i miRNA en Opti-MEM en un tub de 1,5 mL.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 24. Preparació d'una dilució de miRNA i nanopartícules.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 25. S'afegeix la dilució de lipofectamine i miRNA als pous.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 26. Es posen les cèl·lules sobrants en un flascó.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 27. (a) Rentat amb PBS de les plaques. (b) Es posa cristall violeta a les plaques per a tenyir-les.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 28. Exemple de la placa tenyida amb cristall violeta 96 hores post-incubació amb els agents de transfecció esmentats.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 29. Gràfic de proliferació de les cèl·lules al cap de 96 hores respecte cada respectiu control.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 30. Gràfic de proliferació de les cèl·lules al cap de 96 hores respecte les cèl·lules sense tractar.</i>	<i>42</i>

1. INTRODUCCIÓ

La medicina és una branca de la ciència que estudia el diagnòstic, el tractament i la prevenció de les malalties. En comparació amb la medicina antiga, la medicina d'avui en dia està molt desenvolupada i s'han descobert moltes cures a diferents malalties que han anat sorgint, gràcies als científics, investigadors i personal mèdic que dia rere dia estan treballant per millorar la qualitat de vida de les persones.

El càncer és, actualment, una de les malalties més comunes i una de les causes més altes de mortalitat en els éssers humans. A l'any 2012 es van registrar uns 14 milions de casos de càncer i unes 8 milions de morts a tot el món, mentre que a Espanya, es van registrar uns 216.000 casos de càncer i unes 102.000 morts (Sociedad Española de Oncología Médica, 2017). El càncer es defineix com el conjunt de malalties en que les cèl·lules perden la capacitat d'aturar el seu creixement i es multipliquen sense control, arribant a envair teixits propers. Aquestes cèl·lules també es poden propagar a altres òrgans a través del sistema limfàtic o del torrent sanguini, això és el que es coneix com a "metàstasi". En general, els principals tractaments per al càncer són la cirurgia, la quimioteràpia i la radioteràpia, tot i que actualment s'està intentant fomentar les teràpies específiques en alguns tumors com ara la hormonoteràpia, les teràpies dirigides o la immunoteràpia.

El càncer infantil és molt diferent al càncer d'adults encara que, normalment, es traca com aquest últim. Així com el càncer en adults acostuma ser produït tant per causes ambientals com genètiques, el càncer infantil, no és degut a l'estil de vida o canvis ambientals sinó que sol ser causat per alteracions genètiques durant procés de desenvolupament de l'ésser humà. Com que el càncer infantil es considera una malaltia minoritària (Roma *et al.*, 2014), ja que no afecta més d'un 5-7% de la població, no genera interès en la indústria privada i tampoc rep ajudes suficients dels fons públics per a treballar en la investigació. Tot i que la supervivència del càncer infantil ha augmentat en els últims anys segueix sent la principal causa de mort per malaltia en nens entre 1 i 14 anys (Fernández-Plaza *et al.*, 2004). A Espanya, hi ha uns 1000 casos de càncer infantil a l'any i entre els anys 1980 i 2016, hi ha hagut aproximadament uns 27.922 casos (Peris Bonet *et al.*, 2017).

Podem dividir els càncers infantils més comuns en dos grups: el primer són les malalties hematològiques (leucèmia i limfoma); i el segon són els tumors sòlids (tumors cerebrals, osteosarcoma, sarcoma d'Ewing, rabdomiosarcoma i neuroblastoma). Malgrat que els tractaments actuals presenten una taxa de supervivència al voltant del 80% (*National Institutes of Health*), aquests tractaments comporten en alguns casos, manca d'efectivitat degut a resistència als fàrmacs, efectes secundaris sobre el creixement o desenvolupament o recidives a llarg termini (Fernández-Plaza *et al.*, 2004).

Les alteracions epigenètiques del DNA¹ estan altament relacionades amb processos de carcinogènesi². Aquestes alteracions epigenètiques poden ser l'alteració en metilació del DNA³, l'acetilació o la metilació de les histones⁴ i l'alteració de gens oncogènics⁵ o de supressors de tumors⁶ (Valdespino-Gómez and Valdespino-Castillo, 2012). Les teràpies epigenètiques són alternatives als tractaments actuals que reverteixen les alteracions epigenètiques per a restablir l'epigenoma "normal". Un exemple de teràpies epigenètiques en el càncer és l'ús de microRNA (miRNA). Els miRNAs són petits RNA no codificables que participen en el desenvolupament, la proliferació, la diferenciació, el metabolisme i la supervivència cel·lular mitjançant la unió a un RNA missatger (mRNA) complementari a la seva seqüència i la posterior inhibició o degradació del mRNA (Rupaimoole and Slack, 2017). És ben conegut que la desregulació dels miRNAs està relacionada al desenvolupament del càncer, per això aquests miRNA poden actuar com a oncògens o com a supressors tumorals (Di Leva and Croce, 2015). En conseqüència, les teràpies basades en miRNA poden ser per inhibició del miRNA, si aquest presenta una funció oncogènica o bé, de restauració dels nivells del miRNA si presenta una funció de supressor tumoral (Mao *et al.*, 2013; Boloix *et al.*, 2016). Per exemple, s'ha observat que la reintroducció del miR-497 redueix la proliferació i el creixement tumoral (Soriano *et al.*, 2016). No obstant, l'ús de miRNA encara presenta certes limitacions en la seva administració *in vivo*, ja que

¹ Les alteracions epigenètiques són canvis heretables en l'expressió gènica sense modificar la seqüència del DNA.

² La carcinogènesi és el procés per el qual una cèl·lula "normal" es transforma en una cèl·lula cancerígena.

³ L'alteració a la metilació del DNA és la incorporació excessiva o deficient de grups metil al DNA.

⁴ La metilació és la incorporació de grups metil i la acetilació és la incorporació de grups acetil. Les histones són unes proteïnes que ajuden al DNA a formar la cromatina.

⁵ Els gens oncogènics són gens que afavoreixen el desenvolupament de mutacions o del càncer.

⁶ Els gens supressors tumorals són gens que redueixen la probabilitat que una cèl·lula es transformi en una cèl·lula cancerosa.

poden ser poc biodisponibles en l'òrgan diana una vegada són administrats per via intravenosa degut a una activació del sistema immune, una semivida curta i una eliminació per via renal.

Amb l'aparició de la nanotecnologia, una branca de la ciència que estudia la matèria a escala nanomètrica, és a dir, a dimensions de 10^{-9} metres, han aparegut altres mètodes per a fer arribar aquests miRNA cap a les cèl·lules d'interès, com ara la nanoencapsulació (Mao *et al.*, 2013; Chitkara, Singh and Mittal, 2016). Altres aplicacions de la nanotecnologia en el camp del càncer són l'ús de nanopartícules, tant orgàniques com inorgàniques (Figura 1), per a encapsular la quimioteràpia i aconseguir una millor eficàcia de la droga, evitar la toxicitat d'aquesta i evitar-ne l'adquisició de resistències, per a destruir teixits cancerosos, etc. (Figura 2)(Alexis *et al.*, 2008).

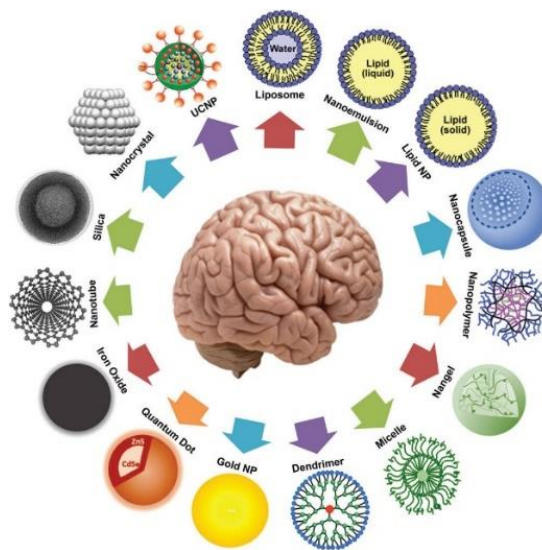


Figura 1. Diferents tipus de nanopartícules orgàniques i inorgàniques utilitzades en nanotecnologia. Font: nanowerk.com.

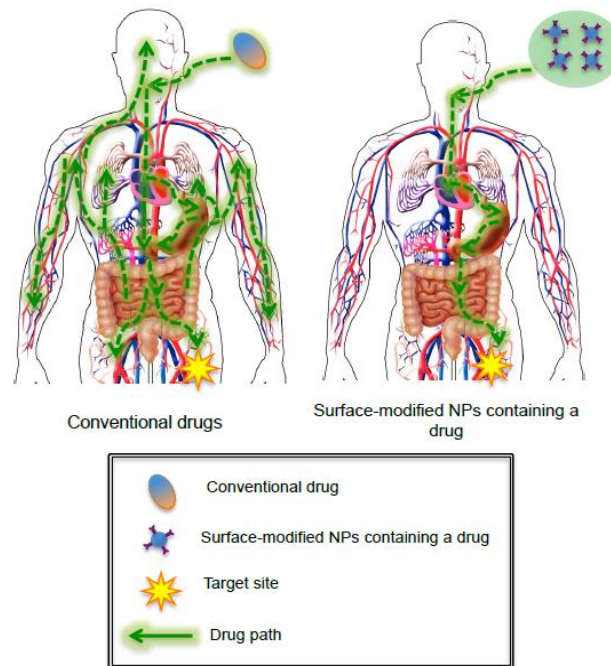


Figura 2. Comparació de la distribució d'una droga administrada per via oral de manera convencional front a nanopartícules modificades. Font: Luísa and Cartaxo, 2011.

En el meu treball de recerca s'ha provat una d'aquestes teràpies epigenètiques per al tractament del càncer mitjançant l'encapsulació de miRNA amb una nanopartícules orgàniques. En aquest estudi, s'ha provat l'eficàcia i la toxicitat de nanopartícules orgàniques conjugades amb miRNA en cèl·lules tumorals de neuroblastoma, el qual és el tumor sòlid més comú en infants i adolescents i que representa fins a un 15% de la mort infantil per càncer (Boloix *et al.*, 2016).. Per a fer els experiments s'ha utilitzat cèl·lules SK-N-BE(2), cèl·lules derivades del tumor d'un pacient amb neuroblastoma, les quals van ser adquirides de la Public Health England Culture Collections i també unes nanopartícules lipídiques no liposomals compostes per una barreja d'esterols i detergents de càrrega positiva creades pel grup de Nanomol de l' Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC).

Per a realitzar aquest treball em vaig presentar a dos programes: el primer, un programa d'ajuda a la realització del Treball de Recerca impulsat pel Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya el qual vaig estar seleccionada per a fer les pràctiques a l'Institut de Recerca de Vall d'Hebron (VHIR) i em van assignar el Dr. Miguel Segura Ginard del grup de Recerca Translacional en Càncer en la Infància

i l'Adolescència on vaig fer els experiments amb l'Ariadna Boloix. A part d'estar als laboratoris i sales de cultiu del VHIR, també vaig anar un parell de dies a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC) a la Universitat Autònoma de Barcelona, on vaig poder visitar les instal·lacions i fer una part del meu treball de recerca.

El segon programa al qual em vaig presentar, és el programa BATX2LAB impulsat per la Universitat de Barcelona, el qual també vaig estar seleccionada i em van assignar el Jordi Díaz Marcos, investigador dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) de l'àrea de Microscòpia de sonda pròxima (AFM, STM) i interferometria-confocal. Amb ell vaig realitzar el campus Summer Nanoschool durant una setmana on un grup d'estudiants de primer de batxillerat que també estaven fent el treball de recerca i jo, vam conèixer més sobre el món de la nanotecnologia amb xerrades i classes del Jordi Díaz. A més a més, investigadors específics de cada departament, ens van ensenyar a utilitzar els microscopis que tenen en les seves instal·lacions (com ara el Microscopi Electrònic de Rastreig, el Microscopi Electrònic de Transmissió, el Microscopi Confocal i el Microscopi de Forces Atòmiques), preparar mostres per a observar-les a aquests microscopis i també vam anar a l'Hospital Clínic a veure altres microscopis i a visitar la Unitat de Proteòmica.

La meva hipòtesi per aquest treball de recerca és: *L'ús de nanopartícules orgàniques complexades amb miRNA per al tractament del càncer infantil pot ser que afecti a la proliferació de les cèl·lules tumorals.*

2. PREPARACIÓ I PURIFICACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES

Per a la síntesi de nanopartícules i de nanomaterials en general, hi ha bàsicament dos mètodes: el mètode *top-down* i el mètode *bottom-up* (Figura 3). Aquests dos mètodes es fan servir tant per a crear nanopartícules orgàniques com nanopartícules inorgàniques. Els resultats obtinguts amb qualsevol dels dos mètodes, són pràcticament iguals.

El mètode *top-down* consisteix en obtenir nanomaterials trencant químicament o físicament materials més grans. D'altra banda, el mètode *bottom-up*, consisteix en unir àtoms o molècules. En lloc de descompondre el material per a crear estructures, aquestes es creen a partir d'àtoms o molècules seleccionades que s'uneixen químicament reconeixent les molècules.

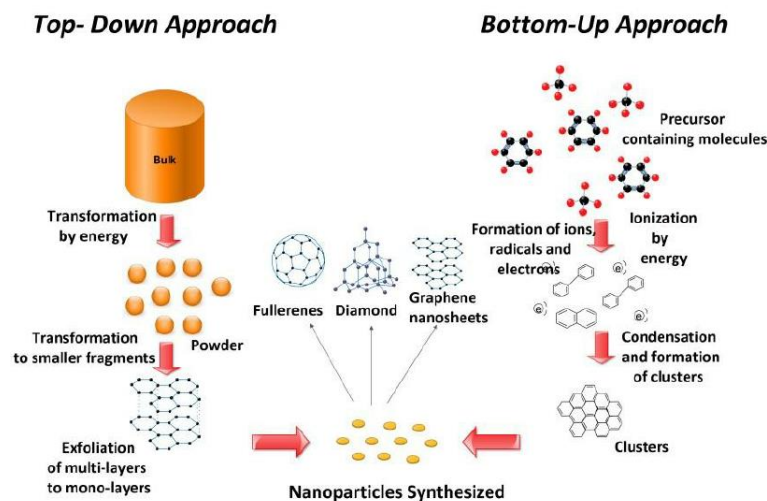


Figura 3. Els mètodes "top-down" i "bottom-up" utilitzats per la síntesi de nanopartícules. Font: parsmineral.com

El mètode de síntesi de les nanopartícules que es faran servir en els experiments és el mètode del bottom-up perquè les partícules s'acoblen entre elles, però el mètode de preparació és físic i no químic: per autoensamblatge de compostos orgànics mitjançant unions de Van der Waals.

El mètode de preparació de les NP és el DELOS-SUSP (Depressurization on an Expanded Liquid Organic Solution-Suspension), el qual és un mètode basat en fluids comprimits (Ferrer-Tasies et al., 2013). Aquest mètode està basat en la

despressurització d'una solució de líquid orgànic expandit en CO₂ sobre una solució aquosa en unes condicions de pressió i temperatura determinades (11,5 MPa i 311 K) (Figura 4).



Figura 4. Reactor on es sintetitzen les nanopartícules mitjançant el mètode DELOS-SUSP.

Primer, es dissol una barreja d'esterols⁷ en 2,88 mL d'etanol a una temperatura d'entre uns 313 i 318 K durant 10 minuts (Figura 5.1). Aquesta solució s'introdueix al reactor i després de 5 minuts d'equilibri a 311 K s'afegeix un CO₂ supercrític⁸ fins que s'aconsegueix la pressió de treball ($P_w = 11,5$ MPa). El reactor es manté a la pressió i la temperatura de treball durant 1 hora per garantir l'homogeneïtzació de la barreja orgànica en una sola fase dins del reactor. Finalment, per formar les vesícules, la solució orgànica es despressuritza a 11,5 MPa de N₂ sobre una fase aquosa, que conté el surfactant⁹ dissolt en 24 mL d'aigua (Figures 5.2). Aquesta

⁷ Els esterols són un tipus de lípids, un exemple és el colesterol.

⁸ El CO₂ supercrític és un estat fluid de diòxid de carboni on aquest es manté o supera la seva temperatura crítica o pressió crítica.

⁹ Un surfactant és una substància que influeix, per mitjà de la tensió superficial, en la superfície de contacte entre dues fases, un exemple són els detergents.

metodologia permet la preparació de nanovesícules lipídiques no liposomals, unilamel·lars, de forma esfèrica i homogènies entre elles (Figura 5.3 i 6).

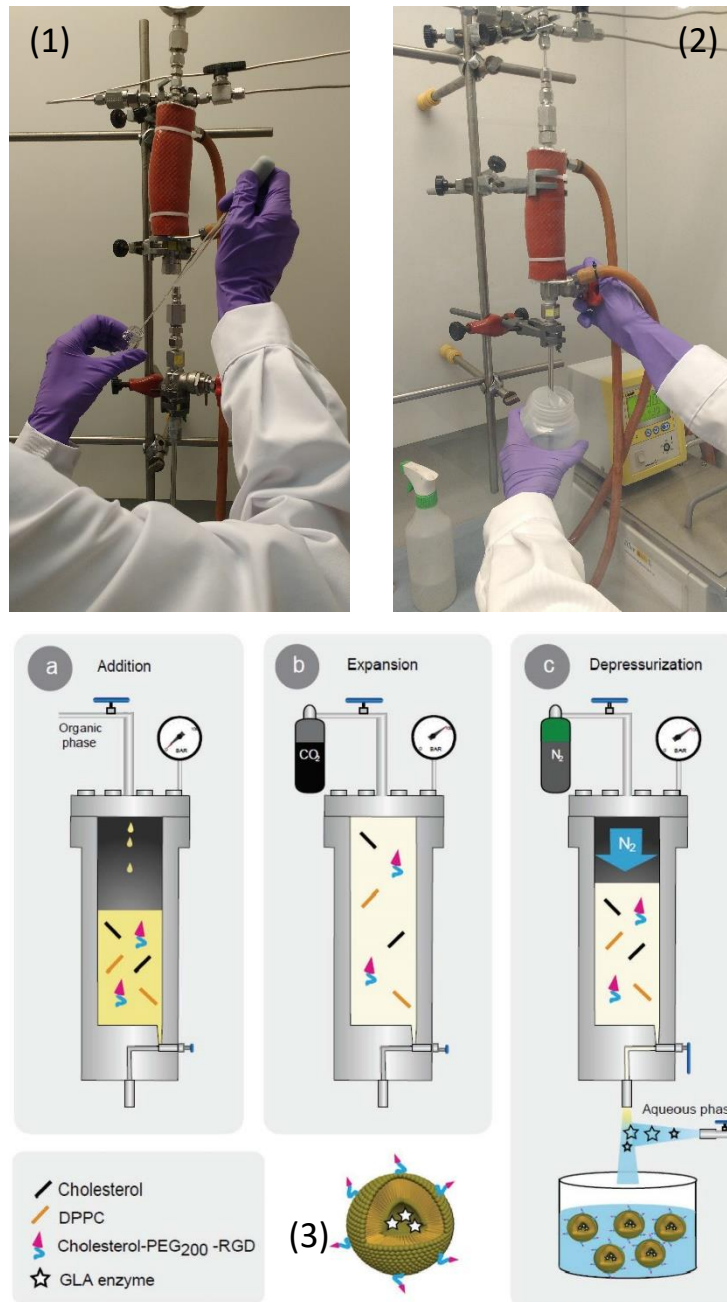


Figura 5. (1) Introducció dels components de la solució orgànica al reactor. (2) Despressurització de la solució orgànica. (3) Esquema de les reaccions que es produeixen dins el reactor per a sintetitzar les nanopartícules amb el mètode DELOS-SUSP. (a) Primera fase: addició dels components orgànics al reactor. (b) Segona fase: Expansió de la fase orgànica en condicions supercrítiques de CO₂. (c) Tercera fase: Despressurització de la fase orgànica sobre una solució aquosa mitjançant l'ús de N₂.

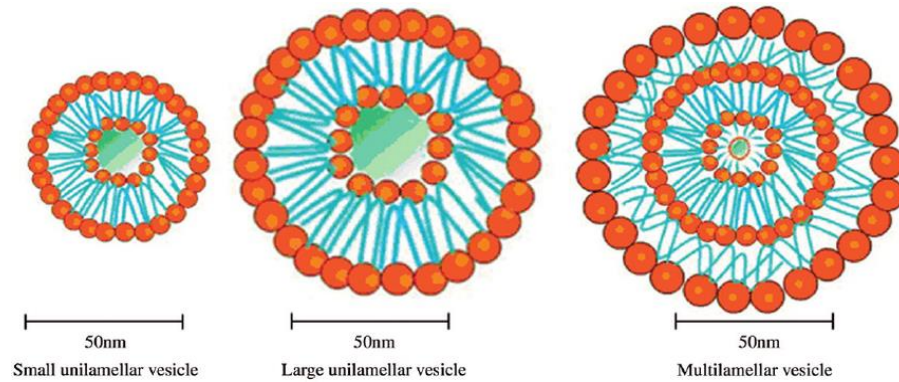


Figura 6. Esquema de les diferències entre una vesícula unilamel·lar i una vesícula multilamel·lar. S'observa que les vesícules unilamel·lars tenen un centre aquós envoltat per una sola capa de lípids, mentre que les vesícules multilamel·lars tenen una altra capa de lípids al centre. Font: researchgate.net

Després d'una setmana d'estabilització, totes les mostres es purifiquen per diafiltració utilitzant el KrosFlo Research Ili TFF System (Spectrum Labs) (Figura 7). Les mostres es filtren mitjançant una columna de filtre MicroKros per eliminar l'etanol i l'excés de material no encapsulat en les nanopartícules i obtenir-les en un medi aquós, com serà l'aigua MilliQ¹⁰.

En aquest diafiltrador, el qual té un sistema semblant a una diüresi, les partícules grans passen per dins la columna i tornen a circular mentre que el líquid i les partícules molt petites (<100 KDa) surten fora de la membrana i s'eliminen per un tub col·lector. Per això, si es fa circular aigua pel sistema, al final s'haurà eliminat o diluït suficientment el medi que tenien inicialment les partícules, en aquest cas, aigua i etanol, i s'haurà substituït pel que posem en el reservori.



Figura 7. KrosFlo Research Ili TFF System, diafiltrador per a purificar les nanopartícules.

¹⁰ L'aigua MilliQ és una aigua comercial purificada i desionitzada.

3. CARACTERITZACIÓ FÍSICOQUÍMICA DE LES NANOPARTÍCULES

La mida i la dispersió de les nanopartícules es mesura mitjançant la tècnica de dispersió de llum dinàmica (DLS o *Dynamic Light Scattering*) de Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). El diàmetre hidrodinàmic i l'índex de dispersió (PDI) s'obté utilitzant una llum làser incident He-Ne de 4 mW, una longitud d'ona de 633 nm i un angle de detecció fixat a 173° amb una detecció homodina¹¹. Les mostres es mesuren a 298 K sense canvis ni dilució. Els resultats es donen en percentatge d'intensitat de llum dispersa. El potencial Z o la càrrega superficial de la nanopartícula també s'obté amb el mateix mètode. Es realitza aquest experiment mínim tres vegades per comprovar la reproductibilitat d'aquests resultats.

En els següents gràfics es mostra un estudi de les nanopartícules sintetitzades anteriorment on es pot observar la mida de la partícula (Figura 8) i el seu potencial zeta (Figura 9).

¹¹ Una detecció homodina es produeix quan la freqüència de la senyal i del làser són iguals.

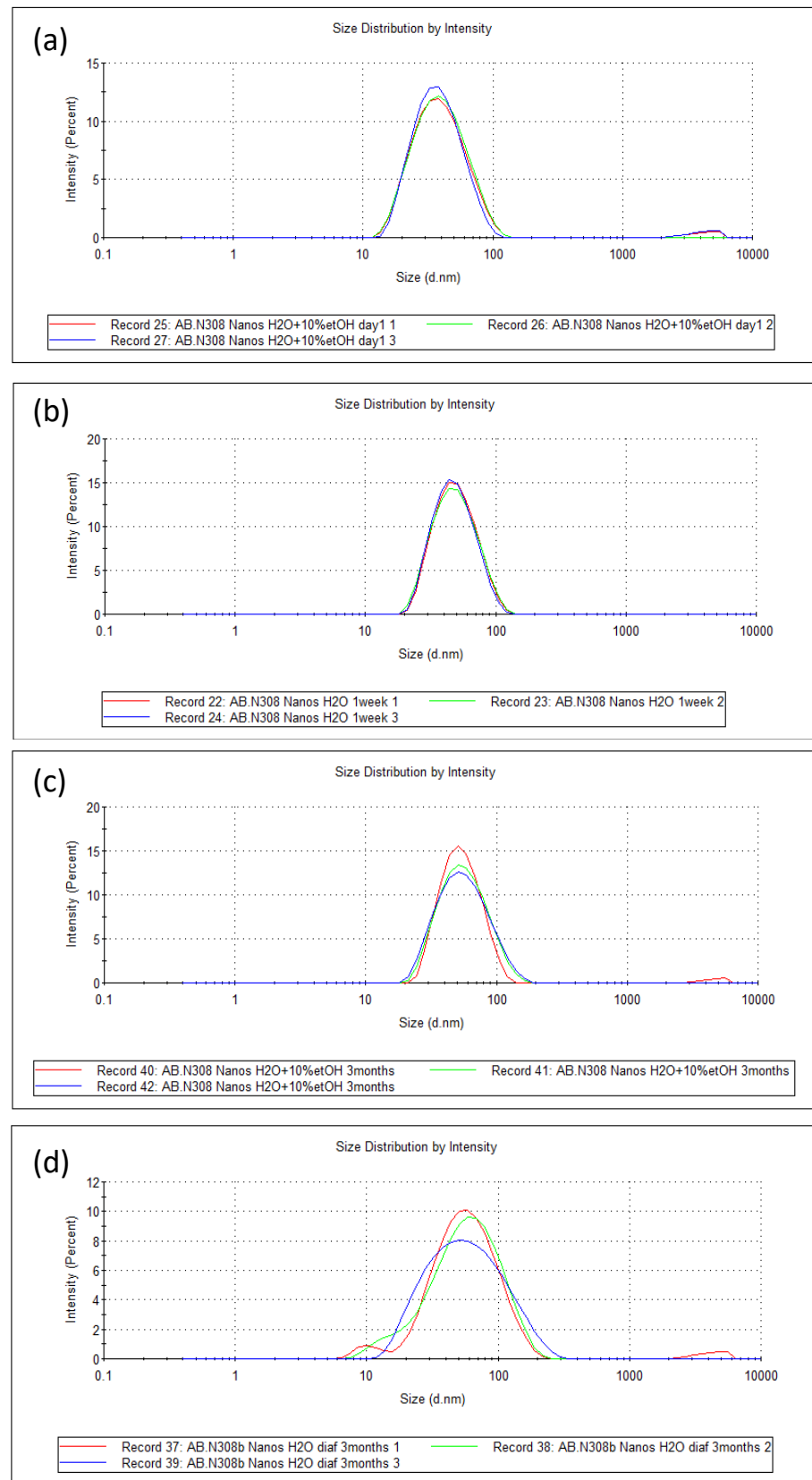


Figura 8. Gràfics de la mida de les nanopartícules (NP) després de la síntesi o la purificació al llarg del temps (a) Mida de les NP en aigua i etanol una vegada acabades de sintetitzar. (b) Mida de les NP en aigua, ja diafiltrades, al cap d'una setmana. (c) Mida de les NP en aigua i etanol després de tres mesos de la seva síntesi (d) Mida de les NP en aigua tres mesos després de la diafiltració.

Les nanopartícules, com s'ha dit anteriorment, es preparen en un medi format per aigua i etanol. Una vegada acabades de sintetitzar es mesura la seva mida i el seu potencial Z. Aquestes tenen una mida al voltant d'uns 40 nm (Figura 8a). Al cap d'una setmana es tornen a mesurar, es purifiquen i es deixen en un medi únicament format per aigua, ja que l'etanol és irritant a nivell intravenós. En aquest cas, la partícula ha augmentat una mica la seva mida i ara és d'uns 50 nm (Figura 8b). Posteriorment, es segueixen mesurant successivament les nanopartícules tant les purificades com les que no, fins als 6 mesos o un any. Al cap de tres mesos, les NP no purificades presenten una mida al voltant dels 50 nm (Figura 8c), així com les NP purificades que també presenten una mida d'uns 50 nm (Figura 8d).

Per concloure, les nanopartícules no diafiltrades han augmentat una mica la seva mida durant la primera setmana degut al seu procés d'estabilització, ja que segurament encara estan incorporant material prèviament no encapsulat després de la despressurització però després s'han mantingut estables al llarg del temps. D'altra banda, les NP diafiltrades mantenen la seva mida constant al llarg del temps.

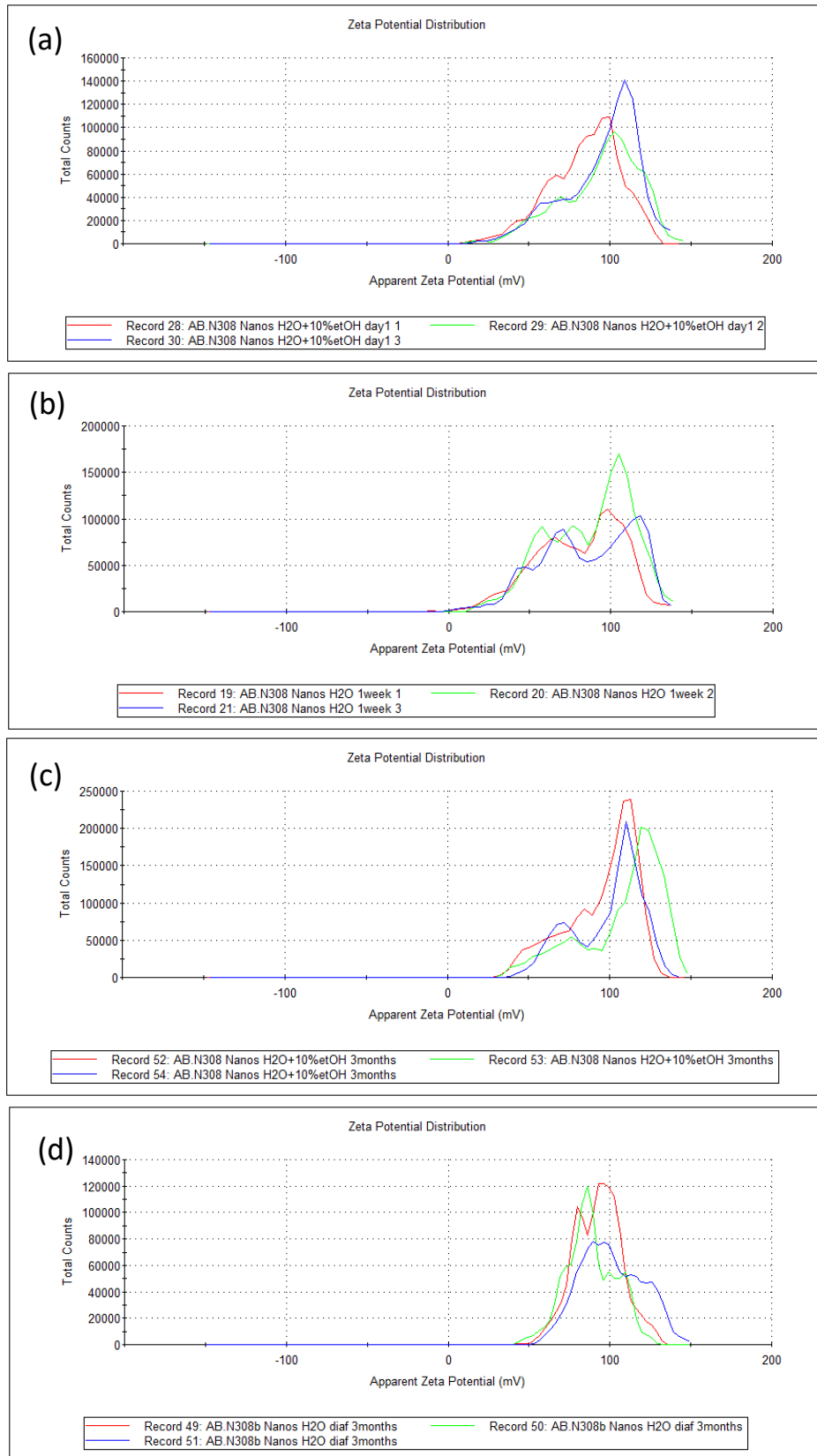


Figura 9. Gràfics del potencial Z de les NP (a) Potencial Z de les NP en aigua i etanol una vegada acabades de sintetitzar. (b) Potencial Z de les NP en aigua, ja diafiltrades, al cap d'una setmana. (c) Potencial Z de les NP en aigua i etanol tres mesos després de la seva síntesi. (d) Potencial Z de les NP en aigua tres mesos després de la diafiltració.

D'altra banda, el potencial Z, o la càrrega superficial de la nanopartícula (en el cas d'aquestes NP la càrrega positiva només ve donada pel surfactant catiònic usat, el qual presenta una càrrega positiva per molècula de surfactant) ens indica la càrrega que tenen. Les NP es mesuren una vegada acabades de sintetitzar i s'obtenen uns resultats del voltant d'uns 91 mV (Figura 9a). Al cap d'una setmana una vegada s'han purificat les partícules tenen un potencial una mica més baix, una mitjana d'uns 84 mV (Figura 9b). Al cap de tres mesos es mesuren una altra vegada, les nanopartícules que no s'han purificat i les purificades, les quals mesuren uns 97 mV (Figura 9c), i uns 86 mV (Figura 9d), respectivament.

En conclusió, el potencial Z de les NP es manté constant al llarg del temps tant en les NP purificades com no. Les NP tenen càrrega positiva, aquesta serà necessària per la posterior complexació amb les càrregues negatives del miRNA. En les NP diafiltrades el potencial és una mica més baix degut a que durant la diafiltració s'elimina part del surfactant, el qual té càrrega positiva, que pugui estar lliure en el medi sense formar part de les NP.

4. MODELS CEL·LULARS

Per a realitzar els següents experiments he utilitzat les cèl·lules SK-N-BE(2), cèl·lules derivades del tumor d'un pacient amb neuroblastoma, les quals van ser adquirides de la *Public Health England Culture Collections*¹².

Per tal de conservar les cèl·lules un període llarg de temps, es congelen en nitrogen líquid en un criovial¹³ amb un mil·lilitre de medi IMDM complet¹⁴ i un 10% de l'agent crioprotector DMSO (dimetil sulfòxid), el qual és utilitzat per protegir els teixits biològics del dany per congelació.

Les cèl·lules congelades es descongelen barrejant-les amb 10 mL de medi complet, el qual consta d'IMDM suplementat amb un 10% FBS¹⁵ (*Fetal Bovine Serum*), ITS¹⁶ (*Insulin-Transferrin-Selenium*), penicil·lina, estreptomina¹⁷ i plasmocin¹⁸.

Posteriorment, es centrifuguen per eliminar el DMSO que podria ser tòxic per les cèl·lules durant el seu creixement i es planten en un flascó amb 10 mL de medi complet. Per al seu manteniment aquests flascons s'incuben a l'incubador, el qual manté les cèl·lules en les condicions òptimes per al seu creixement, a 310 K, en un 96% d'humitat i a una atmosfera controlada de CO₂.

¹² La Public Health England Culture Collections és una col·lecció de línies cel·lulars i microbials utilitzades per científics d'arreu del món per a determinar els efectes d'algunes substàncies en cèl·lules humanes i per al diagnòstic i desenvolupament de vacunes i medicaments per malalties com el càncer.

¹³ Un criovial és un tub per a guardar mostres biològiques a altes o a baixes temperatures.

¹⁴ El medi IMDM és un tipus de medi de cultiu utilitzat per a la ràpida proliferació de cèl·lules d'alta densitat.

¹⁵ El FBS és un complement utilitzat per al cultiu cel·lular *in vitro* de cèl·lules eucariotes, té un nivell molt baix d'anticossos i conté factors de creixement.

¹⁶ L'ITS és un complement usat per al cultiu cel·lular.

¹⁷ La estreptomina és un antibiòtic d'espectre ampli.

¹⁸ La plasmocina és un antifúngic usat per prevenir i eliminar la contaminació per micoplasma en cultius cel·lulars.

5. ESTUDI DE BIOCOMPATIBILITAT CEL·LULAR

Per començar l'experiment, es treuen les cèl·lules de l'incubador i s'observen al microscopi per assegurar-se del seu correcte creixement (Figura 10a). En segon lloc, s'aspira el medi en el que es troben les cèl·lules i seguidament es fa un rentat amb PBS (*Phosphate Buffered Saline* o tampó fosfat salí) afegint-n'hi 4 mL per tal d'evitar la neutralització de la tripsina amb el medi que pugui quedar en el flascó (Figura 10b). Es torna a aspirar el PBS i s'hi afegeixen 4 mL de tripsina que ajudarà a desenganxar les cèl·lules del flascó (Figura 10c). Es posa el flascó durant uns 5 minuts a l'incubador perquè la tripsina faci més efecte.

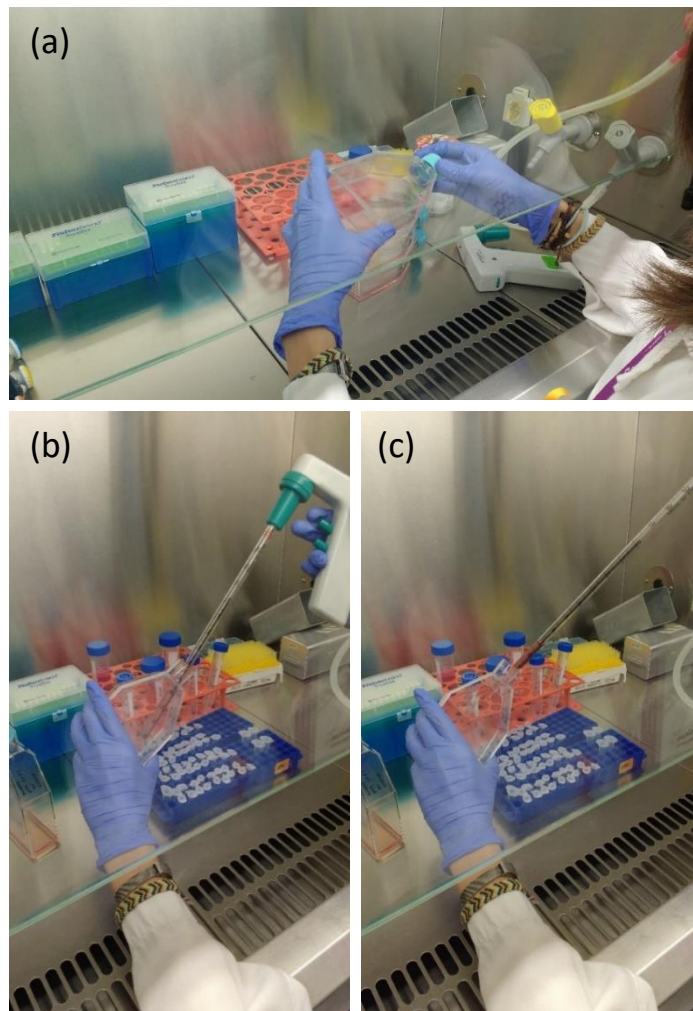


Figura 10. (a) Flascó amb les cèl·lules SK-N-BE(2) i medi de cultiu una vegada tret de l'incubador. (b) Rentat de les cèl·lules amb PBS. (c) Tripsinització de les cèl·lules per desenganxar-les de la paret del flascó.

Una vegada passats aquests 5 minuts, es treu el flascó de l'incubador i s'afegeix medi per a neutralitzar la tripsina i evitar que s'alteri la integritat de la membrana cel·lular. S'homogeneïtza amb la pipeta i es passen les cèl·lules amb la tripsina i el medi del flascó a un tub de 15 mL. Seguidament, es posen les cèl·lules a centrifugar, per tal de sedimentar les cèl·lules que ens interessen (Figura 12a). En aquest cas es volen únicament les cèl·lules vives, per tant es centrifuguen a 800 rpm durant 3 minuts; en cas de voler tant les vives com les mortes, es centrifuga a 1500 rpm durant 5 minuts (Figura 12b).

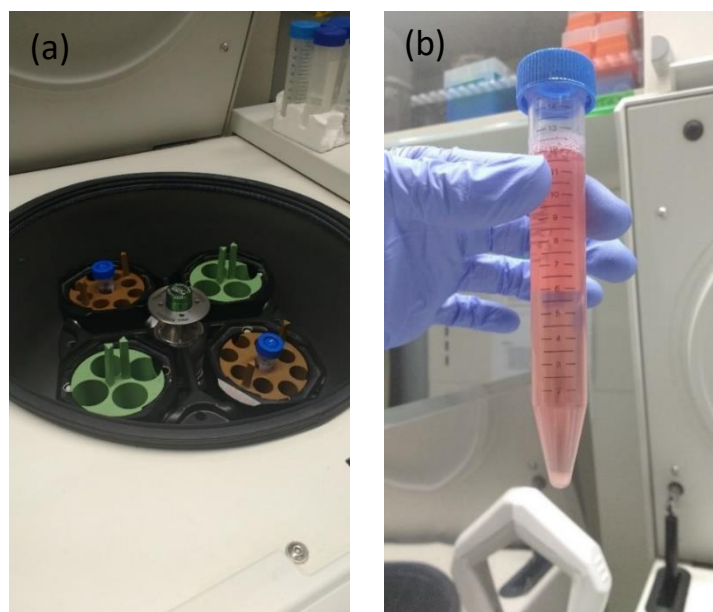


Figura 11. (a) Tubs de 15 mL a la centrifuga. (b) Pellet de cèl·lules obtingut després de centrifugar.

Una vegada s'ha centrifugat, s'aspira el sobrenedant que conté la tripsina i el medi i s'afegeix 1 mL de medi per a poder fer els comptatges de les cèl·lules. Per comptar les cèl·lules s'utilitzarà l'assaig d'exclusió del blau de tripa (en anglès, trypan blue), un colorant blau que entra únicament a les cèl·lules mortes perquè tenen la membrana cel·lular desestabilitzada o trencada. S'agafa un tub de 1,5 mL on es barregen 10 µl de trypan blue i 10 µl de cèl·lules. 10 µl de solució es posen en una cambra de comptatge per a poder comptar les cèl·lules que hi ha al pellet per mL. S'introdueix la cambra de comptatge al *Cell Counter* (Figura 12a) i automàticament s'indica el número de cèl·lules vives i mortes que es tenen (Figura 12b).

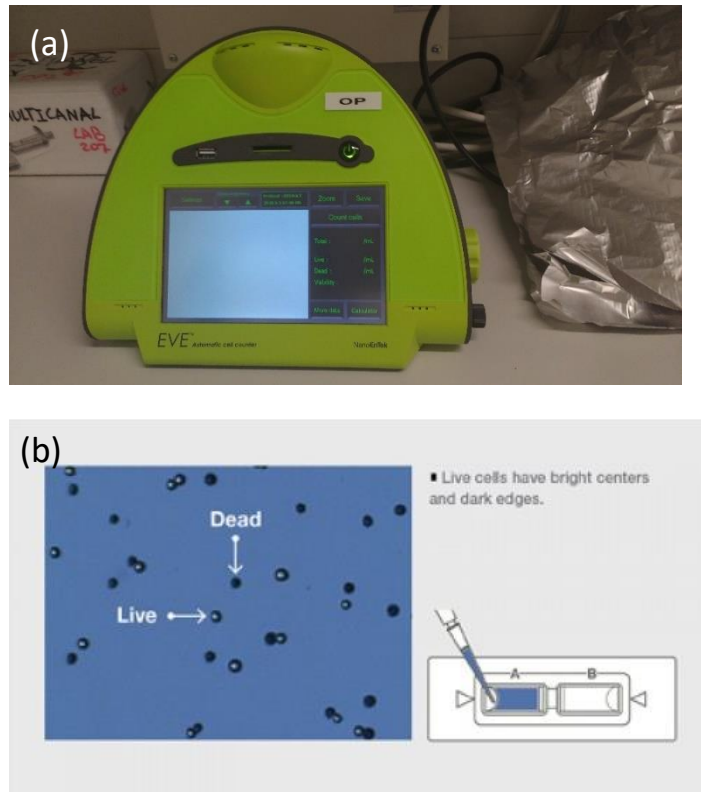


Figura 12. (a) Cell Counter, comptador de cèl·lules automàtic. (b) Exemple d'una imatge obtinguda amb el Cell Counter. Com es mostra en aquesta imatge, les cèl·lules que són totalment negres són les que estan mortes, ja que com que no tenen membrana, el trypan blue ha pogut creuar la membrana. Per contra, les cèl·lules que tenen el centre brillant, són cèl·lules vives ja que al tenir membrana intacta, el trypan blue no l'ha pogut penetrar i entrar a dins. Font: genbiotech.net

Amb els resultats que ens dona el *Cell Counter* es calcula quants mil·lilitres de cèl·lules es necessiten per afegir a cada pou. Seguidament, s'omplen els pous de les vores de la placa amb medi sense cèl·lules, per evitar que s'assequin els pous amb cèl·lules dins l'incubador (Figura 13).

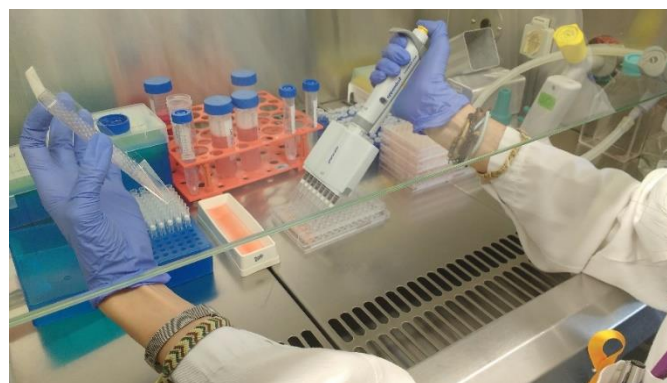


Figura 13. S'omplen els pous de les vores de la placa amb medi per tal d'evitar que les cèl·lules s'assequin.

S'afegeix la barreja de medi suplementat amb 10% de FBS i insulina-transferrina-seleni sense antibiòtics amb les cèl·lules comptades per afegir 18.000 cèl·lules per pou. S'afegeix 100 μ L de solució amb cèl·lules a cada pou i quan ja s'han omplert tots els pous es guarda la placa a l'incubador mentre es fan les dilucions de les nanopartícules. En aquest cas, es fan 9 tipus de dilucions: 1:20, 1:10, 1:7'5, 1:5, 1:2, 1:1'5, 1:1, 1:0'67 i 1:0'4 (Figura 14a). D'altra banda, per la segon placa, es faran diferents dilucions de nanopartícules, miRNA i PBS en diferents tubs de 1,5 mL.

Una vegada preparades les dilucions, es treu la placa de l'incubador i s'afegeix a cada pou 2 μ L de la dilució de nanopartícules que li correspon (Figura 14b). Quan s'ha acabat, les cèl·lules que han sobrat es posen altra vegada en un flascó perquè es tornin a expandir.

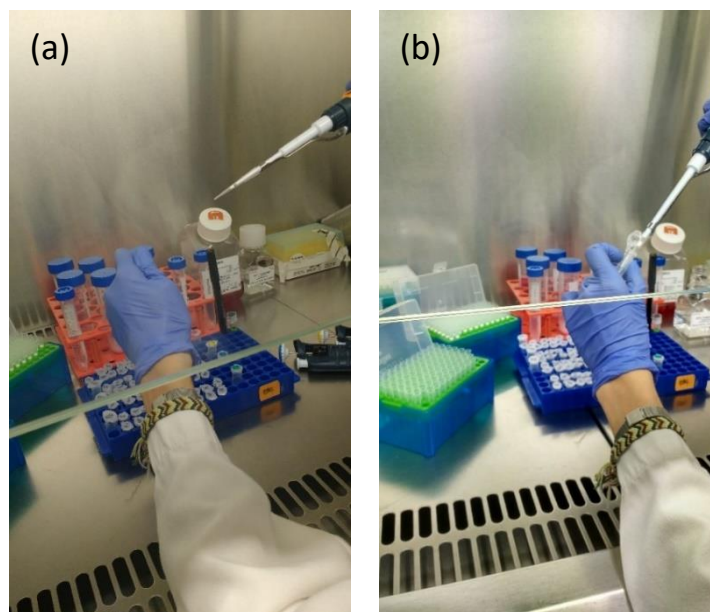


Figura 14. (a) Preparació de la dilució de nanopartícules al tub de 1,5 mL. (b) Es pipeteja una dilució de nanopartícules per a posar-la als pous de la placa.

Després de 24 hores post-incubació es processa la placa de l'experiment mitjançant quatre etapes: es renten els pous, es fixen les cèl·lules, es renta de nou i es tenyeixen les cèl·lules per calcular el número de cèl·lules vives que queden després dels tractaments amb diferents quantitats de nanopartícules. Per començar es fa un rentat a la placa amb PBS; per a fer-ho es llença el medi en què

tenim les cèl·lules (a l'abocar tot el medi de la placa també es llancen les cèl·lules mortes) i s'afegeix PBS als pous fins a cobrir-los (Figura 15a). Seguidament, es llença el PBS i s'hi afegeixen entre 50 i 75 μL de glutaraldehyd a l'1% per a fixar les cèl·lules. Per la correcta fixació, s'ha d'esperar 20 minuts.

Una vegada han passat aquests 20 minuts, es renta el glutaraldehyd, es torna a afegir PBS i es llença una altra vegada. A continuació, s'afegeixen 50 μL de cristall violeta al 0,5%, un colorant que serveix per a marcar les cèl·lules vives enganxades a la placa, ja que les mortes es llancen a la brossa a l'abocar el contingut de la placa abans de fixar-les (Figura 15b).

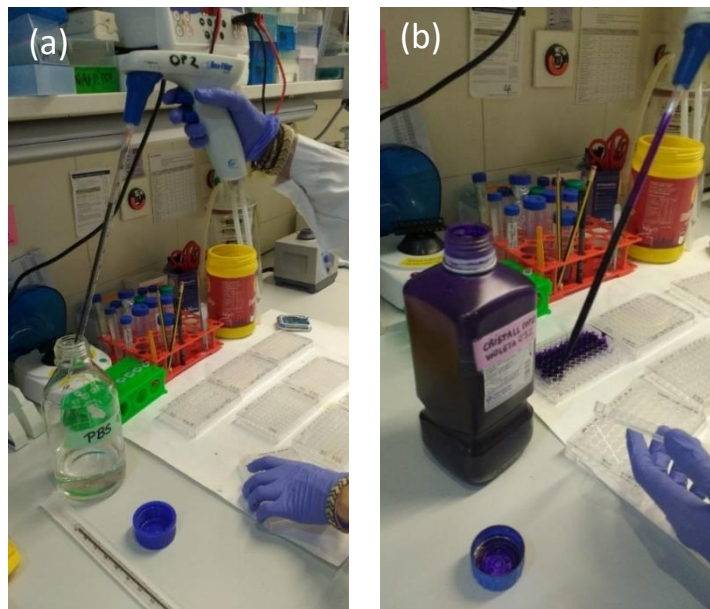


Figura 15. (a) Rentat amb PBS de les plaques. (b) Tinció de les plaques mitjançant cristall violeta al 0,5%.

Per assegurar-se de la correcta tinció de les cèl·lules es deixa el colorant 20 minuts a la placa. Posteriorment, es renta la placa amb aigua destil·lada per eliminar l'excés de colorant. És molt important no posar la placa directament a sota del raig de l'aigua ja que, degut a la pressió de l'aigua, es podrien desenganxar les cèl·lules. Es posa aigua en un vas de precipitats i es submergeixen les plaques fins a extreure tot el cristall violeta. Finalment, es deixa assecar la placa durant una nit.

Una altre assaig de viabilitat molt utilitzat és l'MTT, el qual mesura la viabilitat de les cèl·lules a partir de la capacitat metabòlica que tenen per metabolitzar un dye via enzimàtica. La idea és que a major nombre de cèl·lules tenen major capacitat metabòlica per metabolitzar el dye, el qual abans de metabolitzar-se és soluble i no té color i quan les cèl·lules el metabolitzen es torna insoluble i de color lila. Els dos mètodes es basen en un mètode de colorimetria, en el qual major color comporta una major lectura d'absorbància i això un valor més alt en n^o de cèl·lules.

El dia següent, es dissolen els cristalls en àcid acètic al 15%. Segons si la tinció de cristall violeta és molta o poca es necessita més o menys quantitat d'àcid acètic per dissoldre'l (s'afegeixen 100 µL o 50 µL d'àcid acètic). Seguidament, es posen les plaques en un agitador perquè s'acabi de dissoldre bé.

A continuació, es mesura l'absorbància de les cèl·lules mitjançant un espectrofotòmetre, un aparell que mesura la absorbància després de passar un feix de llum a través de la mostra (Figura 16). El programa Gen5 (Biotek Instruments) permet fer la lectura de l'absorbància i processar les dades per crear taules de resultats en format de fulla de càlcul. (Figura 17)

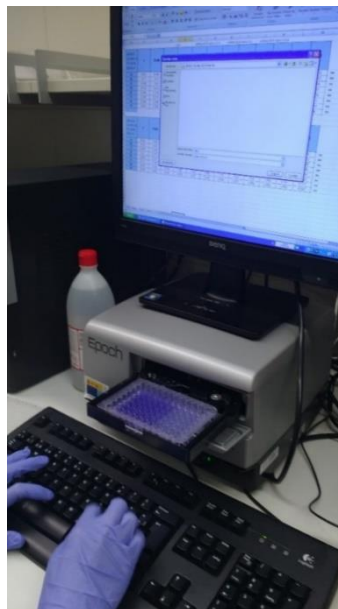


Figura 16. Introducció de la placa a l'espectrofotòmetre per a calcular l'absorbància de les cèl·lules.

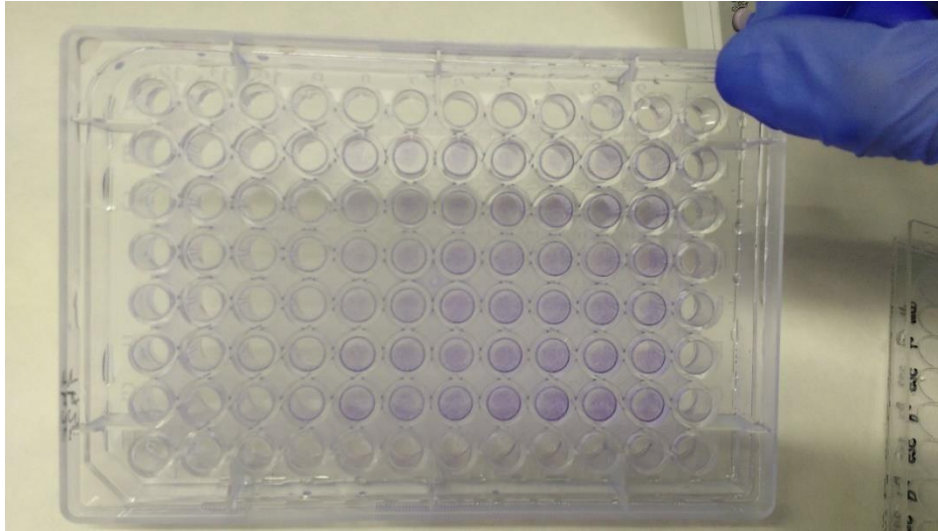


Figura 17. Exemple de la placa obtinguda després de seguir tots els passos.

ANÀLISI DELS RESULTATS

La proliferació cel·lular es manté al voltant del 100% fins a una concentració de 5,22 $\mu\text{g/mL}$ en les nanopartícules soles (Figura 18) i fins a una concentració de 1:1 o de 3,48 $\mu\text{g/mL}$ en les nanopartícules complexades amb miRNA control (Figura 19). En general considerem que les oscil·lacions d'un 10% de la viabilitat no són importants, per tant per parlar d'efecte en viabilitat en parlem quan la viabilitat es redueix més d'un 20%. Fins a una concentració de 6,95 $\mu\text{g/mL}$ o fins a la ratio 1:2,5 la proliferació cel·lular no es veu afectada pels tractaments, ja que es manté superior al 80%. A majors concentracions la proliferació es redueix exponencialment.

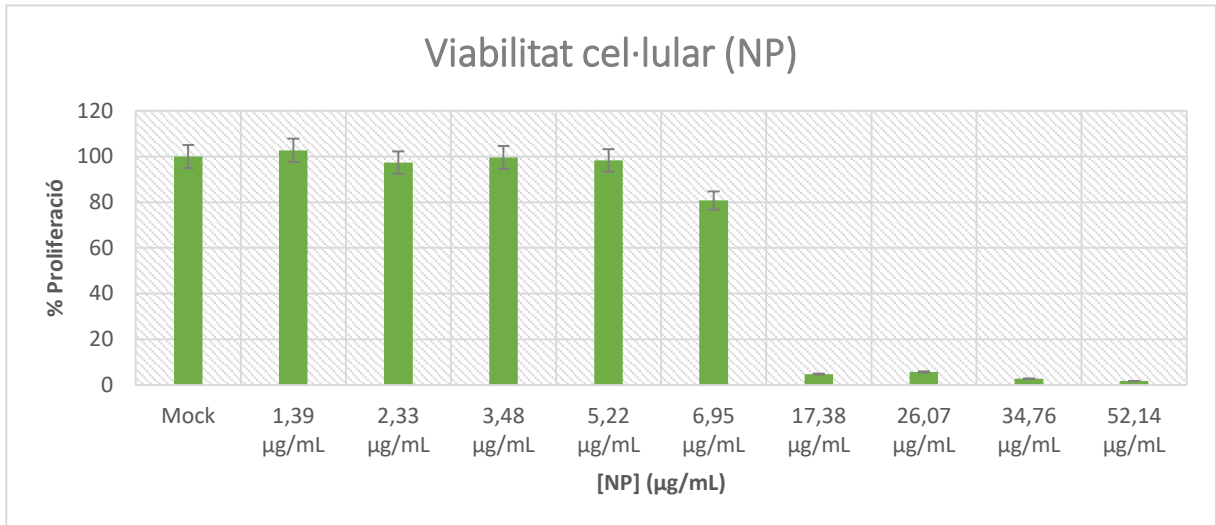


Figura 19. Gràfic de viabilitat cel·lular amb nanopartícules (NP) soles (Annex 1).

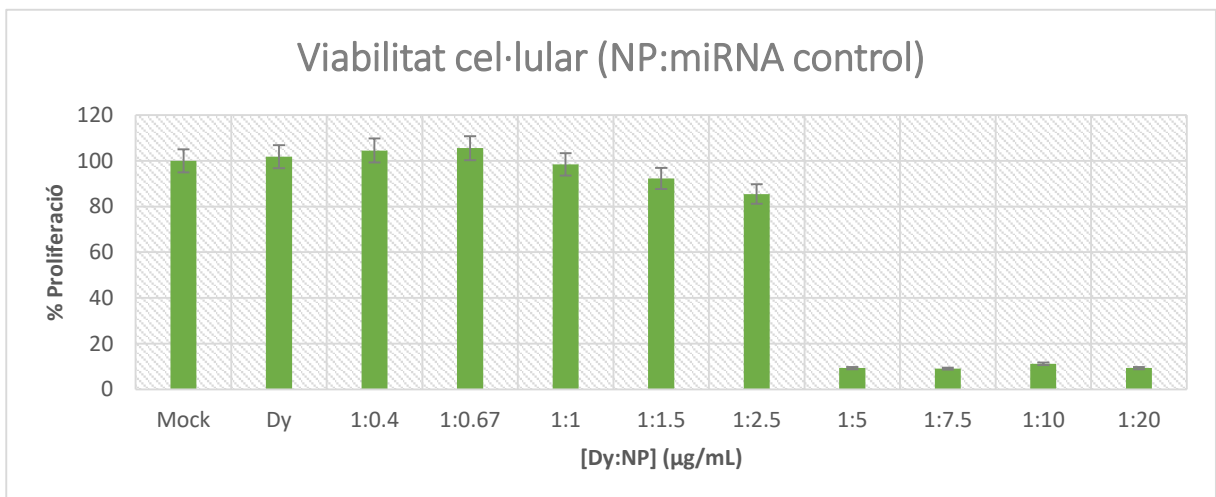


Figura 18. Gràfic de viabilitat cel·lular amb nanopartícules(NP) complexades amb miRNA control (Dy) que no afecta a la viabilitat (Annex 2).

La IC50 és una mesura de la potència d'una substància per a inhibir una funció biològica o bioquímica. Aquesta mesura indica quina quantitat de substància o inhibidor es necessita per inhibir un procés biològic a la meitat.

En aquest cas, la IC50 indica a quina concentració la viabilitat de les cèl·lules s'haurà reduït un 50% (Figura 20). Aquesta es pot determinar per extrapolació de l'eix Y sobre l'eix X, els valors per les NP és 8,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i per el miRNA:NP és 9,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Per tant, la concentració de partícules necessària per a reduir un 50% la viabilitat cel·lular és més alta quan es posa les NP conjugades amb el miRNA control (o Dy) que soles, ja que la partícula és menys tòxica un cop conjugada al miRNA, degut a l'apantallament de les càrregues positives de la NP amb les càrregues negatives del miRNA. D'aquesta manera, la NP té menys càrrega positiva accessible per interaccionar amb la cèl·lula, la qual conferirà la toxicitat. Com que l'experiment és de viabilitat, encara que les cèl·lules siguin cancerígenes, l'objectiu és que el tractament no sigui tòxic amb les nanopartícules.

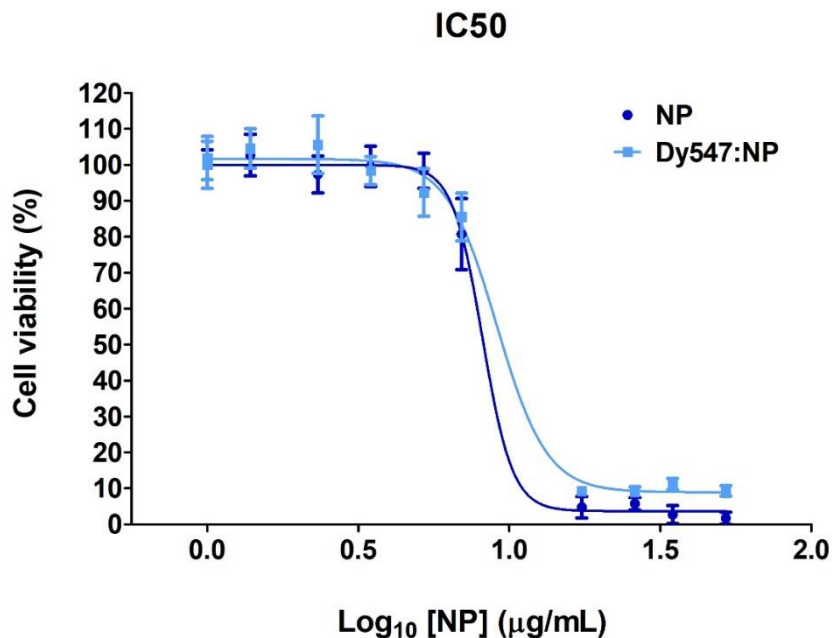


Figura 20. Resultats de l'IC50, que indica a quina concentració la viabilitat de les cèl·lules s'haurà reduït un 50%.

6. ASSAIG DE PROLIFERACIÓ AMB EL miRNA / siRNA D'INTERÈS

En aquest experiment s'han de seguir gairebé els mateixos passos que per a l'experiment de l'estudi de biocompatibilitat cel·lular.

Resumidament, es renten les cèl·lules del flascó amb PBS, es posa tripsina (Figura 21a), es centrifuga (Figura 21b), s'aspira el sobrenedant, s'afegeix medi (Figura 21c) i es compten les cèl·lules amb trypan blue. Fins aquí, el procediment és idèntic.

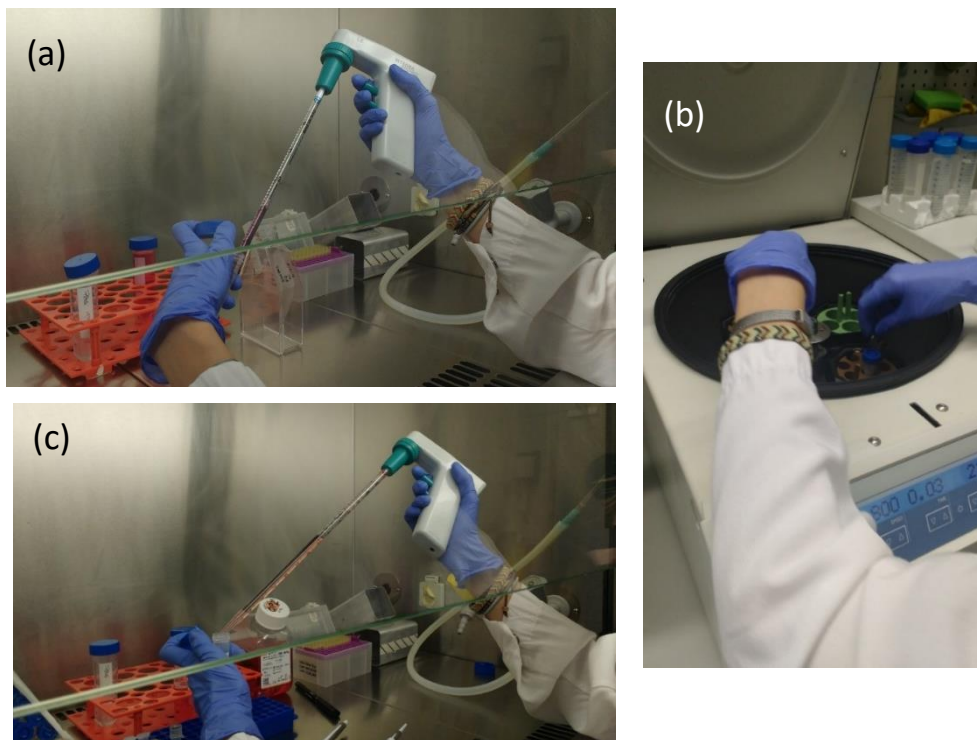


Figura 21. (a) Es pipeteja la tripsina per a posar-la al flascó amb les cèl·lules. (b) Introducció del tub amb les cèl·lules a la centrifuga. (c) Preparació d'una dilució de les cèl·lules amb medi al tub de 15 mL després d'haver-les centrifugat.

En aquest cas, l'objectiu de l'experiment és demostrar l'efectivitat del miRNA d'interès comparat amb un miRNA control un cop són conjugats amb les nanopartícules. Per això, s'avaluarà l'eficàcia dels conjugats miRNA:NP a diferents concentracions de NP però una concentració constant de miRNA.

Per aquest experiment, es plantaran 8.000 cèl·lules de SK-N-BE(2) per pou en una placa de cultiu de 96 pous. En primer lloc, s'omplen els pous de les vores amb medi sol (Figura 22a) i a la resta de pous s'afegeixen 100 µl de cèl·lules dissoltes en medi suplementat amb 10% FBS sense antibiòtics (Figura 22b).

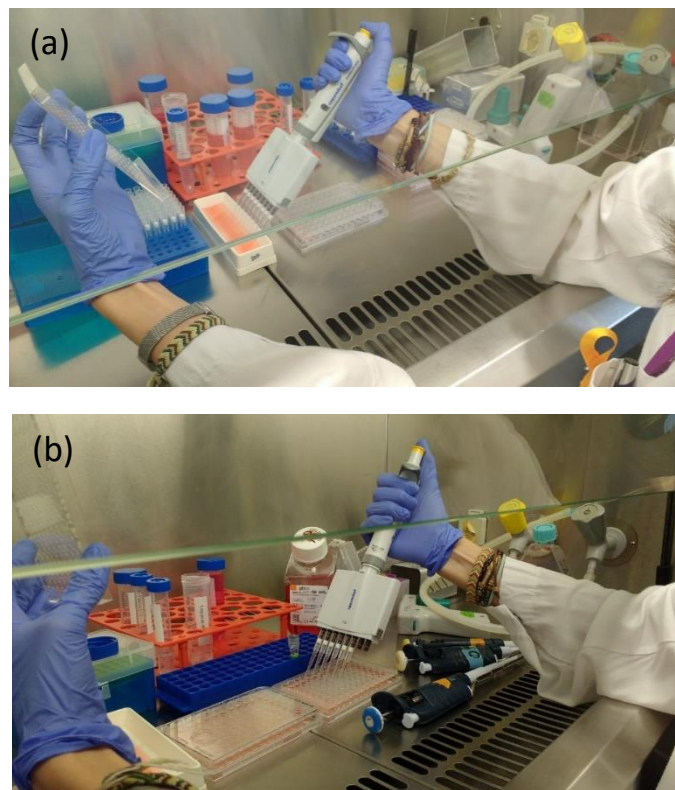


Figura 22. (a) S'omplen els pous de les vores amb medi. (b) S'omplen els pous restants amb les cèl·lules dissoltes en medi.

En els pous de la primera columna de la placa, s'afegeix únicament la dissolució de cèl·lules; a la segona s'hi posen cèl·lules i el complex de lipofectamine i miRNA control; a la tercera, cèl·lules i el complex de lipofectamine i el miRNA d'interès; a la quarta cèl·lules i les nanopartícules que estem estudiant conjugades amb el miRNA control; a la cinquena, cèl·lules i les nanopartícules conjugades amb el miRNA d'interès; i les quatre següents, posem el mateix que la quarta i la cinquena columna però amb menys quantitat de NP i mantenint constant la quantitat de miRNA, és a dir, una ratio diferent.

Abans de posar-ho tot dins els pous, cal fer les dilucions adients. Per les dilucions de la segona columna es fa, per una banda, una dilució de lipofectamine i Opti-MEM¹⁹ en un tub de 1,5 mL (Figura 23a) i, d'altra banda, es fa una dilució del miRNA control en Opti-MEM. Seguidament, s'ajunten les dues barreges de lipofectamine en Opti-MEM amb el miRNA de control en Opti-MEM, per tal que es formi un lipoplex entre l'agent de transfecció i el miRNA (Figura 23b).

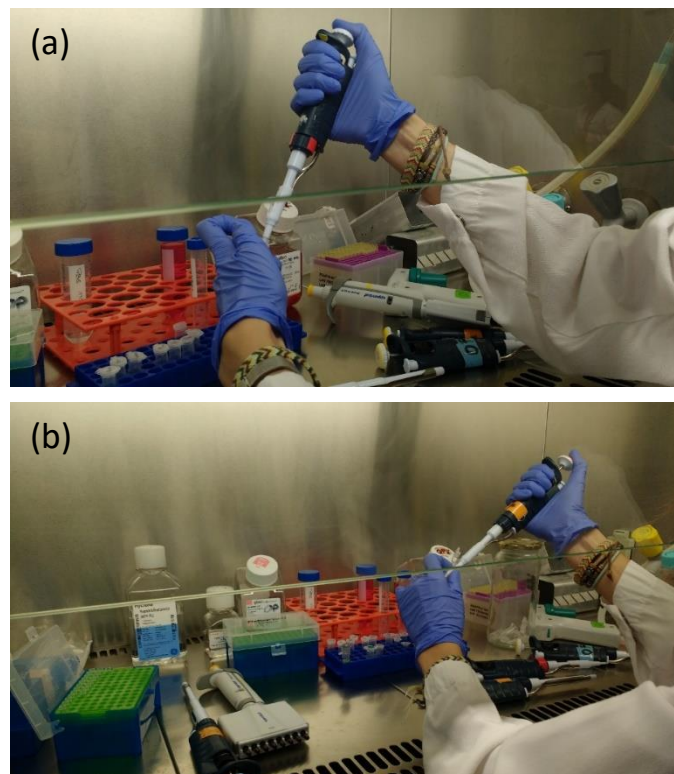


Figura 23. (a) Preparació d'una dilució de lipofectamine i Opti-MEM en un tub de 1,5 mL. (b) Barreja de les dilucions de lipofectamine en Opti-MEM i miRNA en Opti-MEM en un tub de 1,5 mL.

¹⁹ L'Opti-MEM és una agent de transfecció estàndard amb el medi recomanat.

Per a la dilució de la tercera columna es fa el mateix però en comptes d'utilitzar el miRNA control, s'utilitza el miRNA d'interès.

Per a fer les dilucions dels següents pous es posa en un tub de 1,5 mL les quantitats necessàries de les nanopartícules i del miRNA, el de control en unes columnes, i el d'interès en les altres (Figura 24). En aquest cas, el complex entre NP i miRNA es forma en PBS, no en Opti-MEM. Comprovem que les nanopartícules i el miRNA han format un complex, ja que la dilució del tub de 1,5 mL es torna tèrbola. Seguidament s'afegeix PBS per a diluir el complex.



Figura 24. Preparació d'una dilució de miRNA i nanopartícules.

El volum final per pou serà de 150 μL , ja que per assolir una concentració final de miRNA de 50 nM s'afegeixen 50 μL de la dilució de lipofectamine i miRNA (Figura 25); per tant, els pous amb cèl·lules únicament i als pous amb NP i miRNA, on només s'afegeix 3 μL de complex, s'acaba de completar amb 50 μL de medi sense cèl·lules per a igualar el volum. Igual que en l'altre experiment, si sobren cèl·lules, es tornen a sembrar en un flascó amb medi per al seu posterior manteniment (Figura 26). Seguidament es deixa la placa a l'incubador durant 96 hores.

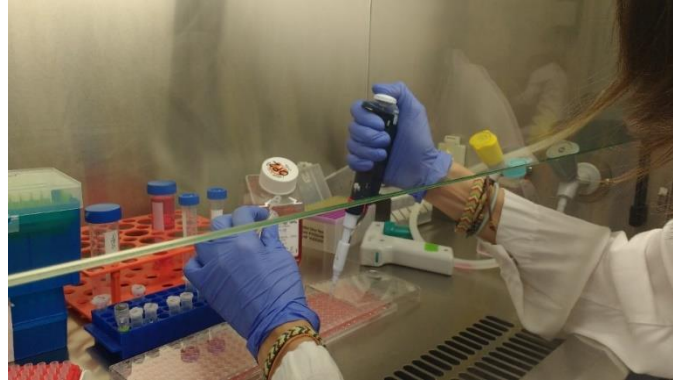


Figura 25. S'afegeix la dilució de lipofectamine i miRNA als pous.



Figura 26. Es posen les cèl·lules sobrants en un flascó.

Per a fer la tinció de les plaques es segueix el protocol explicat prèviament en l'experiment anterior (Figura 27ab i Figura 28).

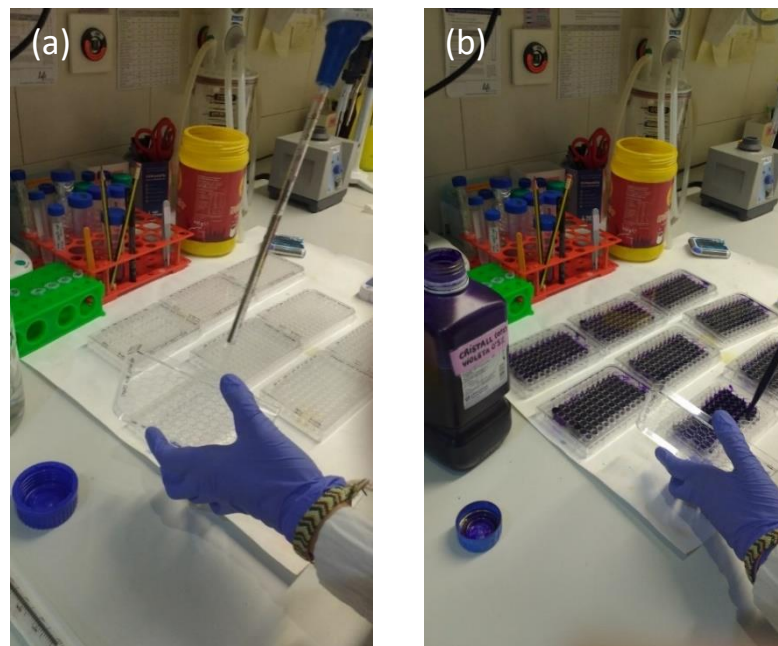


Figura 27. (a) Rentat amb PBS de les plaques. (b) Es posa cristall violeta a les plaques per a tenyir-les.

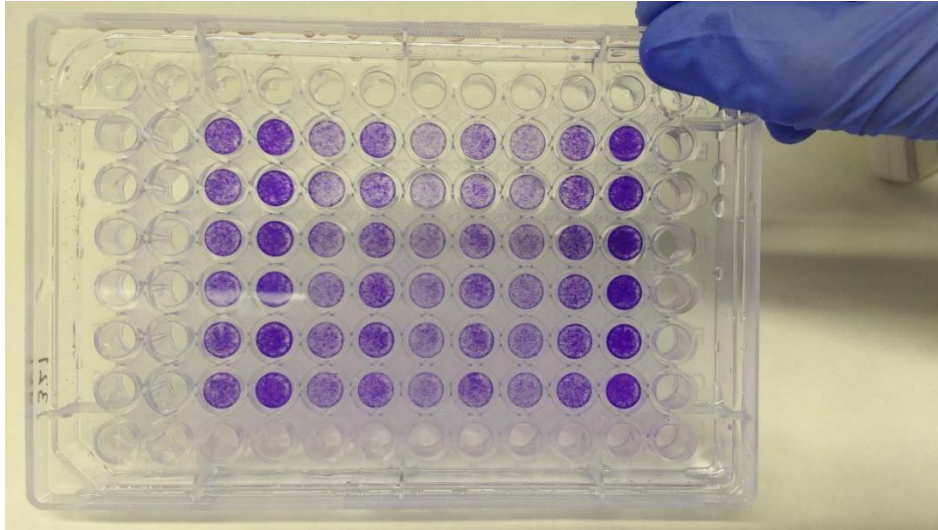


Figura 28. Exemple de la placa tenyida amb cristall violeta 96 hores post-incubació amb els agents de transfecció esmentats.

ANÀLISI DELS RESULTATS

Respecte a cada control (Figura 29), la proliferació de les cèl·lules es redueix un 44% aproximadament en els pous amb lipofectamine i miRNA. Pel que fa als pous amb una dilució 1:1,5 de miRNA i nanopartícules, la proliferació de les cèl·lules es redueix un 38%, per tant, una mica més alta que amb lipofectamine. En els pous amb una dilució 1:1 de miRNA i nanopartícules, la proliferació de les cèl·lules es redueix un 34% i en els pous amb una dilució 1:0,4, es redueix un 32%.

S'ha reduït la proliferació cel·lular al voltant d'un 55 - 60% en les cèl·lules tractades amb complex entre la lipofectamine i el miRNA, i la concentració 1:1,5 de miRNA:NP.

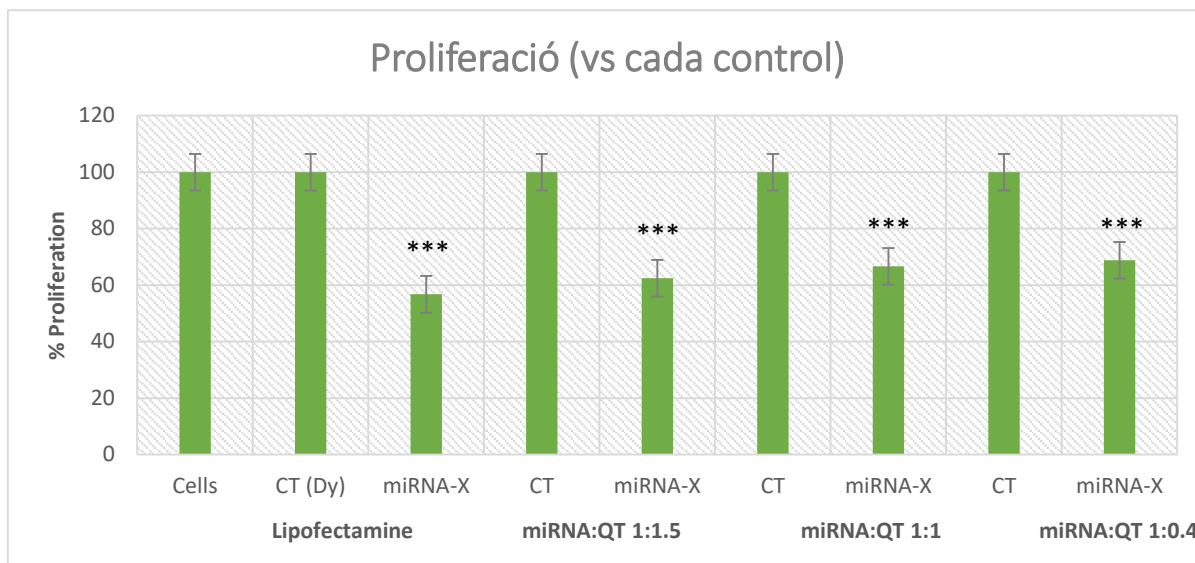


Figura 29. Gràfic de proliferació de les cèl·lules al cap de 96 hores respecte cada respectiu control (Annex 3).

Respecte a les cèl·lules sense tractar (la primera columna) (Figura 30), la proliferació de les cèl·lules tractades amb el CT i la lipofectamine es redueix un 38% aproximadament, i un 61% en els pous amb lipofectamine i miRNA-X.

Pel que fa als pous amb una dilució 1:1,5 de miRNA control i nanopartícules, la proliferació de les cèl·lules es redueix un 27%, mentre que en els pous amb una dilució 1:1,5 de miRNA i nanopartícules, es redueix un 54%.

En els pous amb una dilució 1:1 de miRNA control i nanopartícules, la proliferació de les cèl·lules es redueix un 21%, d'altra banda, en els pous amb una dilució 1:1 de miRNA i nanopartícules, la proliferació es redueix un 47%.

En els pous amb una dilució 1:0,4 de miRNA control i nanopartícules, es redueix un 13% i, finalment, en els pous amb una dilució 1:0,4 de miRNA i nanopartícules, es redueix un 40%.

Malgrat que la proliferació s'ha reduït més en les condicions tractades amb el miRNA-X i la lipofectamine, les condicions tractades amb una concentració 1:1,5 de miRNA i nanopartícules presenten uns resultats de proliferació bastant similars però amb menys toxicitat inespecífica, ja que les cèl·lules tractades amb el miRNA control presenten viabilitats més altes quan són tractades amb les NP que amb la

lipofectamine. Tanmateix podem observar que les cèl·lules tractades a una concentració de miRNA:NP més baixa que la 1:1,5 presenten menys eficàcia reduint la proliferació cel·lular però presenten també més viabilitat cel·lular en les condicions tractades amb el miRNA control.

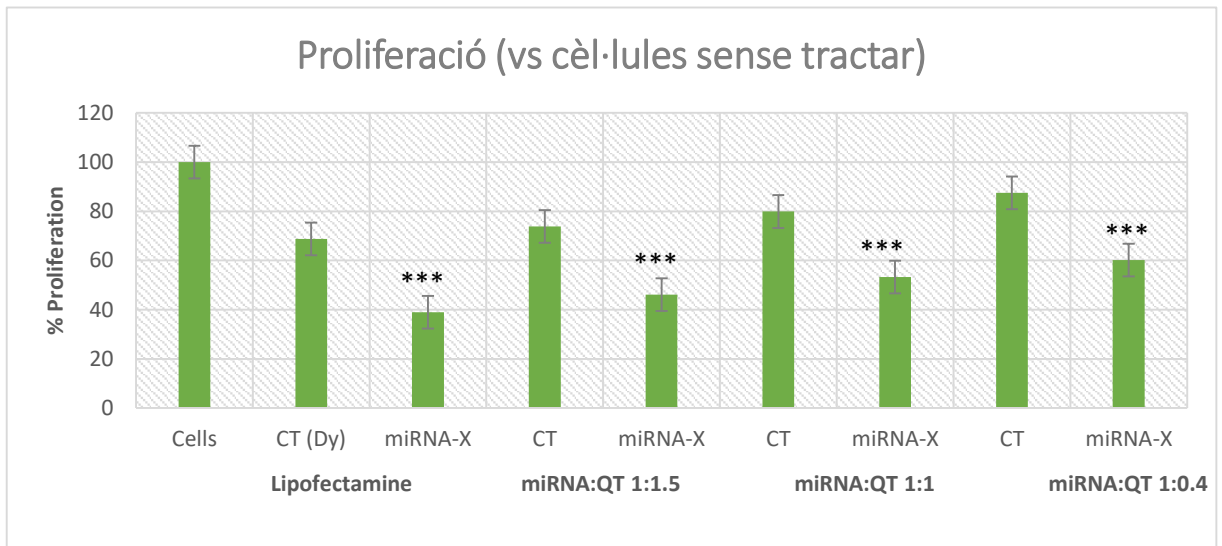


Figura 30. Gràfic de proliferació de les cèl·lules al cap de 96 hores respecte les cèl·lules sense tractar (Annex 3).

7. CONCLUSIONS

Finalment, després d'un llarg procés d'investigació, he pogut afirmar la meua hipòtesi: l'ús de nanopartícules complexades amb un miRNA sí que és una bona alternativa per a tractar els tumors en els càncers infantils.

A partir dels resultats de l'experiment de viabilitat cel·lular, s'ha observat que les nanopartícules alteren la proliferació de les cèl·lules canceroses a partir d'una concentració de 6,95 µg/mL.

A concentracions menors, no hi ha un canvi important en la proliferació de les cèl·lules, ja que es considera que les oscil·lacions d'un 10% no són importants. Amb aquest experiment es busca que les nanopartícules no fossin tòxiques, per tant, no es pot treballar amb concentracions majors a 6,95 µg/mL.

En l'experiment de proliferació sí que ja es prova l'efecte del miRNA sobre la supervivència de les cèl·lules. S'ha comprovat que el tractament que millor funciona és el complex està format per la lipofectamine i el miRNA, tot i que el complex format per una nanopartícules i el miRNA a una concentració de 1:1,5 també té resultats semblants.

La resta de concentracions de nanopartícules i miRNA (1:1 i 1:0,4) no afecten tant a la proliferació.

Podem concloure que els complexos que redueixen la proliferació de les cèl·lules al voltant d'un 55 – 60% són els formats per lipofectamine i miRNA i la concentració 1:1,5 de miRNA:NP.

Acabar el Treball de Recerca ha estat una tasca una mica complicada, ha requerit molt esforç i dedicació constant. D'aquest treball n'he extret una experiència nova i molt enriquidora, he treballat per primera vegada dins un laboratori professional i he pogut veure la dinàmica dins d'un centre de recerca en primera persona.

He treballat un tema que m'havia cridat molt l'atenció des d'un bon començament, i aplicat a una malaltia que trobo molt interessant, el càncer, ja que malauradament l'he viscut de molt a prop.

M'ha agradat molt treballar en aquest àmbit ja que m'ha fet obrir molt els ulls i pensar que no són només els adults qui pateixen malalties sinó que els nens també en pateixen. M'he adonat que el càncer en adults i en nens, només es diferencia per l'edat i que les teràpies utilitzades en adults i també sovint utilitzades en nens no són compatibles amb aquests últims.

8. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

Alexis, F. *et al.* (2008) 'New frontiers in nanotechnology for cancer treatment', *Urologic Oncology*, 26(1), pp. 74–85. doi: 10.1016/j.urolonc.2007.03.017.

Boloix, A. *et al.* (2016) 'Novel micro RNA-based therapies for the treatment of neuroblastoma', *Anales de pediatria*, 85(2), p. 109.e1-109.e6. doi: 10.1016/j.anpedi.2015.07.016.

Chitkara, D., Singh, S. and Mittal, A. (2016) 'Nanocarrier-based co-delivery of small molecules and siRNA/miRNA for treatment of cancer', *Therapeutic Delivery*, 7(4), pp. 245–255. doi: 10.4155/tde-2015-0003.

Fernández-Plaza, S., Sevilla, J. and Madero, L. (2004) 'Tratamiento del cáncer en pediatría: estado actual y expectativas futuras', *Pediatr Integral*, VIII(6), pp. 501–510.

Ferrer-Tasies, L. *et al.* (2013) 'Quatsomes: Vesicles formed by self-assembly of sterols and quaternary ammonium surfactants', *Langmuir*, 29(22), pp. 6519–6528. doi: 10.1021/la4003803.

Genbiotech (2018). Available at: <http://genbiotech.com/Homepage/> (Accessed: 11 November 2018).

Di Leva, G. and Croce, C. M. (2015) 'The Role of microRNAs in Cancer', in *Targeted Therapy in Translational Cancer Research*, pp. 80–88. doi: 10.1002/9781118468678.ch8.

Luísa, A. and Cartaxo, P. (2011) 'Nanoparticles types and properties – understanding these promising devices in the biomedical area', pp. 1–8.

Mao, Y. *et al.* (2013) 'MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes', *Pharmacological Research*, 75, pp. 37–47. doi: 10.1016/j.phrs.2013.06.005.

Nanotechnology and Emerging Technologies - Nanoscience News from Nanowerk (2016). Available at: <https://www.nanowerk.com/> (Accessed: 16 December 2018).

Pars Mineral (no date). Available at: <http://www.parsmineral.com/> (Accessed: 11 November 2018).

Peris Bonet, R. *et al.* (2017) 'Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2016.', *Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP)*. Valencia: Universitat de València, 2017 (Edición Preliminar, CD-Rom).

ResearchGate (2018). Available at: <https://www.researchgate.net/> (Accessed: 11 November 2018).

Roma, J. *et al.* (2014) 'MiRNA-targeted therapies in the most prevalent pediatric solid tumors', in *MicroRNA Targeted Cancer Therapy*, pp. 239–263. doi: 10.1007/978-3-319-05134-5_14.

Rupaimoole, R. and Slack, F. J. (2017) 'MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases', *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), pp. 203–222. doi: 10.1038/nrd.2016.246.

Sociedad Española de Oncología Médica (2017) *Las Cifras del Cáncer en España 2017*, SEOM, Sociedad Española de Oncología Médica. doi: M-3161-2018.

Soriano, A. *et al.* (2016) 'MicroRNA-497 impairs the growth of chemoresistant neuroblastoma cells by targeting cell cycle, survival and vascular permeability genes', *Oncotarget*, 7(8), pp. 9271–9287. doi: 10.18632/oncotarget.7005.

Valdespino-Gómez, V. M. and Valdespino-Castillo, V. E. (2012) 'Terapia epigenética en el cáncer. Logros y perspectivas', *Cirugía y Cirujanos*, pp. 470–480.

9. ANNEXOS

ANNEX 1

Taula I. Càlculs per a determinar la concentració de nanopartícules necessària en cada columna de la placa, tant per l'experiment de viabilitat com per l'experiment de proliferació. Els resultats estan expressats en $\mu\text{g}/\text{mL}$ a la columna de color blau. La concentració en logaritme és necessària per la representació gràfica de la IC50.

Ratio	[c] NP	[c] NP	[C] log
1:0,4	1,98653269	1,39057288	0,14319376
1:0,67	1,98653269	2,32424324	0,36628158
1:1	1,98653269	3,4764322	0,54113376
1:1,5	1,98653269	5,21464831	0,71722502
1:2	1,98653269	6,95286441	0,84216376
1:5	1,98653269	17,382161	1,24010377
1:7,5	1,98653269	26,0732415	1,41619503
1:10	1,98653269	34,764322	1,54113376
1:15	2,97979903	52,1464831	1,71722502

Taula II. Dades obtingudes una vegada hem introduït la placa (amb cèl·lules i nanopartícules) a l'espectrofotòmetre. Indica l'absorbància de les cèl·lules. Cada casella de la taula correspon a una pou de la placa on s'ha realitzat l'experiment. Els nombres que estan fora de la taula, 595, és la longitud d'ona amb la qual ha llegit l'espectrofotòmetre l'absorbància del cristall violeta de les cèl·lules, 595 nm. (Experiment de viabilitat cel·lular amb nanopartícules soles).

AB.N235 NP 50 nm		Mock	1,39 µg/mL	2,33 µg/mL	3,48 µg/mL	5,22 µg/mL	6,95 µg/mL	17,38 µg/mL	26,07 µg/mL	34,76 µg/mL	52,14 µg/mL		
A	0,048	0,05	0,051	0,051	0,049	0,051	0,051	0,052	0,052	0,049	0,052	0,051	595
B	0,135	0,608	0,655	0,59	0,608	0,597	0,556	0,125	0,102	0,105	0,105	0,09	595
C	0,109	0,669	0,708	0,602	0,629	0,631	0,579	0,102	0,12	0,107	0,072	0,09	595
D	0,123	0,637	0,625	0,634	0,678	0,648	0,577	0,136	0,117	0,065	0,09	0,09	595
E	0,123	0,636	0,628	0,63	0,656	0,654	0,527	0,115	0,131	0,124	0,105	0,084	595
F	0,11	0,639	0,63	0,661	0,601	0,624	0,447	0,113	0,121	0,103	0,106	0,087	595
G	0,106	0,608	0,639	0,593	0,611	0,588	0,481	0,09	0,122	0,038	0,064	0,085	595
H	0,047	0,056	0,049	0,05	0,05	0,048	0,049	0,05	0,056	0,05	0,05	0,049	595

Taula III. Taula calculada a partir de Taula II, en què les dades de l'absorbància de les cèl·lules menys la mitjana de l'absorbància de l'àcid acètic sol, que és de 0,0877. Les caselles de la taula que estan en blanc és perquè en aquells pous no s'hi ha posat cèl·lules, sinó que només s'hi ha posat medi. (Experiment de viabilitat cel·lular amb nanopartícules soles).

AB.N235 NP 50 nm		Mock	1,39 µg/mL	2,33 µg/mL	3,48 µg/mL	5,22 µg/mL	6,95 µg/mL	17,38 µg/mL	26,07 µg/mL	34,76 µg/mL	52,14 µg/mL		
A													595
B		0,520	0,567	0,502	0,520	0,509	0,468	0,037	0,014	0,017	0,017		595
C		0,581	0,620	0,514	0,541	0,543	0,491	0,014	0,032	0,019	0,000		595
D		0,549	0,537	0,546	0,590	0,560	0,489	0,048	0,029	0,000	0,002		595
E		0,548	0,540	0,542	0,568	0,566	0,439	0,027	0,043	0,036	0,017		595
F		0,551	0,542	0,573	0,513	0,536	0,359	0,025	0,033	0,015	0,018		595
G		0,520	0,551	0,505	0,523	0,500	0,393	0,002	0,034	0,000	0,000		595
H													595

Taula IV. Taula calculada a partir de Taula III, percentatges de viabilitat cel·lular. Aquests s'han obtingut dividint la mitjana del valor de cada pou entre la mitjana dels valors del seu control, en aquest cas, les cèl·lules soles. La fila "Mean" és la mitjana dels sis pous i la fila "SD" és la desviació estàndard dels 6 pous. (Experiment de viabilitat cel·lular amb nanopartícules soles).

AB.N235 NP 50 nm	1	Mock	1,39 µg/mL	2,33 µg/mL	3,48 µg/mL	5,22 µg/mL	6,95 µg/mL	17,38 µg/mL	26,07 µg/mL	34,76 µg/mL	52,14 µg/mL	
A												
B		95,445	104,066	92,143	95,445	93,427	85,906	6,848	2,629	3,179	3,179	
C		106,634	113,788	94,344	99,297	99,664	90,125	2,629	5,931	3,546	0,000	
D		100,764	98,563	100,214	108,285	102,782	89,758	8,866	5,381	0,000	0,428	
E		100,581	99,113	99,480	104,249	103,883	80,587	5,014	7,949	6,665	3,179	
F		101,131	99,480	105,167	94,161	98,380	65,913	4,647	6,114	2,813	3,363	
G		95,445	101,131	92,693	95,995	91,776	72,149	0,428	6,298	0,000	0,000	

Mean		100	102,6903	97,3403	99,5720	98,3186	80,7398	4,7386	5,7169	2,7005	1,6916	
SD		4,1883	5,7898	5,1317	5,6032	4,8872	9,8974	2,9866	1,7418	2,5003	1,7053	

ANNEX 2

Taula V. Dades obtingudes una vegada hem introduït la placa (amb cèl·lules i nanopartícules acomplexades amb miRNA que no afecta a la viabilitat) a l'espectrofotòmetre. Indica l'absorbància de les cèl·lules. Cada casella de la taula correspon a una pou de la placa on s'ha realitzat l'experiment. Els nombres que estan fora de la taula, 595, és la longitud d'ona amb la qual ha llegit l'espectrofotòmetre l'absorbància del cristall violeta de les cèl·lules, 595 nm. (Experiment de viabilitat cel·lular amb nanopartícules complexades amb miRNA control).

AB.N235 DY:NP 50 nm		Mock	Dy	1:0,4	1:0,67	1:1	1:1,5	1:2,5	1:5	1:7,5	1:10	1:20	
A	0,055	0,052	0,053	0,052	0,05	0,049	0,054	0,053	0,05	0,051	0,05	0,051	595
B	0,113	0,543	0,537	0,578	0,574	0,563	0,475	0,486	0,095	0,091	0,117	0,099	595
C	0,128	0,63	0,588	0,632	0,582	0,549	0,577	0,501	0,105	0,107	0,104	0,105	595
D	0,187	0,59	0,6	0,598	0,655	0,578	0,519	0,512	0,106	0,101	0,102	0,093	595
E	0,209	0,551	0,624	0,606	0,603	0,581	0,537	0,546	0,097	0,106	0,101	0,108	595
F	0,236	0,56	0,57	0,599	0,636	0,571	0,55	0,48	0,102	0,093	0,115	0,105	595
G	0,163	0,545	0,557	0,548	0,543	0,528	0,522	0,443	0,094	0,094	0,119	0,089	595
H	0,057	0,054	0,055	0,053	0,058	0,056	0,055	0,055	0,057	0,053	0,053	0,055	595

Taula VI. Taula calculada a partir de Taula V, en què les dades de l'absorbància de les cèl·lules menys la mitjana de l'absorbància de l'àcid acètic sol, que és de 0,0877. Les caselles de la taula que estan en blanc és perquè en aquells pous no s'hi ha posat cèl·lules, sinó que només s'hi ha posat medi. (Experiment de viabilitat cel·lular amb nanopartícules complexades amb miRNA control).

AB.N235 DY:NP 50 nm		Mock	Dy	1:0,4	1:0,67	1:1	1:1,5	1:2,5	1:5	1:7,5	1:10	1:20	
A													595
B		0,4913	0,4853	0,5263	0,5223	0,5113	0,4233	0,4343	0,0433	0,0393	0,0653	0,0473	595
C		0,5783	0,5363	0,5803	0,5303	0,4973	0,5253	0,4493	0,0533	0,0553	0,0523	0,0533	595
D		0,5383	0,5483	0,5463	0,6033	0,5263	0,4673	0,4603	0,0543	0,0493	0,0503	0,0413	595
E		0,4993	0,5723	0,5543	0,5513	0,5293	0,4853	0,4943	0,0453	0,0543	0,0493	0,0563	595
F		0,5083	0,5183	0,5473	0,5843	0,5193	0,4983	0,4283	0,0503	0,0413	0,0633	0,0533	595
G		0,4933	0,5053	0,4963	0,4913	0,4763	0,4703	0,3913	0,0423	0,0423	0,0673	0,0373	595
H													595

Taula VII. Taula calculada a partir de Taula VI, percentatges de viabilitat cel·lular. Aquests s'han obtingut dividint la mitjana del valor de cada pou entre la mitjana dels valors del seu control, en aquest cas, les cèl·lules soles. La fila "Mean" és la mitjana dels sis pous i la fila "SD" és la desviació estàndard dels 6 pous. (Experiment de viabilitat cel·lular amb nanopartícules complexades amb miRNA control).

AB.N235 DY:NP 50 nm	Mock	Dy	1:0,4	1:0,67	1:1	1:1,5	1:2,5	1:5	1:7,5	1:10	1:20
A											
B	94,82	93,66	101,58	100,80	98,68	81,70	83,82	8,36	7,59	12,61	9,13
C	111,61	103,51	112,00	102,35	95,98	101,38	86,72	10,29	10,68	10,10	10,29
D	103,89	105,82	105,44	116,44	101,58	90,19	88,84	10,49	9,52	9,71	7,98
E	96,37	110,45	106,98	106,40	102,16	93,66	95,40	8,75	10,49	9,52	10,87
F	98,10	100,03	105,63	112,77	100,23	96,17	82,66	9,71	7,98	12,22	10,29
G	95,21	97,52	95,79	94,82	91,93	90,77	75,52	8,17	8,17	12,99	7,20
Mean	100	101,833	104,567	105,597	98,424	92,313	85,494	9,296	9,070	11,193	9,296
SD	6,581	6,026	5,458	7,990	3,882	6,611	6,649	1,002	1,341	1,580	1,457

ANNEX 3

Taula VIII. Dades obtingudes una vegada hem introduït la placa a l'espectrofotòmetre. Indica l'absorbància de les cèl·lules. Cada casella de la taula correspon a una pou de la placa on s'ha realitzat l'experiment. Els nombres que estan fora de la taula, 595, és la longitud d'ona amb la qual ha llegit l'espectrofotòmetre l'absorbància del cristall violeta de les cèl·lules, 595 nm. (Assaig de proliferació).

miRNA.NP Prolif	Lipofectamine			Ratio miRNA:NP miRNA:NP 1:1,5		Ratio miRNA:NP miRNA:NP 1:1		Ratio miRNA:NP miRNA:NP 1:0,4					
	1	Cells	CT (Dy)	miRNA-X	CT	miRNA-X	CT	miRNA-X	CT	miRNA-X			
A	0,054	0,059	0,059	0,053	0,059	0,06	0,061	0,055	0,059	0,06	0,054	0,054	595
B	0,105	1,857	1,421	0,722	1,384	0,977	1,65	0,974	1,636	1,146	0,093	0,093	595
C	0,1	1,812	1,356	0,806	1,392	0,832	1,536	1,006	1,769	1,194	0,088	0,088	595
D	0,102	1,872	1,172	0,842	1,441	0,93	1,424	0,999	1,705	1,077	0,094	0,094	595
E	0,103	1,877	1,551	0,828	1,299	0,958	1,647	1,03	1,54	1,143	0,091	0,091	595
F	0,097	1,887	1,278	0,816	1,435	0,961	1,402	1,126	1,603	1,278	0,096	0,096	595
G	0,118	2,063	1,199	0,739	1,573	0,863	1,527	1,161	1,757	1,21	0,089	0,089	595
H	0,058	0,058	0,057	0,072	0,062	0,059	0,069	0,052	0,063	0,071	0,065	0,065	595

miRNA.NP Prolif	Lipofectamine			miRNA:NP 1:1,5		miRNA:NP 1:1		miRNA:NP 1:0,4					
	1	Cells	CT (Dy)	miRNA-X	CT	miRNA-X	CT	miRNA-X	CT	miRNA-X			
A													595
B		1,77	1,334	0,635	1,297	0,89	1,563	0,887	1,549	1,059			595
C		1,725	1,269	0,719	1,305	0,745	1,449	0,919	1,682	1,107			595
D		1,785	1,085	0,755	1,354	0,843	1,337	0,912	1,618	0,99			595
E		1,79	1,464	0,741	1,212	0,871	1,56	0,943	1,453	1,056			595
F		1,8	1,191	0,729	1,348	0,874	1,315	1,039	1,516	1,191			595
G		1,976	1,112	0,652	1,486	0,776	1,44	1,074	1,67	1,123			595

H												
----------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Taula IX. Taula calculada a partir de Taula VIII, en què les dades de l'absorbància de les cèl·lules menys la mitjana de l'absorbància de l'àcid acètic sol, que és de 0,0877. Les caselles de la taula que estan en blanc és perquè en aquells pous no s'hi ha posat cèl·lules, sinó que només s'hi ha posat medi. (Assaig de proliferació).

Taula X. Taula calculada a partir de Taula IX, percentatges de proliferació respecte cada control. Aquests s'han obtingut dividint la mitjana del valor de cada pou entre la mitjana dels valors del seu respectiu control. La fila "Mean" és la mitjana dels sis pous, la fila "SD" és la desviació estàndard dels 6 pous i la fila "t-test" és l'anàlisi estadístic per saber si és estadísticament significativa la diferència entre els 6 valors del control versus els 6 del miRNA que estem validant. (Assaig de proliferació). Valors del T-test ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$)

vs cada CT	1	Lipofectamine			miRNA:NP 1:1,5		miRNA:NP 1:1		miRNA:NP 1:0,4			
		Cells	CT (Dy)	miRNA-X	CT	miRNA-X	CT	miRNA-X	CT	miRNA-X		
A												
B		97,916	107,364	51,107	97,251	66,733	108,241	61,427	97,955	66,969		
C		95,427	102,133	57,867	97,851	55,861	100,346	63,643	106,366	70,004		
D		98,746	87,324	60,765	101,525	63,209	92,590	63,158	102,319	62,605		
E		99,023	117,827	59,638	90,877	65,309	108,033	65,305	91,884	66,779		
F		99,576	95,855	58,672	101,075	65,534	91,066	71,953	95,868	75,316		
G		109,312	89,497	52,475	111,422	58,185	99,723	74,377	105,607	71,016		
Mean		100	100	56,754	100	62,4719	100	66,6436	100	68,7816		
SD		4,7891	11,5304	3,9881	6,7727	4,4317	7,3124	5,2565	5,7350	4,3504		
t-test		1	1	5,7E-06	1	4,9E-07	1	3,8E-06	1	9,1E-07		

Taula XI. Taula calculada a partir de Taula IX, percentatges de proliferació respecte les cèl·lules sense tractar. Aquests s'han obtingut dividint la mitjana del valor de cada pou entre la mitjana dels valors de les cèl·lules. La fila "Mean" és la mitjana dels sis pous, la fila "SD" és la desviació estàndard dels 6 pous i la fila "t-test" és l'anàlisi estadístic per saber si és estadísticament significativa la diferència entre els 6 valors del control versus els 6 del miRNA que estem validant. (Assaig de proliferació). Valors del T-test ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$)

vs cells	Lipofectamine			miRNA:NP 1:1,5		miRNA:NP 1:1		miRNA:NP 1:0,4			
	1	Cells	CT (Dy)	miRNA-X	CT	miRNA-X	CT	miRNA-X	CT		
A											
B		97,916	73,797	35,128	71,750	49,235	86,465	49,069	85,691	58,584	
C		95,427	70,201	39,775	72,193	41,213	80,159	50,839	93,048	61,239	
D		98,746	60,022	41,767	74,903	46,635	73,963	50,452	89,508	54,767	
E		99,023	80,988	40,992	67,048	48,184	86,299	52,167	80,380	58,418	
F		99,576	65,886	40,328	74,571	48,350	72,746	57,477	83,865	65,886	
G		109,312	61,516	36,069	82,205	42,928	79,661	59,414	92,384	62,124	
Mean		100	68,7350	39,0098	73,7784	46,0907	79,8820	53,2362	87,4793	60,1696	
SD		4,7891	7,9255	2,7412	4,9968	3,2697	5,8413	4,1990	5,0170	3,8057	
t-test		1	1	5,7E-06	1	4,9E-07	1	3,8E-06	1	9,1E-07	