

EL SECRET DE LA MEDICINA ONCOLÒGICA AMAGAT EN EL NANOMÓN

Treball de Recerca (TdR)

Walt Feynman

2019

ABSTRACT

El càncer és la segona causa de mort a escala mundial el 2018, i porta essent una malaltia molt rellevant des de fa molts anys. És així que ha estat present tant en món del cinema, amb pel·lícules com *The Fault in Our Stars* (2012), *The Bucket List* (2007), etc. com en el món científic, en el qual s'ha estat intentant curar-lo. Tot i això, ni en les pel·lícules ni en l'actualitat els tractaments contra el càncer semblen ser molt efectius per arribar a curar definitivament els pacients -en aquest treball veurem com la majoria només poden "suavitzar" les seves conseqüències-. Així, el secret d'aquesta cura segueix sent un gran enigma. Però és possible que la clau d'aquest misteri sigui tan petita que no la puguem veure? Tot i que en aquesta recerca no s'arribarà a respondre aquesta pregunta, es treballarà a una escala nanomètrica per tal d'estudiar uns robots molt petits que, en un futur, podrien arribar a ser la solució al càncer; per tal d'arribar a conèixer millor la **nanomedicina oncològica**.

Cancer is the second leading cause of death worldwide in 2018 and has been a very important disease for many years. It has been present as in the world of cinema, with films such as *The Fault in Our Stars* (2012), *The Bucket List* (2007), etc. as in the scientific world, in which scientists have been trying to find a cure. Unfortunately, neither in the movies nor at present cancer treatments seem to be very effective in getting to cure the patients definitively -in this paper we will see how most of them can only "soften" their consequences. Thus, the secret of this cure remains a great riddle. But is it possible that the clue of this mystery is so small that we cannot see it? Although this question will not be answered in this research, I will work on a nanometric scale to study very small robots that, in the future, may become the solution to cancer; in order to get to know better **oncology nanomedicine**.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	7
1.1. LA NANOMEDICINA ONCOLÒGICA	7
1.2. MOTIVACIÓ PERSONAL	7
1.3. OBJECTIUS	8
1.4. METODOLOGIA I PLANIFICACIÓ	9
1.5. RELLEVÀNCIA CIENTÍFICA	9
2. RECERCA	10
2.1. CÀNCER	10
2.1.1. QUÈ ÉS EL CÀNCER?	10
2.1.1.1. Diferències entre les cèl·lules canceroses i les sanes	10
2.1.2. CAUSES DEL CÀNCER	11
2.1.3. TIPUS DE CÀNCER	13
2.1.4. EL CÀNCER DE BUFETA	14
2.1.4.1. Què és?	14
2.1.4.2. Estadístiques	15
2.1.4.3. Factors de risc	17
2.1.4.4. Estadis del càncer de bufeta	17
2.1.4.5. Tractaments actuals	19
2.2. NANOMEDICINA ONCOLÒGICA	22
2.2.1. EL NANOMÓN. LA NANOCIÈNCIA I LA NANOTECNOLOGIA	22
2.2.2. ADMINISTRACIÓ DIRIGIDA DE FÀRMACS	24
2.2.3. NANOPARTÍCULES (NPs)	25
2.2.3.1. Nanopartícules orgàniques	25
2.2.3.2. Nanopartícules inorgàniques	26
3. NANOEXPERIMENTATION	27
3.1. INTRODUCTION	27
3.1.1. IBEC'S LAB EQUIPMENT	27
3.2. PROCEDURE AND DATA	31
3.2.1. MESOPOROUS SILICA NANOPARTICLES (MSNP) FABRICATION	31
3.2.1.1. Synthesis	33

3.2.1.2.	APTES functionalisation	37
3.2.1.3.	Functionalisation with urease, urease-cy3 enzymes & PEG	38
3.2.2.	CHARACTERISATION OF THE PARTICLES	42
3.2.2.1.	Zeta Potential	44
3.2.2.2.	Radius	45
3.2.3.	CELL ASSAYS	46
3.2.3.1.	Cell culture	46
3.2.3.2.	Medium change	47
3.2.3.3.	Prepare the particles	48
3.2.3.4.	Join particles with cells	49
3.2.3.5.	Observation of the results	50
3.2.4.	MICROFLUIDIC CHIPS	61
4.	CONCLUSIONS	64
5.	GLOSSARI	66
5.1.	TERMES ONCOLÒGICS	66
5.2.	SCIENTIFIC TERMS – TERMES CIENTÍFICS	66
6.	BIBLIOGRAFIA	67
6.1.	PÀGINES WEB	67
6.2.	ARTICLES	68
6.3.	LLIBRES	68
7.	ANNEXOS	69
7.1.	ANNEX 1. L'INSTITUT DE BIOENGINYERIA DE CATALUNYA (IBEC)	69
7.2.	ANNEX 2. ENTREVISTA AL DR. JORDI RUBIÓ	70

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La nanomedicina oncològica

Molts científics, com Albert Einstein, Isaac Newton, Charles Darwin, Benjamin Franklin, Marie Curie, Gregor Mendel, etc. són mundialment coneguts per l'interès que han tingut per descobrir les lleis d'aquest planeta. D'altres, igualment coneguts, com Galileo Galilei, Nicolau Copèrnic, Johannes Kepler, etc. ho són pels seus estudis i teories sobre temes d'escala molt més gran com ho és l'univers.

En canvi, són menys els que es coneixen per estudiar aspectes més petits com la cèl·lula: James Watson, Francis Crick, ..., i veiem que van disminuint a mesura que el nombre de zeros que hi ha al darrere de la coma va augmentant.

No obstant això, els avenços i descobriments que s'han realitzat amb el prefix *nano-*, que prové del grec *vávoç*, significa 'nan' i s'usa per indicar un factor de 10^{-9} , no són pas proporcionals a la mida amb què es treballa ni amb la fama mundial. A més a més, cada cop són més les ciències i els estudis que adquireixen aquest prefix.

Precisament en aquest treball, es tractaran camps d'estudi com la biotecnologia, del que s'ha desenvolupat la nanotecnologia i la nanomedicina, tots tres, camps relativament nous en el món científic. Cal dir que el que predominarà en aquest estudi serà concretament la [nanomedicina aplicada al càncer o oncològica](#) que, explicada a l'engròs, podem dir que és l'estudi de mètodes més eficaços i segurs que les teràpies de càncer convencionals i que usen el recurs de la nanotecnologia, és a dir, l'ús de petits vehicles l'objectiu dels quals és alliberar el fàrmac específic directament a la cèl·lula o cèl·lules canceroses, sense afectar així a cap altra que no ho sigui.

1.2. Motivació personal

Per a la gent indecisa és molt difícil escollir entre dos o més aspectes, i encara que no ho pugui semblar això ha tingut una gran influència en mi i en com m'he acabat interessant pel tema d'aquesta recerca. M'explico: des de ben petit que he estat molt interessat pels nous invents tecnològics, com els *smartphones* i tota mena de gadgets. Més endavant,

durant l'etapa de l'ESO, vaig començar a descobrir el món de la biologia, i em va resultar un camp molt interessant. Així, en el batxillerat m'he hagut de decidir entre una de les dues assignatures optatives. Aquesta decisió em va ser difícil, però les tot es va simplificar quan vaig descobrir l'ampli i apassionant món de la biotecnologia. Un cop m'hi vaig endinsar, vaig descobrir l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), i dins d'aquest, un grup d'investigació que estudia com tractar el càncer a una escala microscòpica. Aquest tema em va resultar molt interessant, doncs el càncer és una malaltia de gran importància avui dia i de la qual he sentit molt a parlar i, fins i tot, he vist patir.

Així doncs, vaig poder posar-me en contacte amb l'IBEC i vaig poder anar a fer-hi una visita. Allà vaig observar de primera mà com es fa una recerca en un centre de tal importància. D'aquesta manera el meu interès cap a la biotecnologia i la nanotecnologia es va incrementar exponencialment, i vaig decidir fer jo també una mica de recerca. Aquest és el resultat de la meva investigació.

1.3. Objectius

Un cop interessat pel tema de la nanomedicina, vaig decidir que el propòsit de la meva recerca seria estudiar si les nanopartícules es dirigeixen cap a les cèl·lules canceroses de bufeta depenent de si hi ha presència de fuel i/o anticòs; un objectiu purament experimental per tal de comprovar l'eficàcia d'aquests futurs nanofàrmacs.

La meva hipòtesi és que és molt més fàcil que qualsevol vehicle arribi al seu destí si hi ha combustible i sap on ha d'anar. Per tant, les nanopartícules que tinguin fuel i anticòs arribaran més fàcilment a les cèl·lules que les que no tenen ni una cosa ni l'altra o les dues.

D'altra banda, la complexitat del tema d'aquest treball també em condueix a formular més objectius que s'aniran complint mentre es realitza el treball:

- Adquirir cert coneixement sobre el càncer i sobre els seus tractaments actuals.
- Adquirir coneixements necessaris sobre la el món de la nanomedicina i sobre l'equipament de l'IBEC per a realitzar el treball de laboratori.
- Aprendre a fer funcionar els programes informàtics amb els quals extrauré les dades de les caracteritzacions de les nanopartícules i les fotos dels resultats.

1.4. Metodologia i Planificació

Per tal d'organitzar bé totes les dades que es recolliran en el transcurs de la recerca, he decidit organitzar-les en dos grans apartats:

El primer recollirà la part més teòrica del treball, on s'explicarà tot allò relatiu al tema escollit, ja que per una persona que no el coneix pot resultar complicat. Així doncs, en aquesta part es parlarà del càncer i la nanomedicina i tot allò que hi té a veure.

La segona part recollirà el treball que realitzaré al laboratori de l'IBEC, on comprovaré si la meva hipòtesi és certa i n'extrauré unes conclusions. Aquesta part estarà redactada en anglès, idioma més utilitzat durant l'estada als laboratoris per dur a terme els experiments.

A més, he dissenyat un petit calendari de planificació on he resumit què es realitzarà a cada mes.

Fig. 1 Calendari

MESOS	TASQUES		
Febrer - maig	Ecollir el tema		Recerca sobre el tema
Juny	Escriure la introducció		Fer recerca de la part teòrica
Juliol	Realitzar l'estudi al laboratori	Anotar dades part pràctica	Completar i ampliar informació teòrica
Agost	Anotar resultats i conclusions	Revisió	Presentació

Tot i això, aquest calendari no s'ha pogut seguir completament, ja que la feina que ha portat aquest treball ha sigut més de l'esperada i les dates límit també han canviat al llarg del curs.

1.5. Rellevància científica

L'emergent camp de la nanomedicina aplicada al càncer podria arribar a ser molt rellevant en uns anys, ja que el seu principal objectiu és proporcionar un tractament igual o més efectiu que els actuals, disminuint també els efectes adversos o riscos del tractament. Així, un avenç a una escala tan petita podrà resultar una enorme revolució.

2. RECERCA

2.1. Càncer

2.1.1. Què és el càncer?

Totes les cèl·lules del nostre organisme segueixen un cicle vital anomenat cicle cel·lular en el qual aquestes creixen i es divideixen per formar-ne de noves, i finalment moren per l'envelliment cel·lular. Però a vegades, algunes cèl·lules, a causa de certs factors, no segueixen aquest cicle i comencen a dividir-se amb un gran descontrol, produint així el que es coneix com un tumor. El que passarà un cop el tumor s'hagi format definirà si podrem etiquetar al tumor com a càncer:

En el cas que el tumor estigui localitzat i les cèl·lules no es divideixin indefinidament, estaríem parlant d'un **tumor benigne**, que generalment sol ser fàcil d'extirpar.

El "problema" ens el trobem quan el tumor creix indefinidament envaint i destruint altres teixits de l'organisme. Així, rebria el nom de **tumor maligne** o **càncer**.

A més, en cas que les cèl·lules arribin a algun vas sanguini, el tumor es podria disseminar per la sang i arribar a desenvolupar-se a d'altres parts del cos, procés anomenat **metàstasi**.

2.1.1.1. Diferències entre les cèl·lules canceroses i les sanes

Hi ha diverses característiques que diferencien les cèl·lules canceroses de les que no ho són.

Per començar, recordem que la primera diferència, que ja hem comentat anteriorment, és que les cèl·lules canceroses es divideixen amb més velocitat que les normals i tenen un caràcter molt invasiu, és a dir, una important tendència a envair teixits propers.

Les cèl·lules canceroses també tenen la capacitat d'influir al microambient, és a dir, al conjunt de cèl·lules normals, vasos sanguinis, etc. alimentant així a les cèl·lules del tumor.

Una altra diferència important és que les cèl·lules malignes són menys especialitzades. Així doncs, mentre que les cèl·lules sanes adopten una forma i una funció especialitzada

segons el lloc on es trobin, les canceroses no ho fan, cosa que comporta que es puguin dividir amb més facilitat i a qualsevol lloc.

Les cèl·lules tumorals també tenen la capacitat d'evadir els senyals que s'envien o bé per tal que les cèl·lules deixin de dividir-se o, d'altra banda, per induir el procés de mort cel·lular anomenat apoptosi. D'aquesta manera, les cèl·lules segueixen afectant l'organisme malgrat aquests senyals.

Estructuralment, les cèl·lules canceroses també són diferents. A part de la forma, que ja hem comentat anteriorment que és diferent ja que aquestes no s'arriben a especialitzar del tot, també tenen unes proteïnes de membrana diferents. Així, les proteïnes de membrana encarregades de rebre [hormones mitògenes \[1\]](#) són diferents, factor que pot estar relacionat amb la seva divisió constant.

Altres molècules de membrana diferents i que cal destacar són els [antígens \[2\]](#) tumorals de les cèl·lules canceroses, que determinen la posada en marxa del sistema immunitari de l'organisme. Així, es creu que les cèl·lules canceroses tenen la capacitat de modular la presència dels antígens davant els [anticossos \[3\]](#) i així no ser reconegudes com a organismes estranys, evadint el sistema immunitari. Així doncs, aquestes cèl·lules són capaces de passar desapercebudes i prosseguir amb el creixement del tumor.

2.1.2. Causes del càncer

El pas que fa una cèl·lula normal per convertir-se en una de cancerosa s'anomena transformació cancerosa o neoplàstica, i consisteix en l'alteració d'un o més canvis en els gens d'aquesta. Així, podem classificar el càncer com una malaltia genètica.

Aquests canvis són errors que es cometen quan el DNA de la cèl·lula es multiplica. El procés de duplicació no és sempre exacte, a vegades es cometen errors i, malgrat diferents sistemes de correcció de tals errors, es calcula que es produeix un error cada 10 milions de [bases nitrogenades \[4\]](#) que es dupliquen. La mutació, error o canvi de les bases que corresponen a un dels gens encarregats de controlar el cicle cel·lular, és la que causa el càncer, ja que condueixen a la proliferació no regulada de les cèl·lules.

[1] Veure Glossari núm. 5

[2] Veure Glossari núm. 2

[3] Veure Glossari núm. 1

[4] Veure Glossari núm. 3

Es coneixen dos tipus de gens que, quan muten, donen lloc a una cèl·lula cancerosa. Un d'ells són els protooncogens, gens que codifiquen per proteïnes que activen el creixement i divisió cel·lular ordinària. Una mutació en aquest tipus de gens els transformaria en oncògens, gens que activen una divisió cel·lular anormal que no cessa. L'altre tipus són els gens supressors, que s'encarreguen de codificar proteïnes per inhibir la divisió cel·lular. Una mutació en aquests gens faria que no fossin capaços de realitzar la seva funció i no es podria aturar la divisió cel·lular. No obstant això, generalment és necessària més d'una mutació per a produir tots els canvis que constituïrien una cèl·lula cancerosa. Així, factors com l'edat influiria en les probabilitats de tenir càncer, ja que com més anys passin, més acumulacions de mutacions pots arribar a tenir. És possible que algun d'aquests gens mutants s'hagi heretat si s'han produït en una cèl·lula reproductora, afegint també més probabilitats de desenvolupar un tumor.

D'altra banda, aquestes mutacions, a part de la possibilitat de ser provocades sense cap motiu aparent, també poden ser provocades per factors externs, que augmentarien les probabilitats de patir càncer. Per exemple, amb l'exposició a substàncies cancerígenes que malmeten el DNA, com certes substàncies químiques. Aquestes podrien ser les que hi ha en el fum del tabac o en els aliments massa cuinats o cremats, alguns conservants i edulcorants artificials, o la radiació, com els rajos ultraviolats del sol, els rajos nuclears, etcètera. A més, el càncer també pot arribar a ser produït per virus. Aquests són anomenats virus oncogènics, i tenen un o més gens, com els oncogens, capaços de produir la transformació cancerosa.

Així doncs, no tots els factors que condicionen el fet de tenir càncer es poden evitar, però sí alguns d'ells. Els factors de risc evitables més coneguts serien l'alcohol, no seguir una bona dieta, alguns gèrmens infecciosos, la llum solar, l'obesitat, la radiació, el tabac i d'altres substàncies canceroses de l'ambient; i altres que no es poden o són difícil d'evitar però cal conèixer, com l'envelliment, les hormones, la inflamació crònica, la immunosupressió, etc.

2.1.3. Tipus de càncer

Hi ha més de cent tipus diferents de càncer. Aquests se solen identificar segons el primer òrgan afectat. En el cas que llavors es produís una metàstasi a una altra part del cos, el nou tumor tindria el mateix tipus de cèl·lules que el tumor on s'hagués iniciat (tumor *primari*). Per tant, seguiria tenint el mateix nom amb l'afegit del lloc de la metàstasi.

No obstant això, hi ha unes categories principals que es diferencien segons els tipus específics de cèl·lules afectades, i que són les que segueixen.

El **carcinoma** és un dels tipus més comuns de càncer. Aquest s'inicia a les cèl·lules epitelials de la pell o als teixits que envolten els òrgans interns.

El **sarcoma** és el càncer que comença en els ossos, els cartílags, el teixit adipós (greix), els músculs, els vasos sanguinis o en altres teixits connectius o de suport com tendons i lligaments.

La **leucèmia** s'inicia en el teixit que forma les cèl·lules sanguínies, la medul·la òssia. Aquest tipus de càncer no genera tumors molt sòlids, sinó que genera un gran nombre de glòbuls blancs anormals que s'acumulen a la sang i desplacen els glòbuls normals de la sang. Una concertació baixa d'aquests provoca un entorpiment en la distribució d'oxigen a la resta de cèl·lules del cos i que no es puguin controlar les hemorràgies ni combatre les infeccions.

El **limfoma** comença en els limfòcits, els glòbuls blancs de la sang que formen part del sistema immunològic que combat les malalties. Aquests glòbuls anormals s'acumulen a les vies i **ganglis limfàtics** [5] i altres òrgans del cos.

El **mieloma** comença en les cèl·lules plasmàtiques, que són un altre tipus de cèl·lules del **sistema immunitari** [6]. Aquestes cèl·lules plasmàtiques anormals o cèl·lules del mieloma s'acumulen a la medul·la òssia i es formen tumors en els ossos d'arreu del cos.

El **melanoma** és un càncer que comença a les cèl·lules encarregades de produir melanina, el pigment que dóna color a la pell. Així, a la majoria de casos, aquest càncer es forma a la pell, tot i que també es pot donar a d'altres teixits com el dels ulls.

[5] Veure Glossari núm. 4

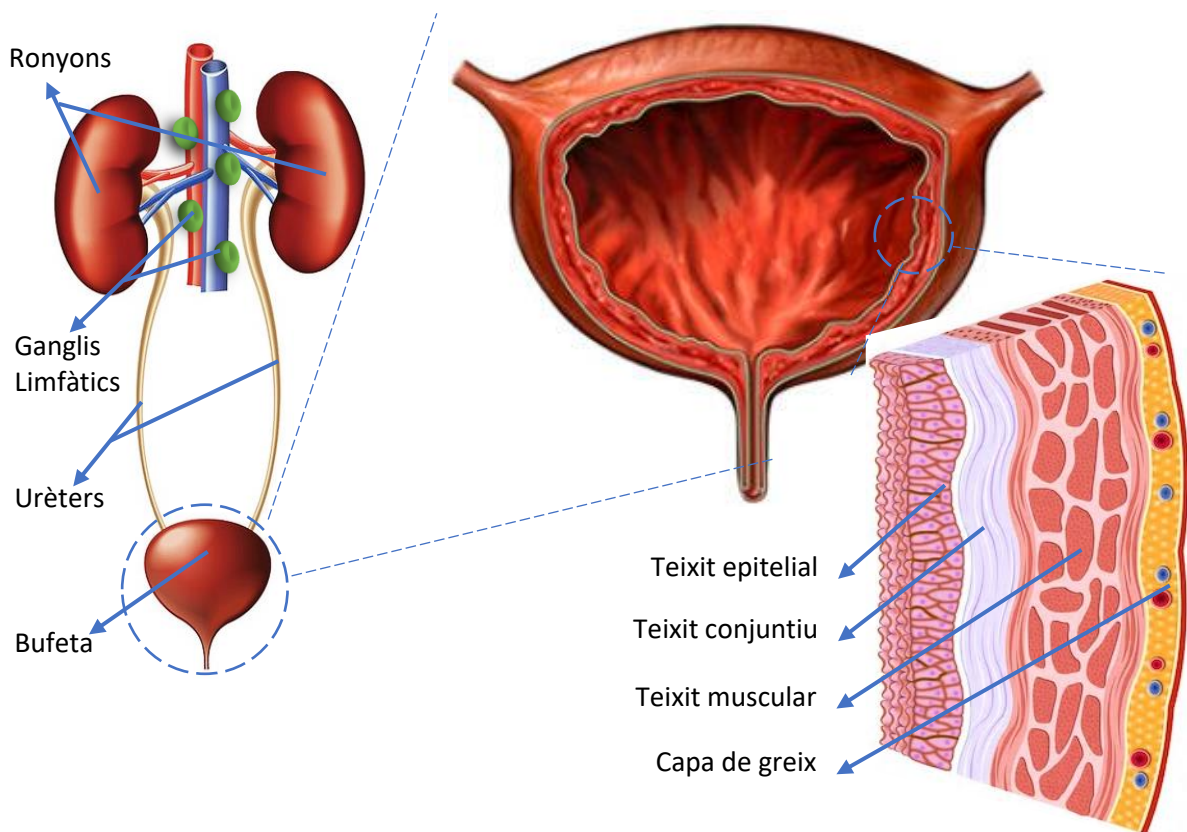
[6] Veure Glossari núm. 6

2.1.4. El càncer de bufeta

2.1.4.1. Què és?

La bufeta és un òrgan que forma part de l'aparell urinari i s'encarrega d'emmagatzemar l'orina fins a la seva expulsió a través de la uretra. Aquest òrgan amb forma de globus es troba a la part inferior de la pelvis, i la seva paret està formada per diverses capes: el teixit epitelial, el teixit conjuntiu, el teixit muscular i la capa de greix que revesteix la bufeta.

Fig. 2 Bufeta urinària



[font: photos.com, shutterstock.com, elconfidencial.com, pròpia]

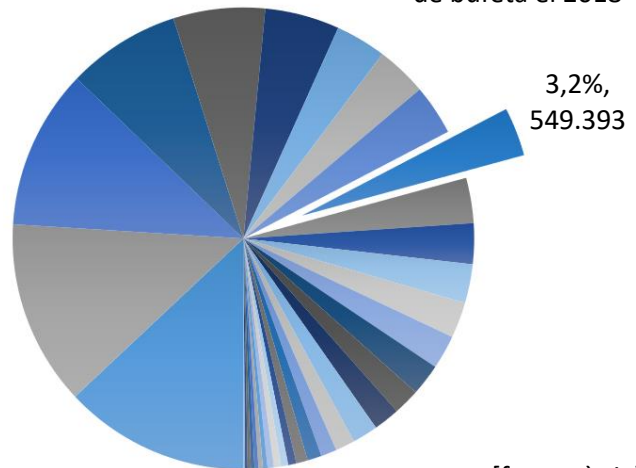
El càncer de bufeta s'origina quan les cèl·lules que formen la bufeta urinària comencen a créixer i dividir-se de forma descontrolada. El tipus més comú del càncer de bufeta és el carcinoma urotelial o carcinoma de cèl·lules de transició (TCC). Aquest càncer és originat a les cèl·lules del teixit epitelial que recobreixen l'interior de la bufeta o a les cèl·lules que revesteixen les vies urinàries. Depenent del grau d'aquest càncer, el tumor pot arribar a envair la paret muscular de la bufeta fins a disseminar-se cap a altres parts del cos.

2.1.4.2. Estadístiques

«El càncer és la segona causa de mort a escala mundial. És responsable d'aproximadament unes 9,6 milions de morts el 2018, i més o menys 1 de cada 6 morts es deu a un càncer» segons la WHO (World Health Organisation) [7].

El càncer de bufeta és el sisè tipus de càncer més freqüent entre homes mundialment, amb 424.082 casos diagnosticats el 2018. Segons la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), va ser el desè càncer més freqüent arreu del món, contemplant ambdós sexes, amb 509.590 casos, representant un 3.2% entre més de 30 tipus de càncers. En el cas de les dones, no és tant comú, ja que la taxa de càncer de bufeta és més de 3 cops més baixa en dones, que ocupa el dissetè lloc amb 125.311 casos diagnosticats el mateix any 2018.

Fig. 3 Incidència global en ambdós sexes del càncer de bufeta el 2018



[font pròpia]

Segons la *American Cancer Society*, la probabilitat que un home americà pateixi aquest càncer al llarg de la seva vida és d'un entre 27, mentre que en les dones és d'una entre 89.

Fig. 4 1 home entre 27 i 1 dona entre 89 pateix càncer al llarg de la seva vida



[fonts: commons.wikimedia.org, pròpia]

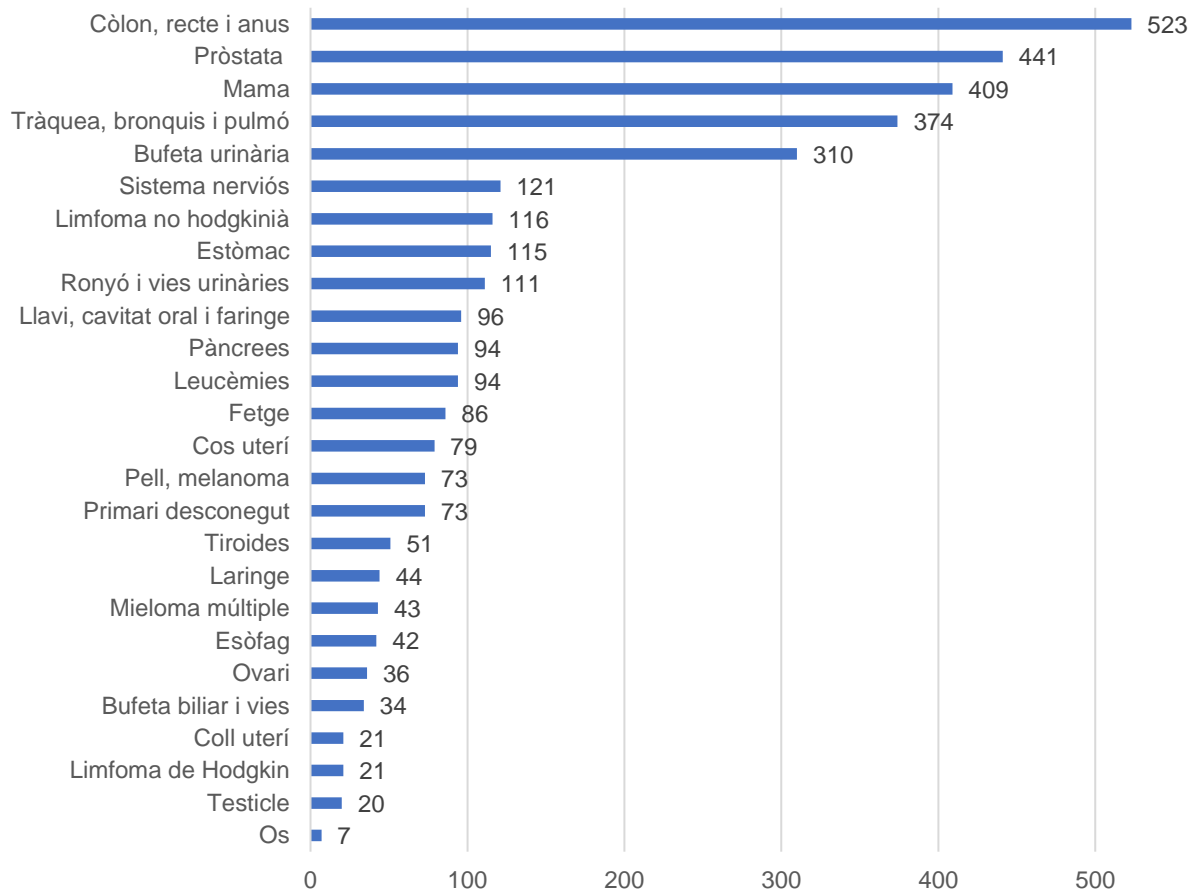
Aquest tipus de càncer és més comú entre persones d'edat avançada, amb una edat mitjana de 73 anys en els Estats Units. Un 60% dels casos de càncer de bufeta són diagnosticats en països desenvolupats com Amèrica del Nord i Europa.

[7] font: www.who.int, World Health Organisation

Pel que fa a les taxes de supervivència del càncer de bufeta, es calcula que en els Estats Units arriba a un 77.1% en totes les etapes del càncer (entre el 2009 i 2015), mentre que a Europa és d'un 68%.

A Girona el càncer de bufeta és encara més freqüent que quan ho comparem mundialment. Segons dades recollides entre el 2010 i el 2012 per l'ICO, la Unitat d'Epidemiologia i el Registre de Càncer de Girona (UERCG) i el Pla Director d'Oncologia (PDO), el càncer de bufeta és el quart tipus de càncer més comú entre homes amb una mitjana de 262 casos anualment, mentre que és el sisè entre dones amb 48. Si observem les dades que fan referència a ambdós sexes, el trobem en el cinquè càncer més freqüent, amb 310 casos anuals.

Fig. 5 Mitjana anual de casos de càncer en homes i dones a Girona, 2010-2012



[font pròpia]

I pel que fa a la mortalitat, entre l'any 2010 i el 2012 hi ha una mitjana de 67 morts anuals pel càncer de bufeta. Així, tenint en compte que la taxa d'incidència és de 310 casos anuals, la taxa de supervivència és d'un 78,39% de pacients cada any.

2.1.4.3. Factors de risc

El consum del tabac és el factor de risc més important en el càncer de bufeta. Així és que els fumadors presenten un risc 2 cops més gran que els no fumadors, ja que les substàncies cancerígenes del tabac són transportades per la sang fins a arribar al ronyó, que les filtra i es concentren després a l'orina de la bufeta.

Un altre factor de risc rellevant és l'edat del pacient. Com ja s'ha observat a les estadístiques, és poc freqüent patir aquest càncer amb una edat inferior als 40 anys.

Seguint amb les estadístiques, també s'ha pogut veure que aquest càncer és rellevantment més comú entre homes que en el sexe contrari. Probablement és pel fet que són els homes també que presenten un consum major de tabac.

L'exposició a amines aromàtiques com la benzidina, a la que se sotmeten alguns treballadors d'indústries químiques és un altre factor de risc. Les empreses amb més risc són les tèxtils, les del cuir, del cautxú i de pintures i colorants.

Tot i que a Espanya no se'n coneixen gaires casos, una infecció crònica de la bufeta pot suposar un factor de risc a contraure el càncer. Un paràsit conegut per aquestes infeccions és l'*Schistosoma*.

Alguns agents quimioteràpics com la ciclofosfamida o la ifosfamida que s'empren en tractaments pel càncer poden incrementar el risc de patir càncer de bufeta.

També és un factor de risc el fet de tenir antecedents personals de càncer de bufeta. Aquest, incrementaria el risc de l'aparició d'un segon tumor del mateix tipus.

2.1.4.4. Estadis del càncer de bufeta

Un cop un càncer és diagnosticat, els oncòlegs realitzaran un seguit de proves per tal de saber com s'ha arribat a desenvolupar el tumor. Depenent del grau de desenvolupament del càncer, els metges es decidiran per combatre'l d'una manera o d'una altra. Així doncs, els experts han establert un seguit de fases o etapes per tal de reconèixer el progrés que han fet les cèl·lules canceroses d'un càncer.

En el cas del càncer de bufeta, el tipus de classificació que es sol utilitzar és el sistema **TNM** de l'*American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, que es basa en tres aspectes:

La lletra **T** representa el creixement del **tumor** primari. Quina quantitat de la paret de la bufeta ha arribat a ocupar o si fins i tot ha crescut a algun teixit adjacent.

Ta/TO: Quan les cèl·lules canceroses no han envaït més enllà de la membrana basal (que es troba enmig del teixit epitelial i el teixit conjuntiu).

T1: Les cèl·lules canceroses han travessat la membrana basal però no han arribat al múscul.

T2: Les cèl·lules tumorals han envaït el múscul.

T3: Les cèl·lules han arribat a la capa de greix de la bufeta però no l'envaeixen.

T4: Les cèl·lules canceroses han arribat a la capa de greix i fins i tot han envaït algun teixit d'un òrgan adjacent a la bufeta.

La lletra **N** simbolitza l'existència o no d'una propagació de les cèl·lules canceroses fins als **nòduls** o ganglis limfàtics que hi ha adjacents a la bufeta urinària.

N1: Les cèl·lules canceroses han arribat a afectar un gangli de l'aparell urinari que es troba relativament a prop de la bufeta.

N2: Les cèl·lules s'han propagat fins a més d'un gangli de la zona de la pelvis.

N3: Les cèl·lules tumorals han envaït ganglis d'altres òrgans.

La lletra **M** fa referència a la **metàstasi**, és a dir, si el càncer s'ha propagat a altres òrgans o teixits distants. Els més freqüents són els pulmons o el fetge.

M0: No s'ha produït metàstasi a distància.

M1: S'ha produït metàstasi a un òrgan extern a la bufeta.

En total, per tal de classificar totes les dades anteriors, els oncòlegs classifiquen el càncer del pacient en quatre estadis, que van des de l'Estadi I fins a l'Estadi IV.

Si un pacient es troba a l'etapa I, el tumor està evadint la capa més superficial de la bufeta, però sense envair el múscul.

En cas que estigui a l'etapa II, el tumor ja haurà envaït el múscul de la bufeta, fet que podria implicar una possibilitat que s'estengui fins a altres parts del cos, provocant així metàstasi.

A l'etapa III, el pacient es troba amb un tumor que ha envaït tot el teixit que envolta la bufeta o envaït òrgans adjacents. També haurà afectat als ganglis limfàtics.

A l'etapa IV, el tumor ja hauria envaït tota la paret de la pelvis o l'abdomen, hauria afectat als ganglis limfàtics o presentaria metàstasi a distància en altres òrgans o teixits del cos del pacient.

2.1.4.5. Tractaments actuals

Actualment, el tractament del càncer de bufeta se sol aplicar segons l'etapa del càncer que s'estigui tractant.

Fig. 6 Estadis del càncer de bufeta

ESTADI	TNM	TRACTAMENT
Estadi I	Ta - T1 N0 M0	RTU i Quimioteràpia intrevesical (dins la bufeta amb una sonda) amb medicaments com la mitomicina o BCG (bacil de Calmette-Guerin).
Estadi II	T2 - T4 N0 M0	Cistectomia, a vegades es fa Quimioteràpia (en T4). En algun T4 també es pot començar amb Quimioteràpia com a l'etapa III.
Estadi III	T1 - T4 N1 - N3 M0	Quimioteràpia primer i després, si es factible, cirurgia (a vegades cal radioteràpia si el marge no és de seguretat). Alguns estadi III es reconeixen després de la cistectomia en analitzar els ganglis i veure que estan afectats, aleshores es realitza quimioteràpia després de la cirurgia.
Estadi IV	Ta - T4 N1 - N3 M1	Quimioteràpia i Immunoteràpia.

[font: entrevista al Dr. Jordi Rubió]

2.1.4.5.1. Cirurgia

És el procediment pel qual el cirurgià estripa el tumor del cos del pacient. Aquest procediment sol consistir a tallar la pell, músculs i fins i tot ossos per tal d'extreure totes les cèl·lules canceroses.

Un tipus molt comú de cirurgia és Resecció Transuretral (RTU), que consisteix a introduir un cistoscopi (un tub allargat amb un feix de llum) a la bufeta. Amb aquest instrument, es visualitza el tumor i també l'extirpa. Aquesta és una manera de diagnosticar i tractar el càncer.

També és comú en càncers més avançats realitzar una Cistectomia, on s'extirpa tota la bufeta i fins i tot els ganglis limfàtics i òrgans propers al càncer.

RISCOS O EFECTES SECUNDARIS:

Un cop acabada l'operació, és molt probable sentir dolor on s'ha intervingut. Depenent del tipus de càncer i la intervenció pot ser més o menys sever. Tot i això, aquest es pot alleujar. La producció d'una infecció és un altre risc que hi ha després de l'operació, encara que es pot evitar.

També es poden produir altres problemes, com una hemorràgia, dany als teixits adjacents i alguna reacció a l'anestèsia.

En cas que es realitzi una Cistectomia, es pot arribar a extirpar òrgans propers a la bufeta.

2.1.4.5.2. Radioteràpia

Aquest tipus de teràpia utilitza altes dosis de radiació per destruir les cèl·lules canceroses. La radiació d'alta energia danya el DNA de les cèl·lules canceroses i així alenteix el seu creixement o moren, ja que el seu ADN està danyat i no poden seguir creixent ni dividint-se.

Així, la radioteràpia no provoca un efecte immediat, doncs per malmetre l'ADN el suficient per tal que les cèl·lules morin es requereixen més d'un dia o setmana de tractament. A més, el procés de la mort cel·lular també pot arribar a trigar dies.

RISCOS O EFECTES SECUNDARIS:

El problema de la radioteràpia és que no només danya a les cèl·lules canceroses, sinó que també danya a les cèl·lules adjacents a aquestes. Així, la radioteràpia pot causar molts efectes secundaris segons la zona afectada. La caiguda del cabell seria un efecte secundari comú en tots tipus de càncer, com canvis a la pell i el cansament.

2.1.4.5.3. Quimioteràpia

Aquest tractament s'utilitza per a remeiar tumors metastàtics. Consisteix a subministrar una sèrie de fàrmacs tòxics per a les cèl·lules que presenten un índex molt alt de divisió. Per a algunes persones, és l'últim tractament que reben, ja que produeix molts efectes secundaris.

RISCOS O EFECTES SECUNDARIS:

Com la radioteràpia, la quimioteràpia no afecta només a les cèl·lules malaltes, sinó que també bloqueja la divisió de totes les cèl·lules del cos amb un ritme elevat de divisió, com les que cobreixen la boca i els intestins o les que fan que creixi el cabell. Els efectes secundaris poden ser diversos: nàusees (per la manca de renovació de l'epiteli intestinal), pèrdua de cabells (per la mort de les cèl·lules dels fol·licles), etc.

2.1.4.5.4. Immunoteràpia

És una [teràpia biològica](#) [8] que estimula el sistema immunitari perquè pugui segregar anticossos per combatre el càncer. Hi ha diverses tècniques, la majoria de les quals ajuden al sistema immunitari a atacar directament al càncer, i d'altres a estimular-lo per augmentar els mecanismes de defensa de l'organisme. També n'hi ha que faciliten al sistema immunitari a localitzar les cèl·lules canceroses marcant-les perquè les destrueixi.

RISCOS O EFECTES SECUNDARIS:

La immunoteràpia també pot produir una sèrie d'efectes secundaris, que dependran de la salut del pacient, del tipus de càncer i com hagi avançat, del tipus de teràpia i de la dosis d'aquesta. Entre aquests, ho són el dolor, inflamacions, irritacions, alguns símptomes de la grip (febre, marejos,...), risc d'infecció, palpitations del cor, etc.

[8] Veure Glossari núm. 7

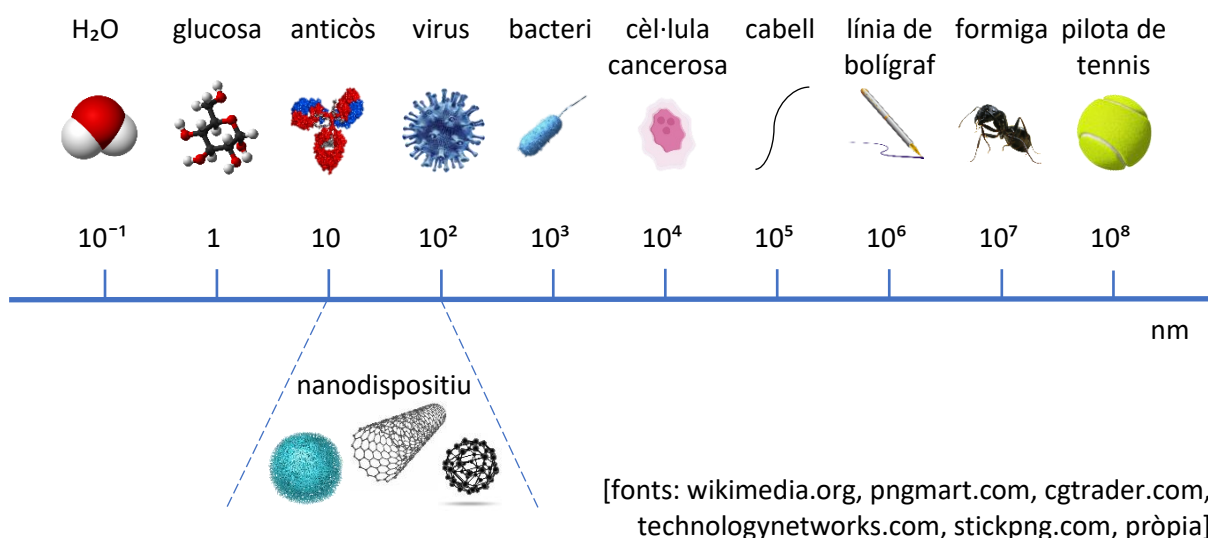
2.2. Nanomedicina oncològica

2.2.1. El nanomón. La nanociència i la nanotecnologia

Com ja s'ha esmentat anteriorment, per tal d'observar un nou món no cal anar molt lluny. De fet, no cal ni sortir de casa. Així és que, si tinguéssim la màquina reductora de la qual Isaac Asimov ens parla al seu *Viatge al·lucinant*, un clàssic de ciència-ficció de la dècada dels seixanta com els de Jules Verne, podríem observar un món completament diferent.

Per tal de fer-nos una idea del que estic parlant, ens hem d'imaginar que aquesta màquina ens comença a fer petits fins a un punt que veuríem una formiga com normalment veuríem l'Everest (en realitat, veuríem l'insecte encara més gran). Així, hauríem arribat a tenir la mida d'un nanodispositiu i estaríem contemplat la grandesa del nanomón.

Fig. 7 Escala nanomètrica



Cal dir que tenir una mida nanomètrica no et fa pas viatjar a un nou món, però m'arrisco a dir que és comparable. És un fet que, en el nanomón, les propietats de molts materials canvien. Per exemple, quan l'or passa de ser un material macroscòpic a tenir la mida d'una nanopartícula, el seu color tan característic canvia a un to blavós (si parlem d'una mida d'uns 100nm) o vermellós (en el cas que ens referim a una mida més petita encara, d'uns 10nm). I tal com les propietats d'aquest material pateixen una sèrie de canvis segons la seva mida disminueix, en el nanomón hi ha moltes més variacions de diferents propietats de múltiples nanomaterials.

Aquest canvi de comportament és degut fonamentalment a tres causes. La més obvia, però que comporta moltes conseqüències, és el fet que, en tenir una mida més petita, el material pot accedir molt més fàcilment a llocs més petits. La segona és un efecte fisicoquímic: en disminuir la mida d'un material, la seva superfície disminueix menys que el volum (per la relació que s'estableix entre la superfície i el volum d'aquest). Així, els processos químics la velocitat de reacció dels quals depenguin de la superfície del material es veuran afectats si aquest es fragmenta en nanopartícules. I la tercera raó, i la menys deduïble, és que les propietats d'un nanomaterial no segueixen la mateixa mecànica que les d'un material macroscòpic, sinó que es regeixen segons lleis de la mecànica quàntica.

Un cop dins el nanomón, cal dir que, tot i que ha existit sempre i se n'ha fet ús (els romans, per exemple, feien servir nanopartícules metàl·liques per pintar vidre que posteriorment seria utilitzat com a finestres policromes a les catedrals), no va ser fins al discurs «*there is plenty of room at the bottom*» («hi ha molt espai lliure en el fons de l'habitació», 1959) del físic americà Richard Feynman quan el món científic es va començar a interessar per estudiar aquest món. En aquesta conferència, tot i que no es va mencionar ni un sol cop cap paraula tal com nanotecnologia, nanociència o nanomón, Feynman va parlar sobre les possibilitats que podria obrir no sols l'estudi, sinó també la capacitat de comprensió i manipulació de tot allò pertinent a una escala minúscula, i que podrien ser extraordinàries.

Així, va ser el professor N. Taniguchi de la Universitat de Ciència de Tokio qui va fer la primera menció a la paraula "nanotecnologia" en un article titulat «*On the Basic Concept of "Nanotechnology"*» el 1974. En aquest, es va presentar la nanotecnologia no com la creació de robots prou petits com per viatjar per llocs com les artèries, ni tampoc com la creació de màquines per reduir qualsevol material a una mida minúscula, sinó que la va descriure com "la tecnologia que ens permetria separar, consolidar i deformar materials àtom a àtom o molècula a molècula".

Tot i això, el seu significat ha canviat una mica. Per explicar-lo, cal abans establir la diferència entre la ciència i la tecnologia. La primera és l'estudi i coneixement del món i del comportament de coses naturals mitjançant un mètode científic. En canvi, la tecnologia és l'aplicació del coneixement científic per propòsits pràctics o industrials.

Així, podríem dir resumidament que la nanociència és l'estudi dels nanomaterials i les seves característiques mentre que la nanotecnologia és l'ús d'aquests materials i propietats per crear quelcom nou o diferent. Per tant, i malgrat el seu significat, aquest camp d'estudi abasta molt més del que sembla (ciència, tecnologia, química, física, enginyeria, biologia, etc.), i una d'aquestes branques és la nanomedicina.

Segons la revista *Nature*, «la nanomedicina és una branca de la medicina la qual aplica el coneixement i les eines de la nanotecnologia a la prevenció i el tractament de les malalties. La nanomedicina implica l'ús de materials nanomètrics, com nanopartícules biocompatibles i nanorobots per a propòsits de diagnòstic, lliurament, detecció o actuació en un organisme viu» [9].

2.2.2. Administració dirigida de fàrmacs

Un paper que la nanomedicina pot arribar a jugar molt bé és, no només el de diagnosticar, sinó també el d'arribar a combatre el càncer, ja que les dimensions amb què comptem quan parlem d'aquest tipus de medicina són molt favorables per tal d'arribar a eliminar selectivament només les cèl·lules canceroses.

Actualment, es calcula que tan sols un 0,7% de cada fàrmac que ens subministrem és realment efectiu en la part afectada del nostre cos. És a dir, un 99,3% del fàrmac mai acaba realitzant la funció pel qual ha estat dissenyat. Així, un objectiu de la nanomedicina és el transport de fàrmacs a través de nanopartícules per tal d'incrementar aquest percentatge.

Aquest increment pot arribar a existir gràcies a les propietats de les nanopartícules, que són, entre d'altres, la seva mida nanomètrica, la capacitat de poder dirigir-se cap a la zona afectada i la capacitat de realitzar aquesta mateixa selecció, la seva mateixa autopropulsió, etcètera.

Amb tot, ja hi ha alguna nanomedicina pel càncer aprovada clínicament. De fet, n'hi ha 2, Doxil® i Abraxane®, que ja s'han comercialitzat. No obstant això, i encara que aconseguen reduir els efectes adversos dels tractaments tradicionals, per arribar a notar una diferència considerable es necessita encara un temps més llarg d'estudi.

[9] font: www.nature.com, Nature

2.2.3. Nanopartícules (NPs)

Les nanopartícules són els vehicles encarregats de transportar el fàrmac fins a la part del cos desitjada i, un cop allà, alliberar-lo. Tot i que l'objectiu és únic, existeixen diferents tipus de nanopartícules. Es diferencien per la forma, material, estructura, propietats fisicoquímiques, etcètera. Normalment, se solen classificar en orgàniques o inorgàniques, i les més conegudes amb objectius nanomèdics i oncològics són les següents:

2.2.3.1. Nanopartícules orgàniques

2.2.3.1.1. Nanopartícules polimèriques

Aquestes partícules solen tenir una forma esfèrica, i estan compostes per polímers sintètics, que són macromolècules formades artificialment per un o més monòmers iguals. Aquest fet permet una personalització de diferents propietats, com el pes molecular, la biodegradabilitat, hidrofobicitat, etcètera. A més, diferents mètodes que s'han estudiat per sintetitzar-les han permès desenvolupar un bon sistema per encapsular eficientment el fàrmac.

Fig. 8 Nanopartícula polimèrica

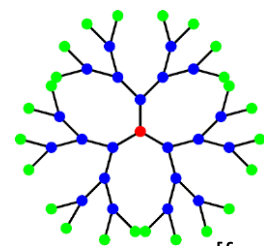


[font: precisionnanosystems.com]

2.2.3.1.2. Nanopartícules dendrímèriques

Aquestes són partícules formades per dendrímers, que són macromolècules esfèriques que presenten una estructura ramificada formada per un nucli i múltiples branques. Aquesta estructura molecular permet portar diferents fàrmacs.

Fig. 9 Dendrimer

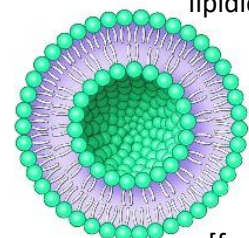


[font: liberaldictionary.com]

2.2.3.1.3. Nanopartícules lipídiques

Són nanopartícules esfèriques amb una estructura de bicapa lipídica. Aquesta estructura permet encapsular molt fàcilment el fàrmac a l'interior de la nanopartícula.

Fig. 10 Nanopartícula lipídica



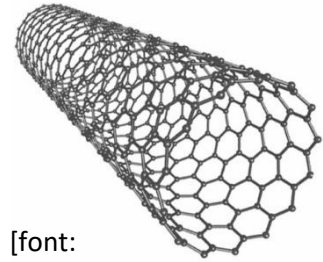
[font: spacanada.ca]

2.2.3.2. Nanopartícules inorgàniques

2.2.3.2.1. Nanotubs de carboni

Els nanotubs de carboni tenen una forma tubular i una estructura formada per làmines de grafit. Aquesta estructura aporta una resistència molt major a la de l'acer. També presenten superfície específica que permet transportar una gran varietat de molècules terapèutiques.

Fig. 11 Nanotub de carboni

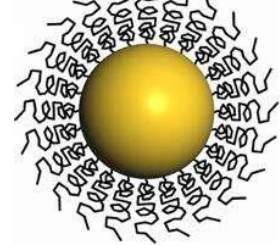


[font: worldofnanoscience.weebly.com]

2.2.3.2.2. Nanopartícules d'or

Són nanopartícules metàl·liques que, al ser formades per or, presenten unes propietats òptiques i electròniques que depenen totalment de la seva forma i grandària. A més, es poden escalfar fàcilment, cosa que pot ser un mètode per eliminar les cèl·lules canceroses.

Fig. 12 Nanopartícula d'or

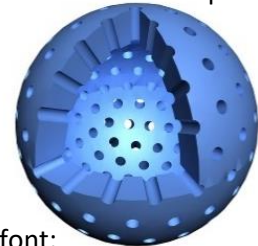


[font: phys.org]

2.2.3.2.3. Nanopartícules de sílice amb porus (MSNP)

Les nanopartícules de sílice poden tenir una forma i mida diferent, tot i que solen ser esfèriques. El fet de tenir porus a la seva superfície permet una fàcil introducció del fàrmac a l'interior de la nanopartícula i, de la mateixa manera, una fàcil alliberació. També té característiques lipídiques, pel que també seran aptes per encapsular un fàrmac al seu interior.

Fig. 13 Nanopartícula porosa



[font: turbosquid.com]

A més, el seu procés de síntesi és senzill, un dels motius pels quals la part experimental d'aquesta recerca es realitzarà amb aquest tipus de nanopartícules.

3. NANOEXPERIMENTATION

3.1. Introduction

To complete my main objective of this paper, I am going to prepare the cells and the particles which I'm going to study in an IBEC's lab. This experimentation will consist of the synthesis, the functionalization and the characterisation of the nanoparticles on one hand. On the other, I am going to grow cells and transfer them to different mediums which will contain 2 conditions of the 4 that I am going to study: half of them will have fuel and the other half won't. Finally, I will transfer the nanoparticles to the different cells environments and study what happens in each case.

Furthermore, I am going to 3D-print some microfluidic chips with different designs and sizes that imitate veins and arteries of the bladder, which would be used later on for the visualisation of the nanomotors with PET-CT, a project which will take place in CIC-BiomaGUNE, in San Sebastián.

The process I am following has been tested and it is being used in the research of what can be, in the future, a new treatment of bladder cancer. This research is currently in the PHASE 0 [10] of a new treatment, which consists of testing it with cells and lab rats.

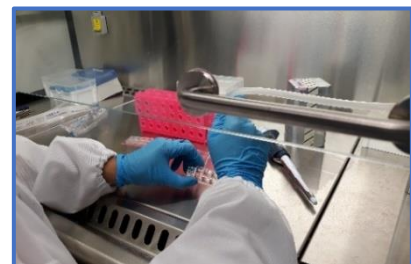
3.1.1. IBEC's lab equipment

○ Bio-safety cabinet

Biological safety cabinets are enclosed laboratory workspace areas designed to protect the user and everything inside it from pathogens [11]. All the air is filtered to remove hazardous agents such as viruses and bacteria. Biosafety cabinets are divided into three classes:

I, II and III, each of them provides more protection as the number of the class is higher.

Fig. 14 Bio-safety cabinet



[font pròpia]

[10] Veure ANNEX 2, pregunta 1

[11] Veure GLOSSARI, núm. 10

○ Fume-hood

A laboratory fume hood is a workspace designated for containment of hazardous reagents used in experiments or assays, or toxic fumes that result from reactions or experiments. Its primary goal is to protect the user from these reagents, and to protect other laboratory staff, animals and/or experiments from contamination.

Fig. 15 Fume-hood

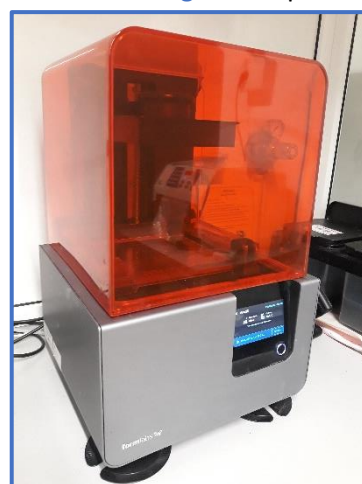


[font pròpia]

○ 3D-printer

This machine is built using a light source —a laser— to cure liquid resin into hardened plastic. When resins are exposed to certain wavelengths of light, short molecular chains join together, polymerizing monomers and oligomers by successively adding material layer by layer until the physical part is created into three-dimensional solidified rigid or flexible geometries. [12]

Fig. 16 3D-printer



[font pròpia]

○ Reflux Condenser

A reflux condenser is a vertical tube-side condenser in which the vapour flows upward. Once the vapour is on the top, it is refrigerated and it goes down again. The reflux condenser is usually used in reactions at a high temperature. It aims to refrigerate the vapour created when the reactors of a chemical reaction are heated so that the quantity of the reactors does not get reduced.

Fig. 17 Reflux Condenser



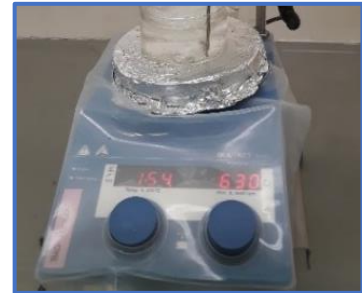
[font pròpia]

[12] font: formlabs.com, Formlabs

- Hot plate

A hot plate is a heating surface usually used in the laboratory to accelerate a reaction. It also has magnetic properties so it can make spin a magnet stirrer.

Fig. 18 Hot plate

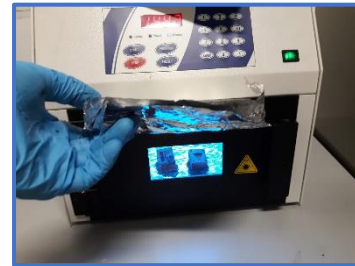


[font pròpia]

- Cure

A machine which, through exposure to a combination of two important ingredients, ultraviolet light and heat, allows engineering resins to reach their best functional properties.

Fig. 19 Cure

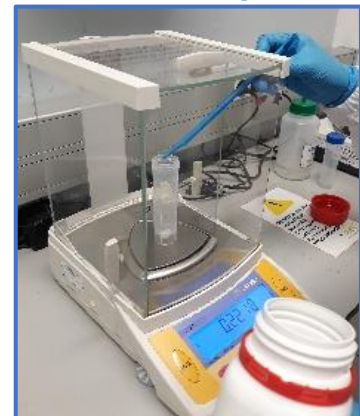


[font pròpia]

- Scale

It calculates very precisely the weight of any substance. It can measure from 0.1 mg to 1 kg, although it is commonly used to weigh very low values. Its doors provide more accuracy.

Fig. 20 Scale



[font pròpia]

- Centrifuge

A centrifuge is a laboratory device that is used for the separation of fluids, gas or liquid, based on density. Separation is achieved by spinning a vessel containing material at high speed; the centrifugal force pushes heavier materials to the outside of the vessel. This way a dispersion can be divided into the pellet [13] and the supernatant [14].

Fig. 21 Centrifuge



[font pròpia]

[13] Veure Glossari núm. 11

[14] Veure Glossari núm. 12

- Rotator Mixer

A rotator mixer is a machine which allows a simultaneous rotation and shaking of tubes. This is used to mix solutions or accelerate a chemical reaction.

Fig. 22 Rotator Mixer

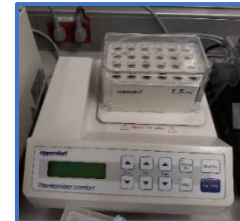


[font pròpia]

- Thermomixer

It heats and shakes the sample contained inside the tubes. This device can be used to dry a liquid sample.

Fig. 23 Thermomixer



[font pròpia]

- Sonicator

A sonicator applies sound energy via an ultrasonic bath or an ultrasonic probe to agitate particles in a sample. Sonication is used to disrupt cell membranes to release cellular contents, fragment molecules of DNA, homogenize liquids, accelerate enzymatic and chemical reactions, etc.

Fig. 24 Sonicator



[font pròpia]

- Vortex

It shakes the tubes that are introduced. Usually used to shake small vials of liquid.

Fig. 25 Vortex

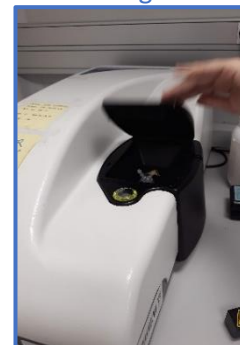


[font pròpia]

- Dynamic Light Scattering (DLS)

A DLS device uses a laser to obtain some features of the sample you have introduced. This laser goes through the cuvette, which contains the sample you want to study or analyse and, depending on its reflection, it obtains some data. For instance, the radius of particles.

Fig. 26 DLS



[font pròpia]

3.2. Procedure and data

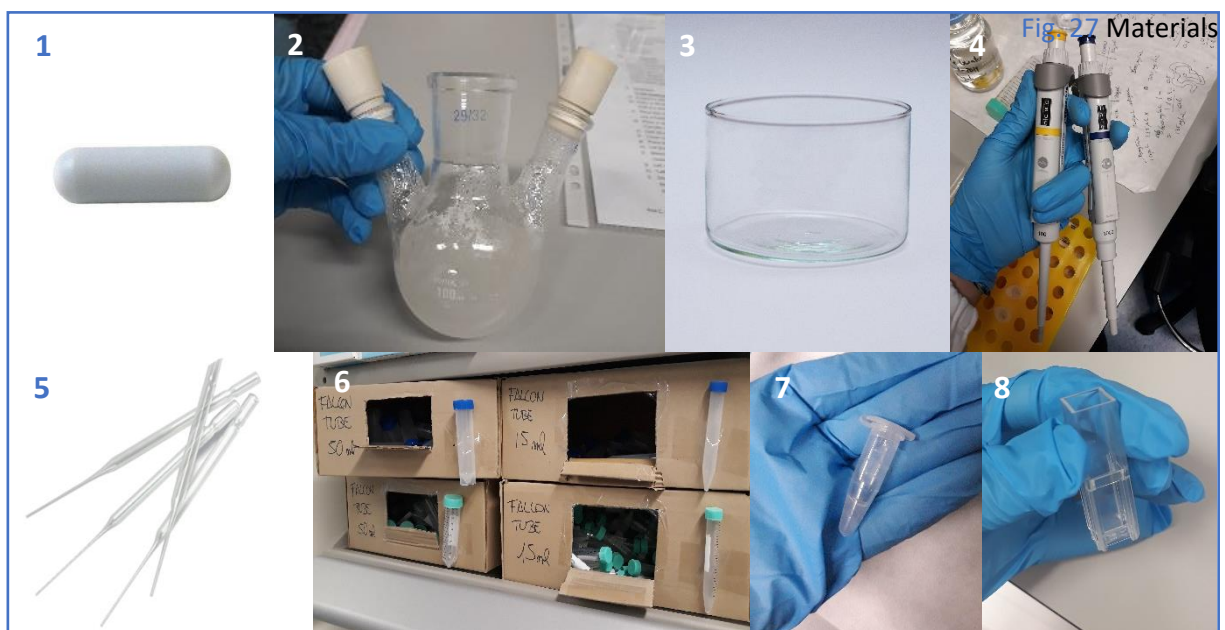
3.2.1. Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNP) fabrication

Introduction

In the first part of the experimentation the Nanoparticles will be **synthesised**, so that I will be able to use them; **functionalised**, a process in which some molecules will get attached in the surface of nanoparticles so that they can be able to do specific activities; and **characterised**, so I can verify if the two processes done before have been done correctly and I can ensure that the nanoparticles can be used with the cells.

Materials

1. Stirrer Bar
2. 3-mouthed & 1-mouthed round bottom flask (100 mL & 50 mL)
3. Crystallizer
4. Micropipettes
5. Cuvette
6. Falcon tube (15 mL), Falcon tube (50 mL)
7. Eppendorf tube
8. Cuvette



[fonts: nybrewsupply.com, novarli.com, pipette.com, pròpia]

Products

- **DI Water**

Water that has been mechanically filtered or processed to remove impurities and make it suitable for use.

- **Silicon oil**

- **Ethanol, absolute**

- **Methanol**

- **Hydrochloric acid, 37%**

- **Cetyl trimethylammonium bromide – CTAB**

This chemical will be the structure of the particles, developing one of the most important characteristics of them, the porous.

- **Triethanolamine – TEOA**

Catalyser which will speed up the reaction. As it is a basic solution, it won't affect the pH of the reaction.

- **Tetraethylorthosilicate – TEOS**

The precursor of the silica, which is the material of what the NPs are made of.

- **Glutaraldehyde – GA**

A chemical compound which will let the urease enzymes stay in the surface of the NPs.

- **(3-Aminopropyl)triethoxysilane – APTES**

A chemical compound that will settle amide groups all over the surface of the particles.

- **Polyethylene glycol (heterobifunctional) – PEG**

An intermediate substance that makes possible the association of the antibodies to the nanoparticles thanks to its heterobifuncionalidad. This characteristic will allow the last group of compounds of PEG (NH₂) to stick to the particle and the group of the other opposite end (SH) to bind with the antibodies.

- **Cell medium**

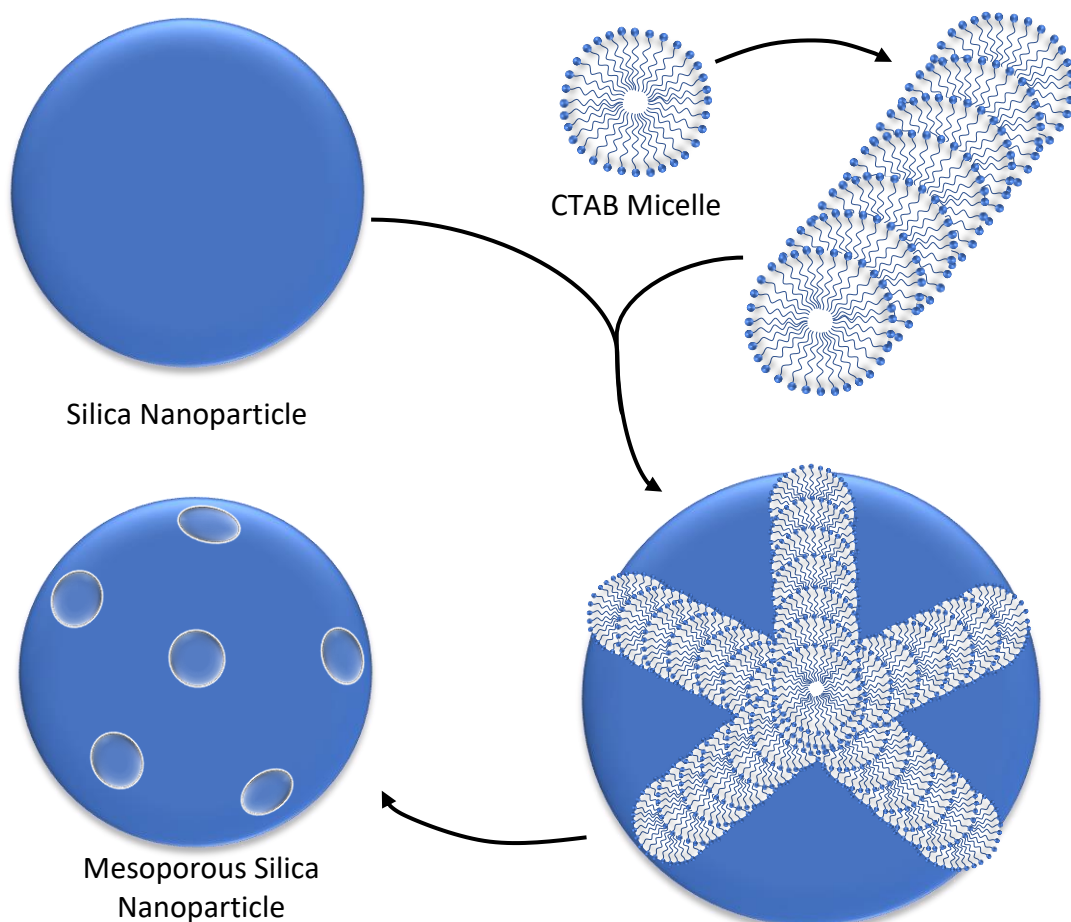
A liquid substance which contains the necessary amount of nutrients required for the human cancer cells to live.

3.2.1.1. Synthesis

The nanoparticles I am going to synthesise are called Mesoporous Silica Nanoparticles. *Mesoporous* indicates that the particles are going to have porous, a characteristic which (as mentioned before) will help the introduction and release of the drug which will carry. *Silica* is because the nanoparticle is going to be made of silica. *Nanoparticle* tells us that the particle is going to have nanometric measures.

Tetraethylorthosilicate (TEOS) is the precursor of silica. This chemical compound will create the spheres of silica which will be later on turned in to nanoparticles. In order so that the spheres have porous, I am going to use Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB). This chemical compound has a micelle structure. These micelles group together one behind the other forming cylinders, which get inside the silica spheres. Once the sphere is finally fabricated, the CTAB is removed and the nanoparticle remains holey.

Fig. 28 Synthesis of an MSNP



[font pròpia]

Once the nanoparticle is synthesised, it will be ready to be functionalised.

Most of the synthesis of the nanoparticles is going to be done inside the fume hood. The process that will be followed is the one below:

a) Prepare a silicone oil bath and set the temperature at 95 °C

A silicon oil bath is going to be prepared in a crystallizer. This will be used later to heat all the contents of the flask, instead of heating the flask directly with the hot plate, a process that would not heat the whole flask as its lowest part is rounded.

b) Place a stirrer bar in the round bottom flask, make sure the size is adequate.

I will place a stirrer bar in the flask. It will mix the dispersion later on when the flask is placed above the hot plate, and the magnet will make the stirrer bar spin around mixing the dispersion. For this reason, the size must be adequate so that it is strong enough to mix efficiently.

c) Weigh the TEOA (35 g) in the flask.

In order to weigh the TEOA, the round bottom flask has to be placed in the balance and tared. Then, the 35 g of TEOA will be transferred to the flask, which will be added while measuring the weight.

d) Weigh the CTAB (570 g) and transfer it to the flask

So as to weigh the CTAB there must be a weighing boat on the balance tared. Then, the CTAB has to be transferred in the boat and weighted. After it, the CTAB must be transferred to the round bottom flask.

e) Add 20 mL of DI water.

Once the CTAB has been transferred, I will add 20 mL of DI water to the same flask. I will be sure to cover two of the mouths of the round bottom flask with the rubber stoppers after it.

- f) Let the mixture magnetically stir introducing the flask into the silicon oil bath at 95 °C for 30 minutes and turn on the water for reflux.**

Once the dispersion is prepared, it must be heated at 95 °C. As the temperature is a bit high, part of the dispersion could evaporate. The reflux avoids this by refrigerating the steam and condensing it in liquid again.

- g) Add 1.5 mL of TEOS in the round bottom flask.**

First 1.5 mL of TEOS will be measured and added dropwise through one of the 3 mouths of the round bottom flask. Then I will let the reaction proceed for 2h under magnetic stirring (700 rpm).

- h) Collect and wash the particles 3 times**

Once the reaction has finished, the dispersion must be collected in a falcon tube. From now on the process will be continued out of the fume hood.

Fig. 29 Washing procedure

The **washing procedure** consists of a repetition of different steps. First of all, the dispersion must be **centrifuged** in order to separate the pellet from the supernatant. This process will be achieved by centrifuging at 5000 rpm for 5 min. The supernatant must be discarded and, once there's only the pellet in the tube, it must be broken with 30-second **vortexing**, so it gets unstuck to the walls of the Eppendorf tube and turns liquid again. After, it must be filled again with a considerable amount of *ethanol* (in this case). At last, it will be left in the **sonicator** for 10 minutes between 20 °C and 26 °C so as to separate the nanoparticles between each other as the centrifugation has got together all the nanoparticles to separate them from the supernatant. Then, the same steps will be repeated twice, from the centrifugation until the sonicating. Note that the last 10 minutes sonicating must not be done, so the tube will be only twice in the sonicator.

[font pròpia]

i) Removal of CTAB

A. Resuspend the particles in 30 mL of methanol with a solution of 1.8 mL HCl in a 50 mL round bottom flask at 80°C for 15 hours.

The previously collected particles will be resuspended in 30 mL of methanol with a solution of 1.8 mL HCl in a 50 mL round bottom flask. The round bottom flask must be placed on the hot plate at 80 °C with reflux. I will keep it there for at least 15 hours.

B. Centrifuge the particles and wash them 3 times.

The nanoparticles must be collected by centrifugation (5000 rpm, 5 minutes) and washed 3 times with EtOH again. So, the same washing process will be followed as it has been done previously.

C. Assess sample concentration by dry weighing.

First, I will weigh 3 Eppendorf's. Their weight must be written down. Then, 0.5 mL of the sample will be placed in each and after this must be centrifuged for 3 minutes at 9900 rpm in order to distinguish the pellet from the supernatant, which must be removed. Once there is only the pellet in the Eppendorf, they must be placed opened inside the thermomixer at a temperature of 90 °C for 30 minutes so as to let the rest of the water evaporate. When the sample is dry, I will take the Eppendorf out of the thermomixer, letting them cool to room temperature. Finally, they have to be weighed again so the NPs weigh can be known.

Fig. 30 NPs Weighting

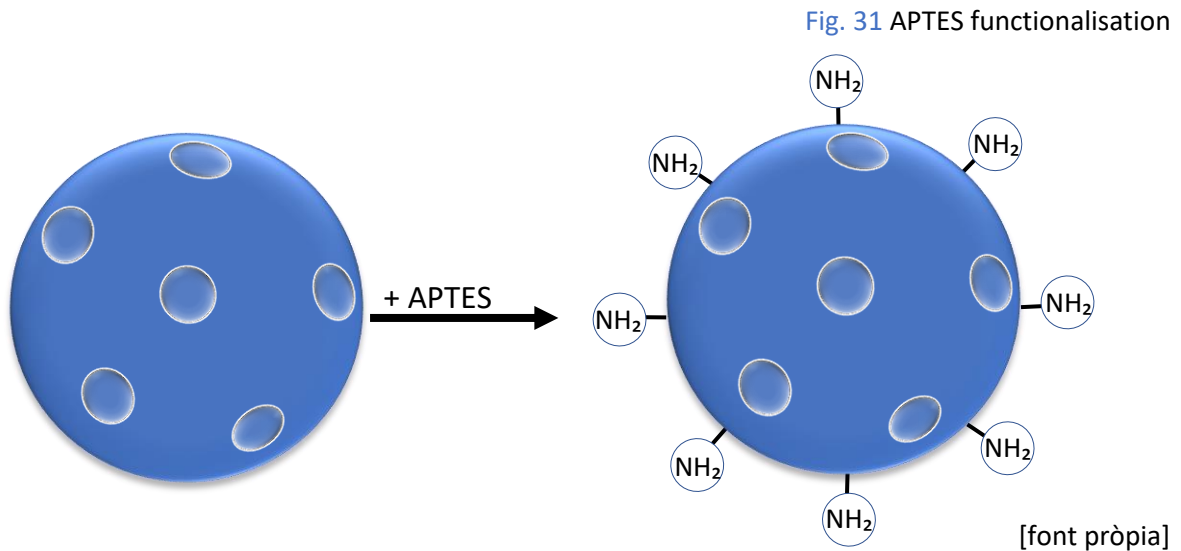
	BEFORE	AFTER	NPs WEIGHT	NPs AVERAGE WEIGH
1	0.9942 g	0.9971	0.0029 g	0.0026 g
2	0.9947 g	0.9969	0.0022 g	
3	1.0027 g	1.0054	0.0027 g	

[font pròpia]

Once I know the NPs average weigh, as they were solved in 0.5 ml, I can also know the concentration: **0.0026 g/0.5 mL → 0.0052 g/mL → 5.2 mg/mL**

3.2.1.2. APTES functionalisation

The following process will change the current surface's molecules of the nanoparticles, which are mostly OH^- (Hydroxide) ions, so that they contain the appropriate ones that will allow the urease enzymes to be added to the MSNPs. These steps consist of adding APTES, a chemical substance that will cover the surface of the particles with NH_2^+ (Amide) cations.



a) Pick a portion of 20mL of the sample concentrated at 2mg/ml

In order to proceed with the APTES functionalisation, I need to pick a portion of 20 mL of the sample with our NPs. Also, the concentration of the dispersion must be 2 mg/mL, so I have to dilute the concentration of the sample.

Initial volume: ?

Final volume (needed): **20 mL**

Initial concentration: **5.2 mg/mL**
(from the synthesis)

Final concentration (needed): **2 mg/mL**

$$20 \text{ mL dispersion} \cdot \frac{2 \text{ mg NPs}}{1 \text{ mL dispersion}} \cdot \frac{1 \text{ mL dispersion}}{5.2 \text{ mg NPs}} = 7.692 \text{ mL dispersion}$$

I need:

After doing the appropriate calculations, I now know that I have to take 7.692 mL of the initial dispersion and add the rest of water until our flask is filled with 20 mL of the dispersion, which will be concentrated 2 mg/mL.

b) Wash the particles 3 times.

Once I have the sample ready, the same steps followed before in the synthesis must be done, but this time, instead of ethanol, I am going to wash them in DI water, as is more appropriate with the chemical that I am using in this part.

c) Add APTES and 20 mL of NPs in a 50 mL round bottom flask and let the reaction proceed for 15 hours at 50°C in the hot plate.

Once the washes are done, I have to add the APTES to the nanoparticles. So that the functionalization works out, there must be added 3 μL of APTES each 10 mg of NPs. As I have 20 mL of Nanoparticles concentrated at 2mg/mL, the sample contains 40mg of NPs. In the laboratory, there is APTES 1:10, so I will have to add ten times more solution so that there's the quantity of APTES needed.

$$20 \text{ mL dispersion} \cdot \frac{2 \text{ mg NPs}}{1 \text{ mL dispersion}} \cdot \frac{3 \mu\text{L APTES}}{10 \text{ mg NPs}} \cdot \frac{10 \mu\text{L APTES 1:10}}{1 \mu\text{L APTES}} = 120 \mu\text{L APTES 1:10}$$

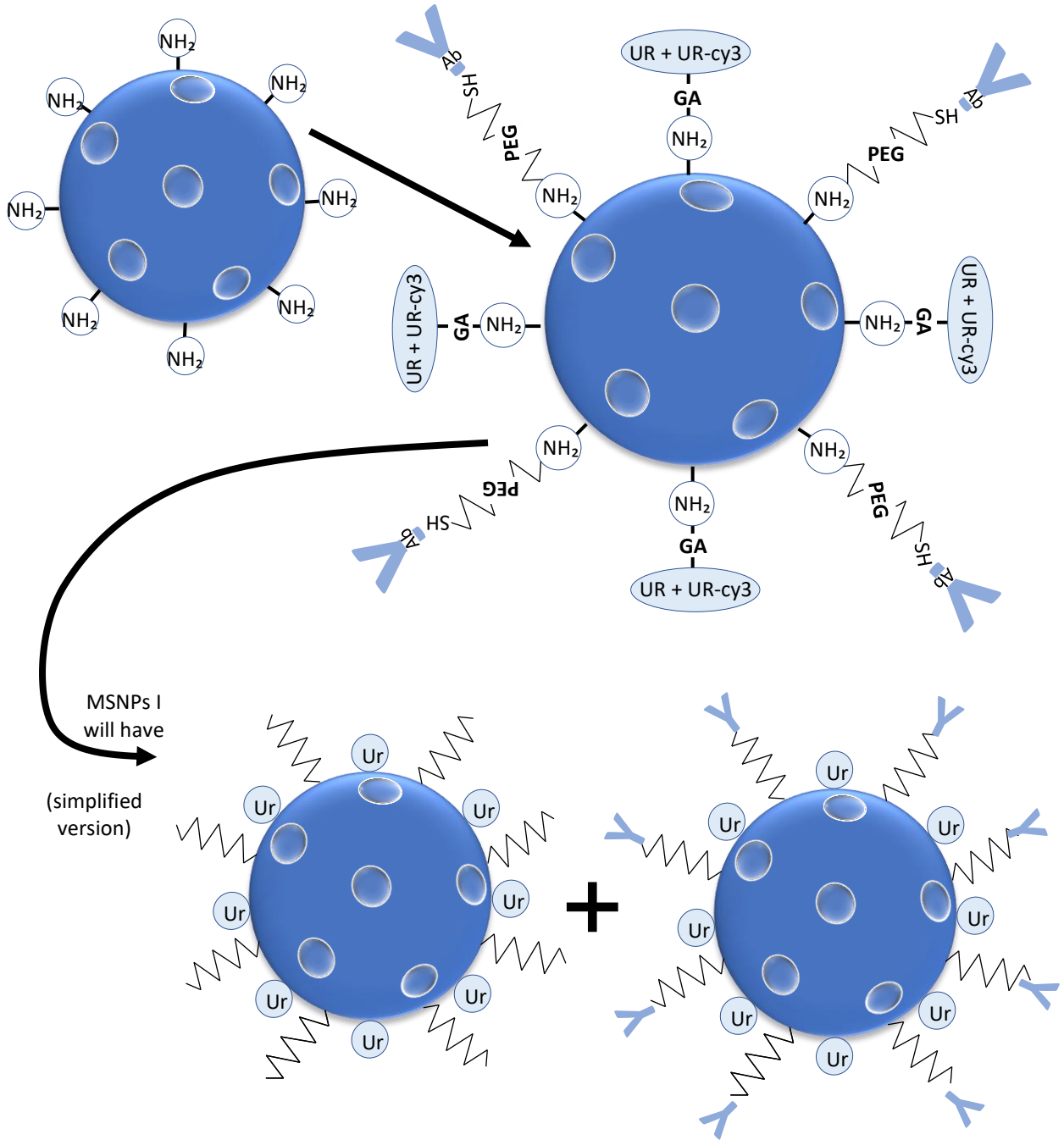
Once everything is calculated, I see that I am going to add 120 μL of APTES 1:10 to the 20 mL of nanoparticles dissolved in water in a 50 mL round bottom flask. Then, so as the APTES functionalises, I will have to leave it on the hot plate in water for 15 hours at 50°C.

3.2.1.3. Functionalisation with urease, urease-cy3 enzymes & PEG

Now that there are NH^+ ions all over the surface of the nanoparticles, I am going to proceed with the urease enzymes functionalization. But before transferring the enzymes to the particles I am going to add an intermediate substance called Glutaraldehyde (GA) that will link the Amino ions with the enzymes. Then, after adding them, I am going to add another substance called Polyethylene glycol (PEG), which will help to bind the molecules (in the case where are added) with the NH_2^+ ions.

I also am going to add Urease-Cy3, which is a urease enzyme marked with cyanine3, a radioactive substance which is going to be seen when I look through the microscope.

Fig. 32 Urease, urease-cy3 and PEG



[font pròpia]

As I am going to end this part of the experiment with some particles with antibody and the same quantity without them, I will need to prepare 2 samples.

a) 3 Washes: Centrifuge, remove supernatant, Vortex, add 1mL PBS, Sonicate

Once the reaction has finished, I have to wash the particles to ensure that there is not any substance left that has not reacted. After the washes, instead of filling the Eppendorf with 1mL of PBS, it will be filled with 900 μ L.

b) Add 100 μ L GA

Before adding the enzymes, I need to add Glutaraldehyde so that the enzymes can stay in the particle. Without this substance, the enzymes would not stick to the particle. So, I am going to add 100 μ L of GA and let it react for 2 hours in the rotator mixer.

c) 3 Washes: Centrifuge, remove supernatant, Vortex, add 1mL PBS, Sonicate

As said in the step a), I have to wash again the particles in order to remove the excess of GA which has not reacted and has not got stuck in the particles. After the last centrifuge, the supernatant must be removed but it must not be filled again with PBS.

d) Weight and prepare urease, PEG & urease marked with cyanine 3.

While the particles are being washed, I am going to prepare the enzymes and the PEG.

A. Urease

There must be 3 mg of urease every 1 mL of PBS. I have weighted 8 mg of urease, so I will have to add 2.67 mL of PBS to it in order to keep the concentration the same.

$$8 \text{ mg UR} \cdot \frac{1 \text{ mL PBS}}{3 \text{ mg UR}} = 2.67 \text{ mL PBS}$$

B. PEG

$$4 \text{ mg PEG} \cdot \frac{5 \text{ mL PBS}}{3.5 \text{ mg UR}} = 5.71 \text{ mL PBS}$$

There must be 3.5 mg of PEG every 5 mL of PBS. I have weighted 4 mg of PEG, so I will have to add 5.71 mL of PBS.

C. Urease-cy3

In the case of the urease marked with cyanine 3, as it is stocked dissolved, I will not weight it. Instead of it, I will have to take some of it, which is concentrated 22mg/mL, and dilute it so that I have finally 1 mL of urease with a concentration of 3 mg/mL.

$$1 \text{ mL dispersion} \cdot \frac{3 \text{ mg urease}}{1 \text{ mL dispersion}} \cdot \frac{1 \text{ mL dispersion}}{22 \text{ mg urease}} = \text{I need: } 136 \mu\text{L dispersion}$$

So, I will take 136 μL of urease-cy3 and dilute it with PBS until I finally have 1 mL.

e) Add 1mL of the ones mentioned before

After preparing the urease, the PEG and the urease-cy3, I am going to add 1 mL in total to the particles. This mixture must be mostly urease, 5% of urease-cy3 and 60 μL of PEG.

Fig. 33 Contents of the 1mL I am going to add

1000 μL of:		
890 μL urease	60 μL PEG	50 μL urease-cy3

[font pròpia]

After it, I will leave the Eppendorfs in the mixer rotator for 2 more hours so that the reaction takes place. As there is urease in the samples, from now on they will have to be kept wrapped in aluminium so that they don't get damaged by the light.

f) 3 Washes: Centrifuge, remove supernatant, Vortex, add 1 mL PBS.

As done before, the particles must be washed to remove the excess of the chemicals unwanted. This time, as there is still urease, the sonication will be skipped so that the urease doesn't get damaged too.

g) Add antibody to one of the samples.

From now on, the samples will be different as one of them will contain antibodies while the other will not. There must be 30 mg of antibody every 1 mg of NP in the Eppendorf.

As the sample is too much concentrated to add the antibodies, I will dilute it to 0.3 mg/mL.

$$1 \text{ mL dispersion} \cdot \frac{1 \text{ mg MSNPs}}{1 \text{ mL dispersion}} \cdot \frac{1 \text{ mL dispersion}}{0.3 \text{ mg MSNPs}} = \text{I need: } 0.3 \text{ mL dispersion}$$

After the calculations, I will take 0.3 mL of the dispersion 1mg/mL and dilute it to 0.3 mg/mL.

h) Mixer rotator 15-16h (overnight).

Once the antibody is added, the samples will remain in the mixer rotator overnight. Remember that the samples must be kept wrapped with aluminium.

3.2.2. Characterisation of the particles

So as to verify that the process the Mesoporous Silica Nanoparticles fabrication has been done correctly, I am going to characterise the nanoparticles. In order to realize this characterisation, I am going to use a Dynamic Light Scattering (DLS), and I'm going to study the **Zeta Potential** and the radius of the particles.

I am going to prepare one sample with MSNPs after being synthesised, another after the APTES functionalisation (with NH_2^+) and the last after the urease functionalisation. To prepare the samples, as the quantity which has to be in the cuvette must be 1 mL, I have introduced 980 μL of DI water and 20 μL of NPs in each one. This way there is going to be a small concentration of nanoparticles and it is going to be easier for the DLS to recognise them.

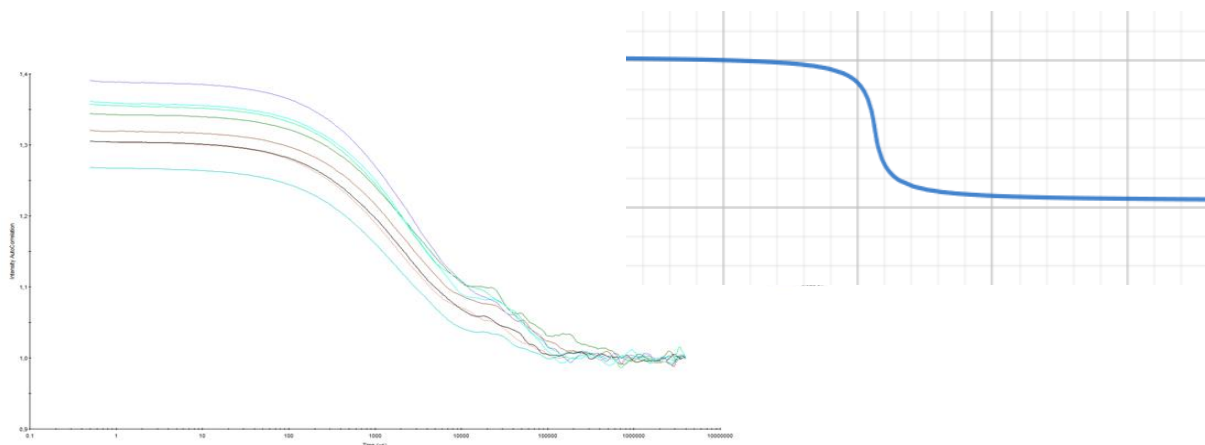
Moreover, if the particles are too much joined together, the DLS will not be able either to collect very accurate information. Because of that, I will sonicate the sample for 10 minutes.

Once they have finished, I have introduced the sample in the DLS.

PROBLEM:

The NPs were too much joined with themselves, so when I introduced them in the machine, it gave me some wrong data. The graphic representation of the function that relates the Correlation Coefficient with the time should be more similar to an asymptotic function (shown next to it).

Fig. 34 Wrong graph and how should it be represented



[fonts: pròpies i geogebra]

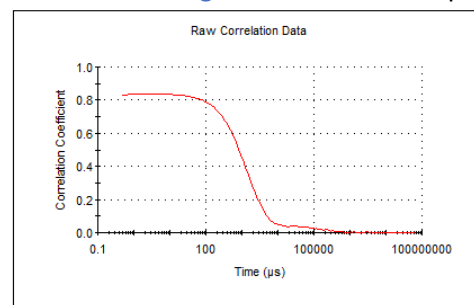
SOLUTION 1:

The day after, I sonicated them again but this time, instead of doing it using an Eppendorf, I left them in the same cuvette. The reason for this is that the cuvette is more rigid than the Eppendorf, so the sonicator is more effective because the vibration is less reduced by the recipient. After it, I have introduced the sample in the DLS and the data I have obtained was a bit different in a good way, but it was still wrong.

SOLUTION 2:

This time, I decided to measure the data with another DLS that was in another lab of the PCB. Once I introduced the sample, the data I obtained, which is the following, was reliable as the graph was correct.

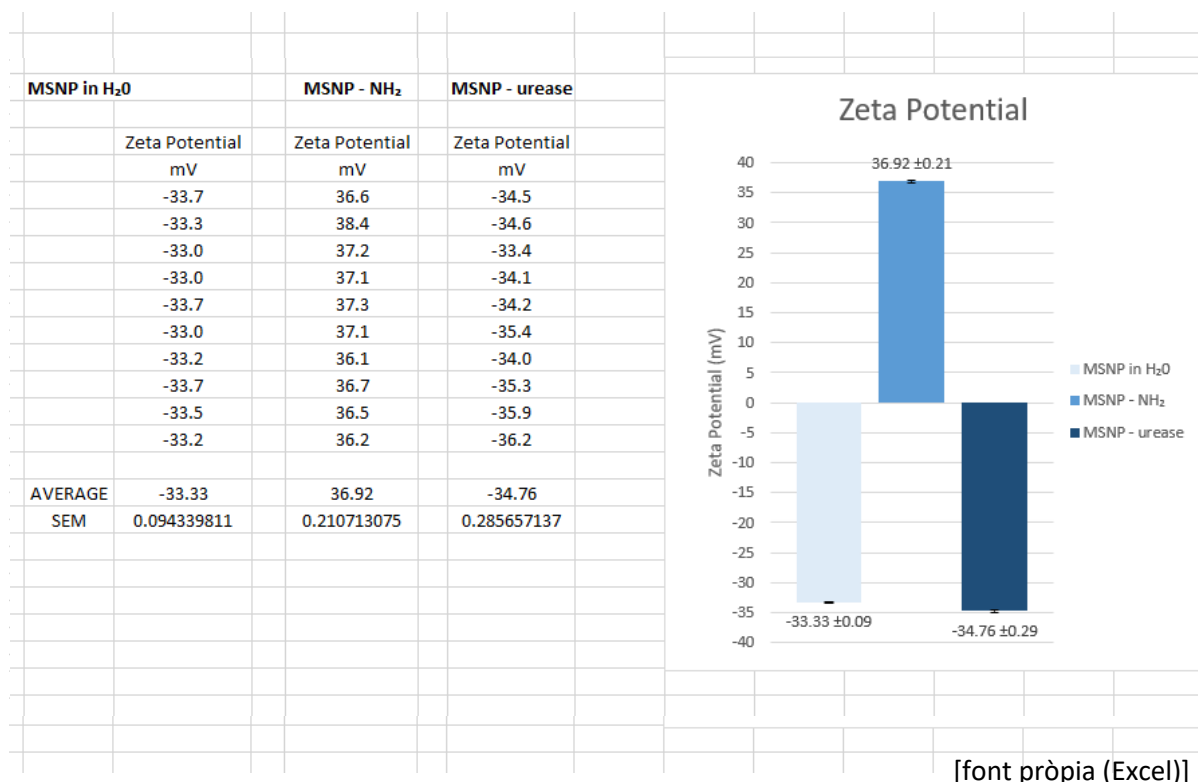
Fig. 35 Correlation Graph



[font pròpia]

3.2.2.1. Zeta Potential

Fig. 36 Zeta Potential Data and Graph

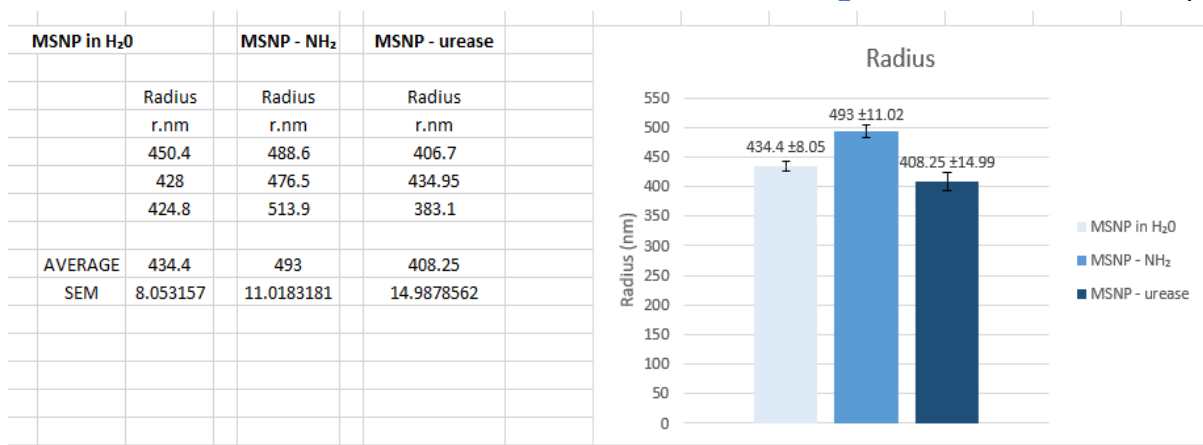


In this case, I am not interested in the value of the Zeta Potential but its sign. And once I have observed the results, I can see that the results are correct: In the first sample, the surface of the nanoparticles was covered by OH^- anions, and the value of the ZP is negative. In the second sample, I see that the value has increased positively, and it should be like this because the surface of these nanoparticles is covered by NH_2^+ cations. Finally, the urease enzymes are negatively charged, and the results I have obtained show that the Zeta Potential of the nanoparticles of the third sample has negative values.

Studying the Zeta Potential of the particles has verified that the MSNPs have been synthesised and functionalised properly.

3.2.2.2. Radius

Fig. 37 Radius Data and Graph



[font pròpia (Excel)]

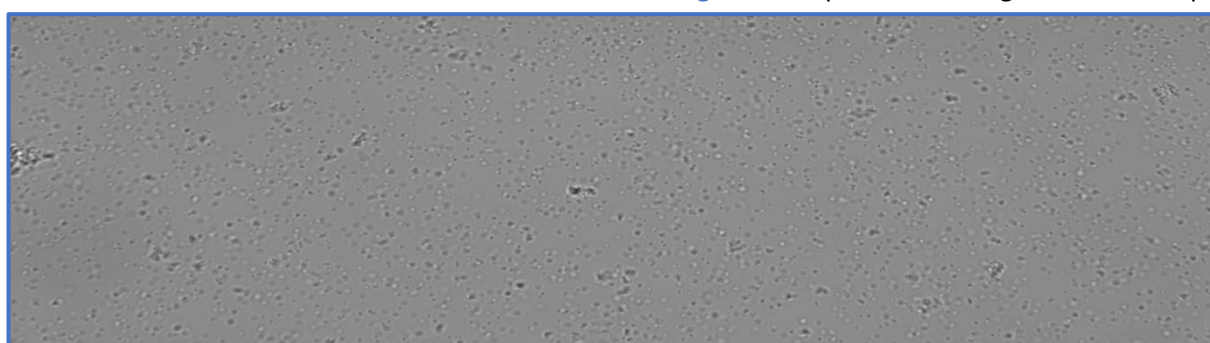
In this case, the differences between the data I have obtained from each sample is not very large, so there is not any problem with it.

The data most relevant is the average size of the particles. Theoretically, the size of the nanoparticles is around 450 nm of diameter (that is why this type of nanoparticles are also called MSNP 450), but the results of the DLS show that the nanoparticles synthesised have doubled the size they should have.

This information leads me to two different interpretations: a) As the particles have been sonicated many times, they could have broken or b) As there is H₂O around the nanoparticles, the DLS may have interpreted that some molecules of water around the particles are part of them.

In order to ensure whether it has happened one case or the other, I have taken a sample of the particles and observed it with the microscope. After doing it, I have confirmed that the particles have not been broken, so it may have occurred the second hypothesis.

Fig. 38 Nanoparticles through the microscope



[font pròpia]

3.2.3. Cell Assays

I will explain the process I have followed in order to grow the cells which I am going to use later with the nanoparticles. These are RT4 cells, epithelial cells of bladder cancer.

In a few words, I am going to defrost the cells and transfer them to a flask with the medium where they are going to be able to grow. Then, I am going to make sure that the cells have the necessary nutrients to live and periodically change the medium. Finally, I will transfer the cells to another flask divided by 8 wells in which the four conditions of the experiment will be distributed. Also, the cells are going to be grown in 3D, so they will adopt a spherical disposition joining some of them together, which will be like a ball of cells called **spheroid**.

3.2.3.1. Cell culture

I am going to defrost the cells and set them to an environment where they can live.

a) Set the medium to the human body temperature (37 °C).

I have taken a flask with cell medium and leave it in a chamber at 37°C so that it adopts the body temperature as it is a crucial condition for human cells to live.

b) Defrost the cells.

While the medium is being heated, the cells must be left in another chamber which will defrost and set them to the same temperature.

c) Centrifuge (500 rpm, 5 minutes).

Once the cells have been defrosted, they must be centrifuged in order to separate them from the supernatant.

d) Transfer the cells to the medium and leave them in the incubator.

Now the cells can be transferred to the flask with the medium. Then, they must be left in the incubator so that they stay at 37°C.

e) Look at the cells with the microscope.

I have taken a sample of the cells to verify with the optic microscope there is not any problem. Once I have done it, I have not seen any issue.

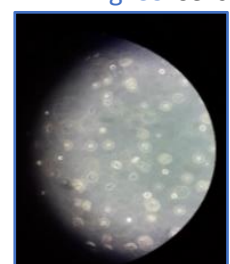


Fig. 39 Cells

[font pròpia]

3.2.3.2. Medium change

Then, after the cells are defrosted, they begin to live normally, so they need to be fed so as they can survive and reproduce. For this reason, every 2 days I will have to change the medium in which they are living, which is kept in a chamber at 37 °C.

The process must be made in a bio-safety cabinet as I am experimenting with living organisms.

a) Take out the medium.

I will use a micropipette to remove the medium. I must be careful so that I don't remove also the cells, which should remain stuck on a side of the flask.

b) Add the new medium.

I have to be careful again: I will transfer the medium carefully so that the cells stuck on the side of the flask don't get unstuck.

After the last medium change and just before joining the particles with the cells, I have taken a sample from the flask and observed the cells through the microscope so as to verify there was not any problem.

Fig. 40 Spheroids through the microscope



[font pròpia]

3.2.3.3. Prepare the particles

So as to pour the particles to the cells, the concentration of the particles must be much lower. So, I will have to decrease both concentrations before adding them to the cells.

a) In the case of the particles **with antibody**:

Initial volume: ¿?

Final volume (needed): **0.2 mL**

Initial concentration: **0.3 mg/mL**

Final concentration (needed): **12.5 µg/mL**

$$0.2 \text{ mL dispersion} \cdot \frac{0.0125 \text{ mg NPs}}{1 \text{ mL dispersion}} \cdot \frac{1 \text{ mL dispersion}}{0.3 \text{ mg NPs}} = \text{I need: } 8.3 \text{ } \mu\text{L dispersion}$$

I will pick 8.3 µL of the dispersion with the nanoparticles and dilute it with 91.7 µL of the medium.

b) In the case of the particles **without antibody**:

Initial volume: ¿?

Final volume (needed): **0.2 mL**

Initial concentration: **1 mg/mL**

Final concentration (needed): **12.5 µg/mL**

$$0.2 \text{ mL dispersion} \cdot \frac{0.0125 \text{ mg NPs}}{1 \text{ mL dispersion}} \cdot \frac{1 \text{ mL dispersion}}{1 \text{ mg NPs}} = \text{I need: } 2.5 \text{ } \mu\text{L dispersion}$$

So, I will pick 2.5 µL of the dispersion with the particles and dilute it with 97.5 µL of the medium.

3.2.3.4. Join particles with cells

Now that the cells and the particles are prepared, I am going to join them together. As there are 8 wells with cells in each one and there are going to be 4 conditions in this experiment (Fuel/no Fuel and Antibody/no Antibody), there are going to be 4 different wells depending on what they contain. Two of them are going to contain the cells (RT4), particles (MSNPs), the Antibody (Ab) and urea (Fuel). While the other pair of wells are going to have the same but without antibody or urease so I can see the differences without them.

Before adding the particles, the cells must be washed. So as to do it, the current medium must be removed. After it, a new medium must be added and removed again.

Then, I am going to add markers to the cells so that I am going to be able to see them through the microscope. I am going to add 1 μL of nucleus marker, which is called Hoechst, and 10 μL of Wheat Germ Agglutinin (WGA) 647, which is the marker for the membrane of the cells.

Once is everything ready, I am going to add the particles. The ones with antibodies are going to be transferred in the left wells and the ones without in the ones in the right. Also, I will add 100 μL of urea 40mM in the top wells while the ones below are going to be added 100 μL of the medium.

Fig. 41 Cell with different conditions table

RT4s	MSNPs	RT4s	MSNPs	RT4s	MSNPs	RT4s	MSNPs
					Fuel		Fuel
RT4s	MSNPs	RT4s	MSNPs	RT4s	MSNPs	RT4s	MSNPs
Ab		Ab		Ab	Fuel	Ab	Fuel

[font pròpia]

3.2.3.5. Observation of the results

I am going to analyse through the microscope the targeting of the nanoparticles. As I have explained before, so as to distinguish what I am going to see I have used different types of markers, which will dye of different colours the membrane and nucleus of the cells and also the nanoparticles:

- Bladder Cancer Cells (RT4) membrane
- Bladder Cancer Cells (RT4) nucleus
- Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNPs)

As I first observed the samples with the microscope, I could not see the results very clearly because the photos I firstly obtained were in greyscale. So, just above the photos, I will write the first impressions I had and below the analysis of the “real” results.

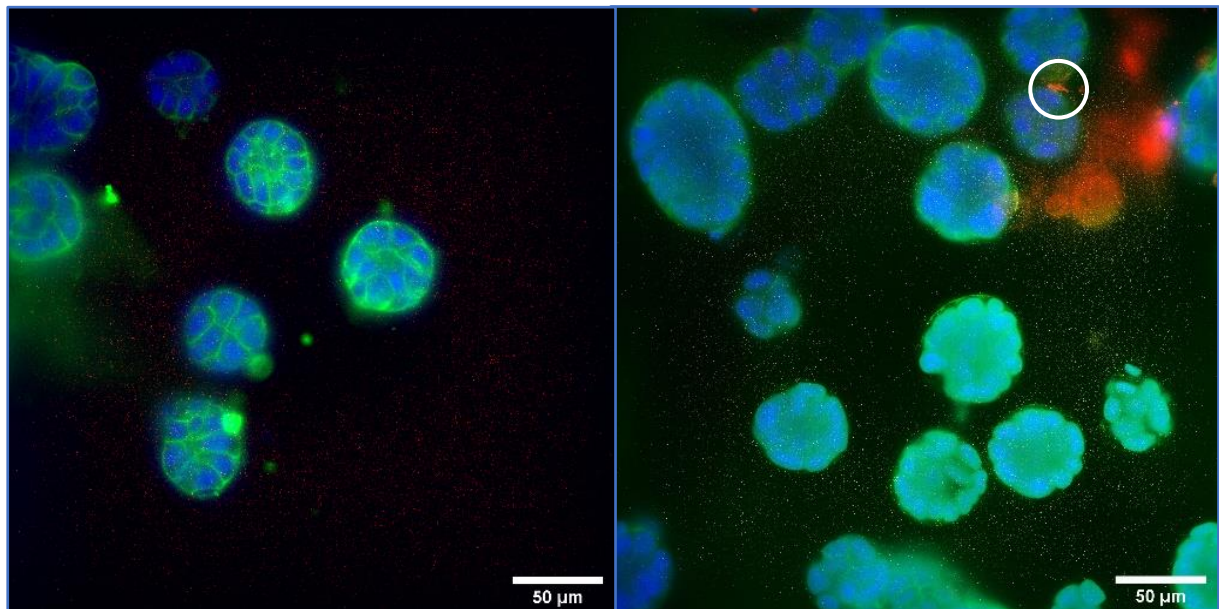
a) Cells (RT4s) and Nanoparticles (MSNPs):

GENERAL IMPRESSION:

Once I have observed this sample with the microscope, I have seen that there are some nanoparticles near the cells, but it is not an important quantity of them.

RESULTS:

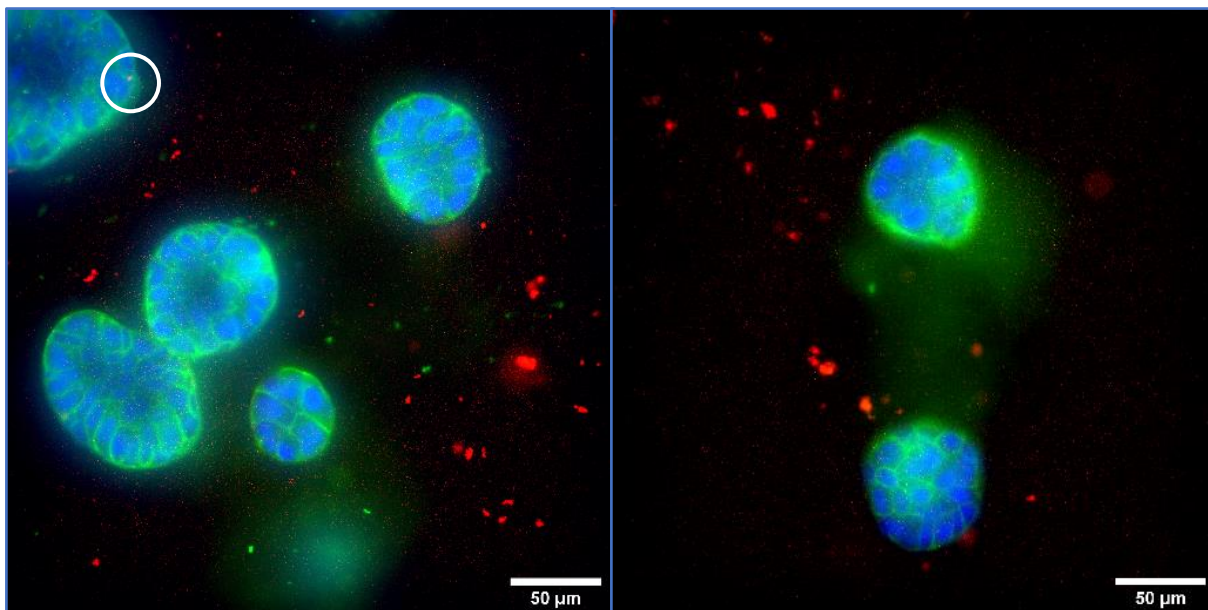
Fig. 42 Result 1.1



[font pròpia]

I can see that there are not too many nanoparticles. In the second one, I see that there are some particles close to a spheroid, though it does not seem that they have internalised.

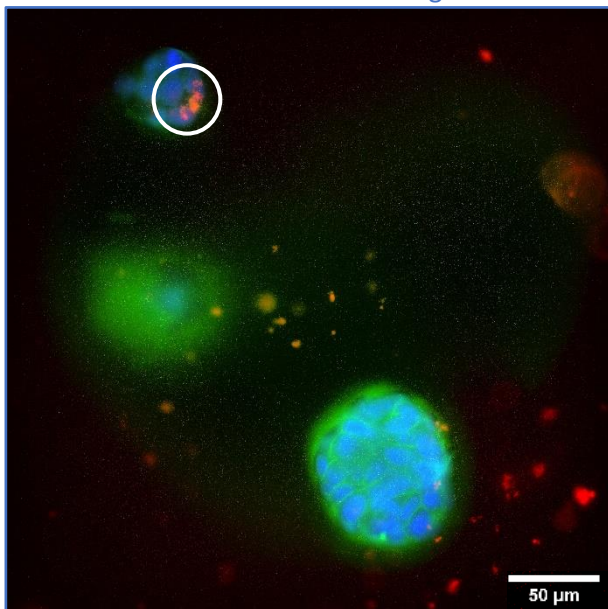
Fig. 43 Results 1.2 and 1.3



[font pròpia]

In the following results, it seems that there is more quantity of nanoparticles near spheroids, but at least in the fourth result, it does not seem that any NP has internalised in any spheroid. Unlikely, in the third result, it seems that a nanoparticle has been able to penetrate a spheroid.

Fig. 44 Result 1.4



[font pròpia]

In the last result of this set of conditions, it is very clear that some nanoparticles have been able to penetrate the spheroid. There are also many more of them outside the spheroids surrounding them.

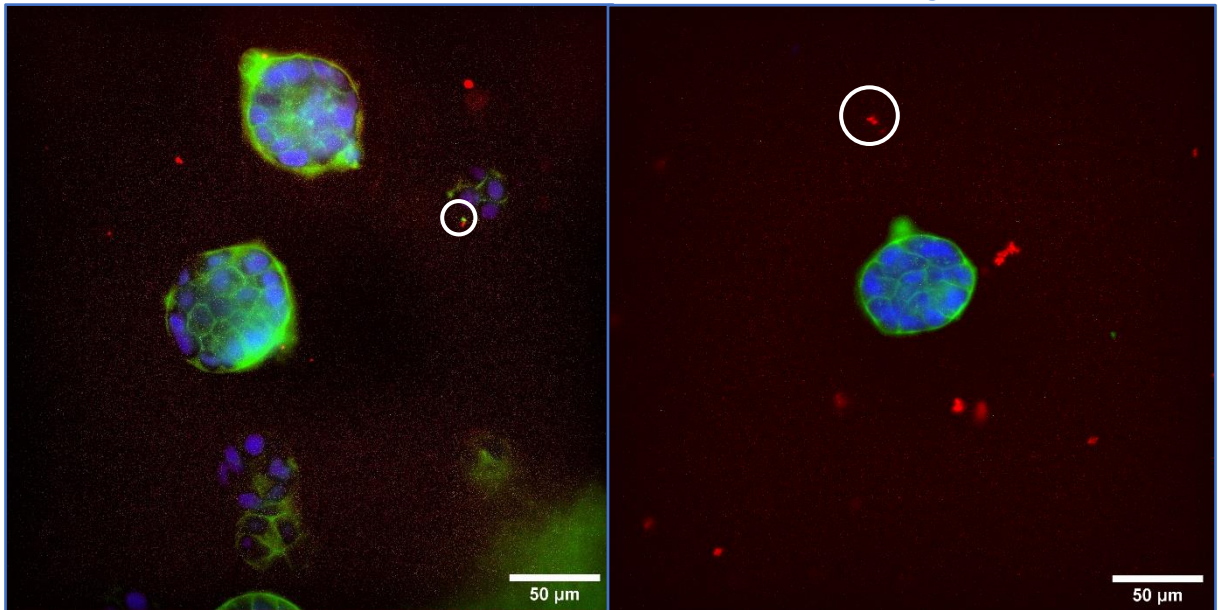
b) Cells (RT4s) and Nanoparticles (MSNPs) with urea (fuel):

GENERAL IMPRESSION:

In this sample, there is a little more quantity of cells with nanoparticles than in the previous one, although there are still some other cells in which there are not any nanoparticle.

RESULTS:

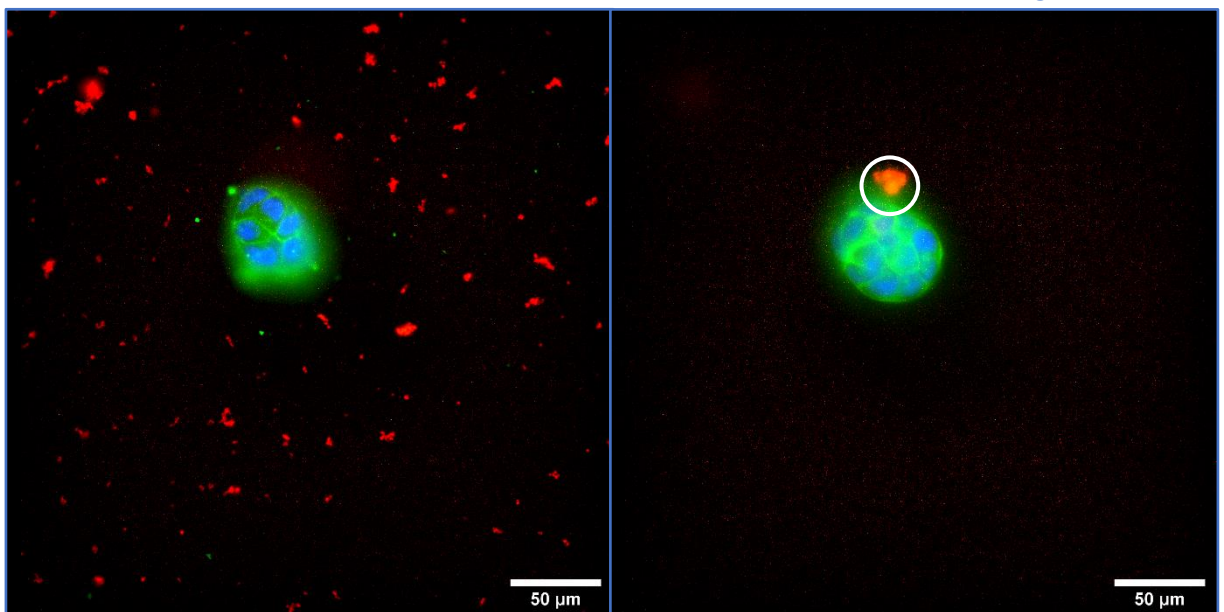
Fig. 45 Results 2.1 and 2.2



[font pròpia]

In the first two results, I can see that there are some nanoparticles near the spheroids. Some of them are close, and the others are surrounding them. None of them has internalised inside the spheroids.

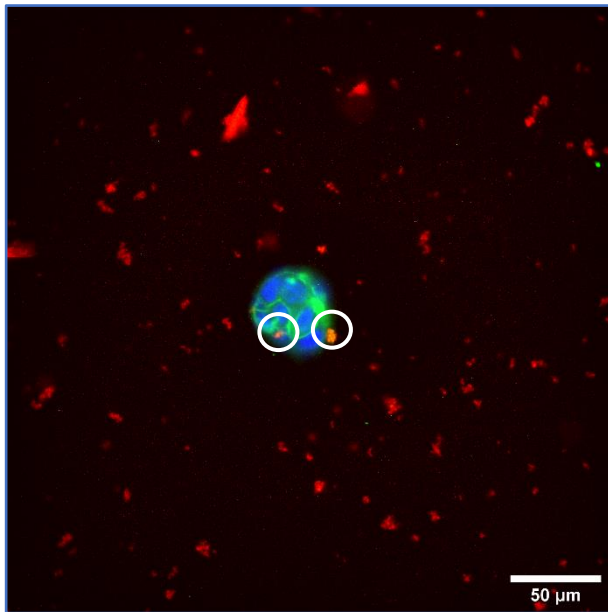
Fig. 46 Result 2.3



[font pròpia]

In the next result, if I observe the spheroid showed from one side, I can see that there is an important quantity of nanoparticles surrounding it but none of them has internalised. But if I observe the spheroid from the other side, I can see that some nanoparticles have been able to get inside the spheroid.

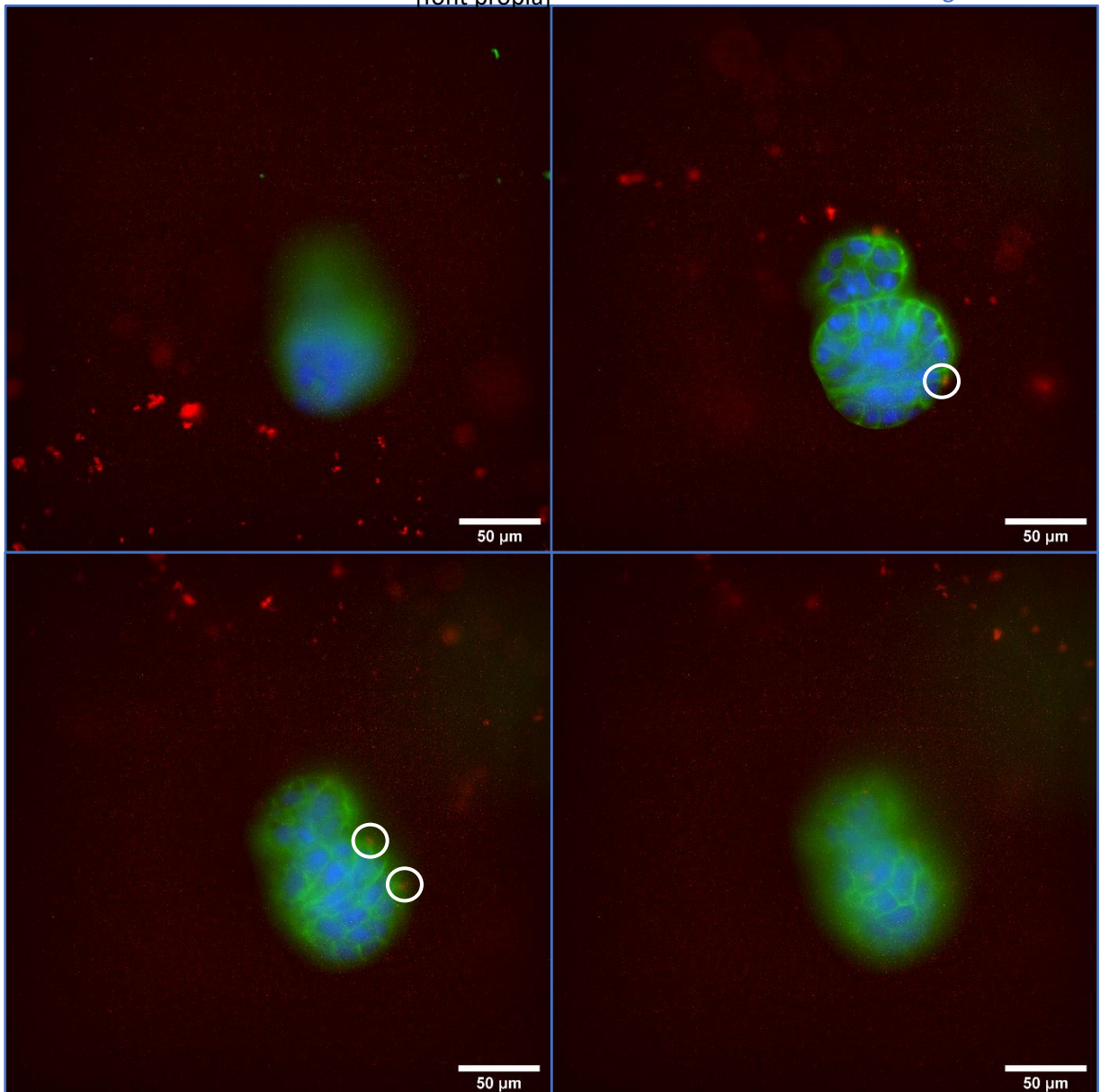
Fig. 47 Result 2.4



In this photography, I can see that there are also lots of nanoparticles surrounding the spheroid. And as with the previous result, some of them have internalised in the spheroid, but not a large quantity of them.

[font pròpia]

Fig. 48 Result 2.5



[font pròpia]

So as to observe properly the last result, I have had to take 4 photos because, as the spheroids grow in three dimensions, they can grow in any direction, and to see them completely I sometimes have to observe them in different focus. If I try to see these images as one, I can see that there are also many nanoparticles surrounding the spheroids. And if I stare at the second and the third photos, I can see that there are a few nanoparticles internalised in the spheroid.

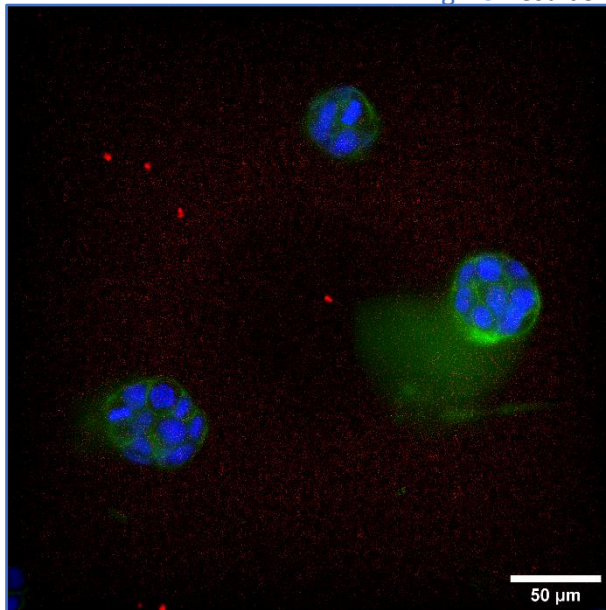
c) Cells (RT4s) and Nanoparticles (MSNPs) with antibody (Ab):

GENERAL IMPRESSION:

When I have observed this sample, I have seen very similar results to the previous samples, with some cells with particles and some without them.

RESULTS:

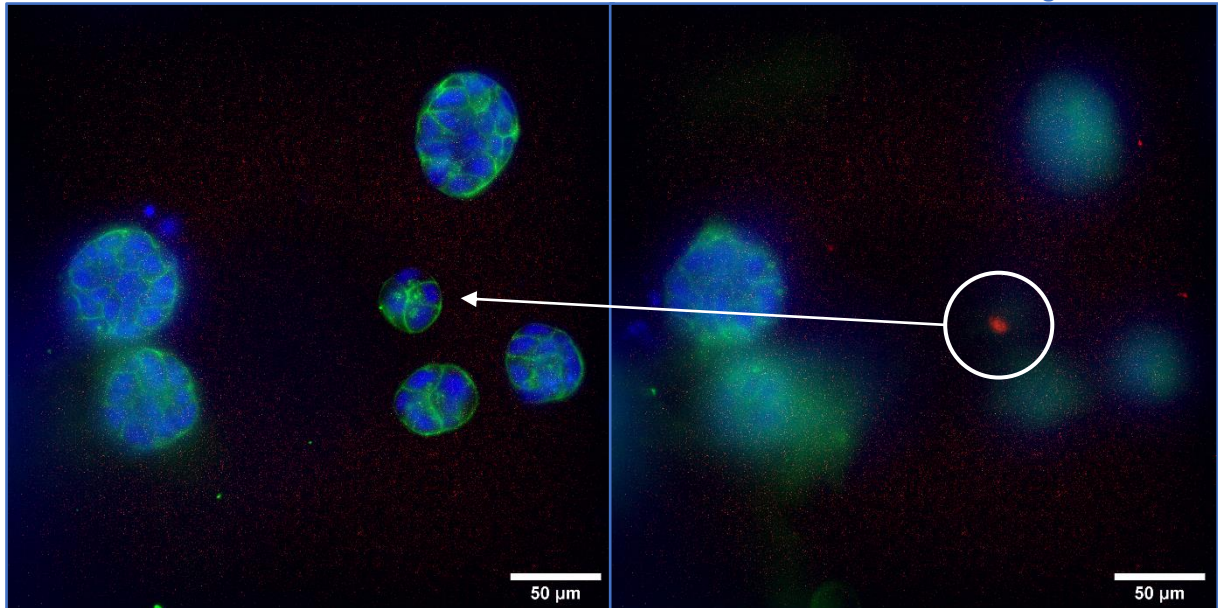
Fig. 49 Result 3.1



[font pròpia]

In the first result, I cannot notice something standing out. There are some nanoparticles near some spheroids, but none of them is close enough to internalise in any spheroid.

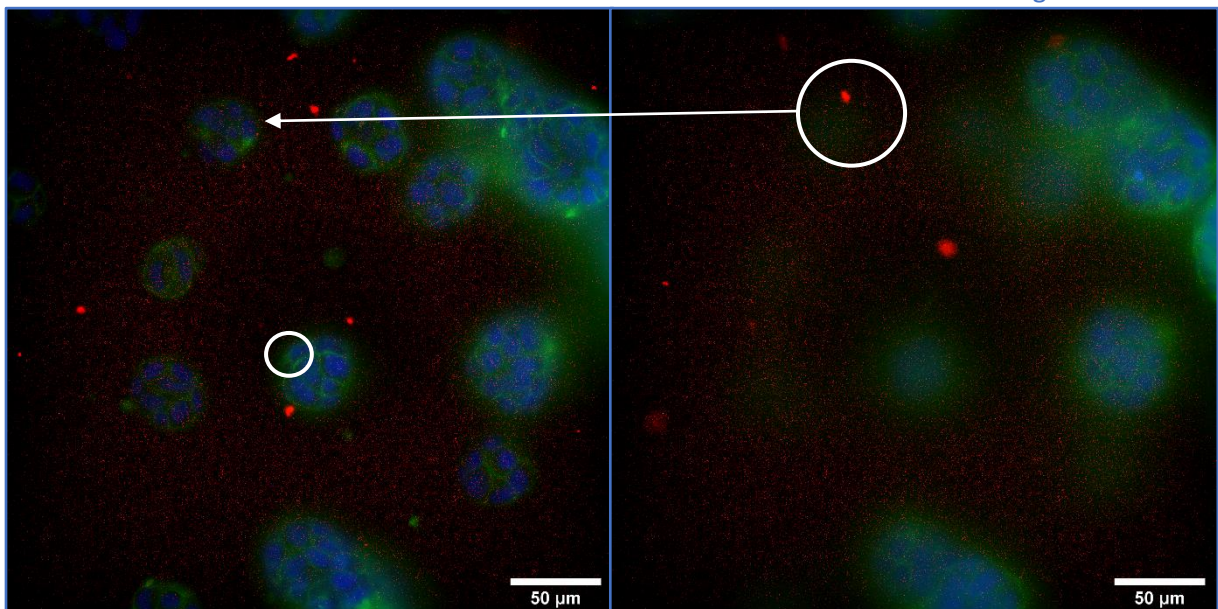
Fig. 50 Result 3.2



[font pròpia]

In the second result, I can see, at first, that there is not any nanoparticle around this group of spheroids. But if I observe it from the bottom, I can see that there are a few of them and, most of those have internalised inside a spheroid.

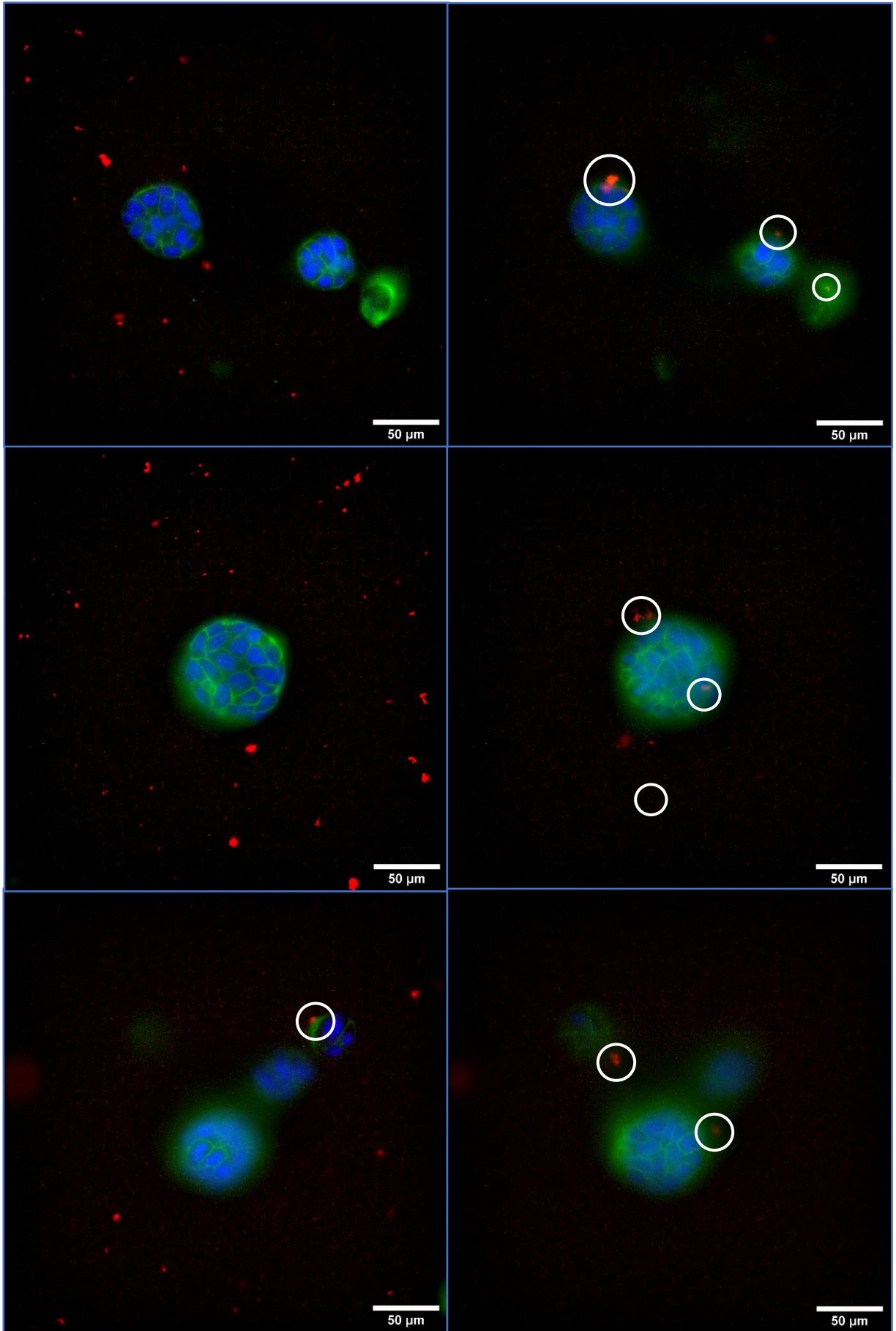
Fig. 51 Result 3.3



[font pròpia]

In this result, I can see that in both faces of the spheroids there are nanoparticles. In the first focus, the nanoparticles I can see are close to the spheroids but not too much, except one of them. In the other focus, I can see a few nanoparticles that have been able to internalise in a spheroid.

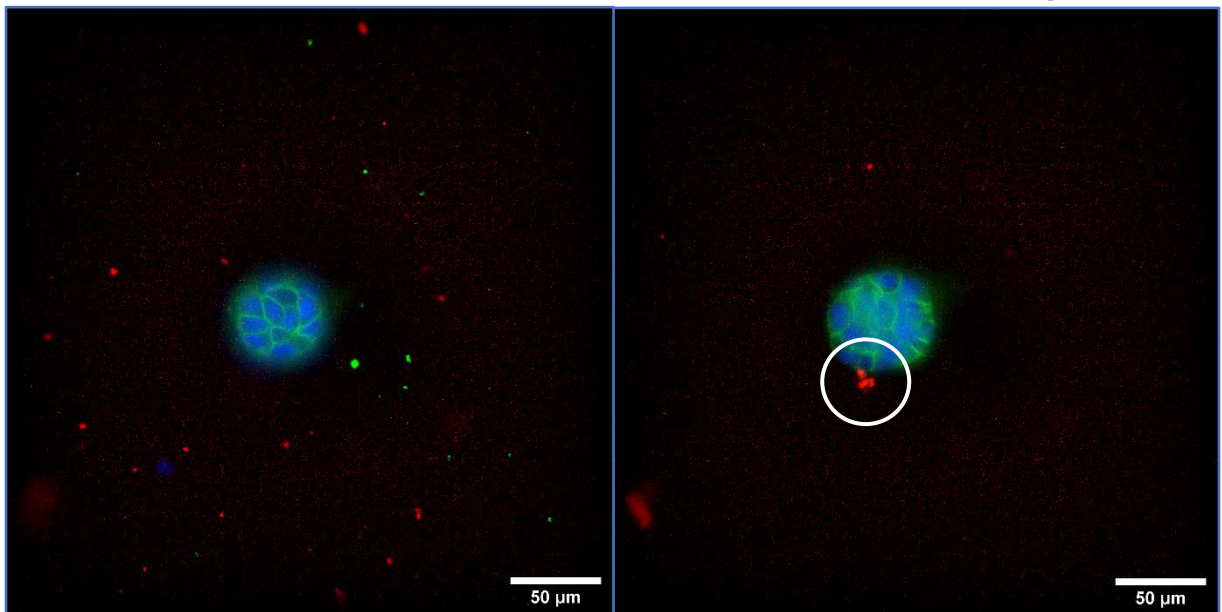
Fig. 52 Results 3.4, 3.5 and 3.6



[font pròpia]

In these results, I can see that if I focus on the superficial part of the spheroids, it can be seen some nanoparticles surrounding the groups of cells. But if I take another focus, it can be seen a few nanoparticles that are close to the spheroids. Even some of them are being internalised.

Fig. 53 Result 3.7



[font pròpia]

In the last result, I can see that if I focus on the spheroid I can see that there are many particles around it. But when I take another focus I can see some nanoparticles joined close to the spheroid, although they have not internalised yet.

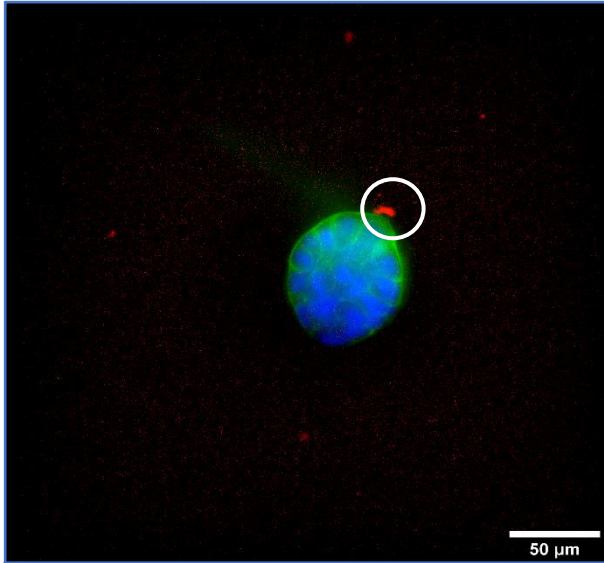
d) Cells (RT4s) and Nanoparticles (MSNPs) with antibody (Ab) and urea (fuel):

GENERAL IMPRESSION:

At last, I have observed the sample with nanoparticles with antibodies and fuel. In this sample, I haven't seen almost any difference between this one and the previous ones. It's been hard to find cells surrounded by nanoparticles, but I have finally found some of them with some nanoparticles around them.

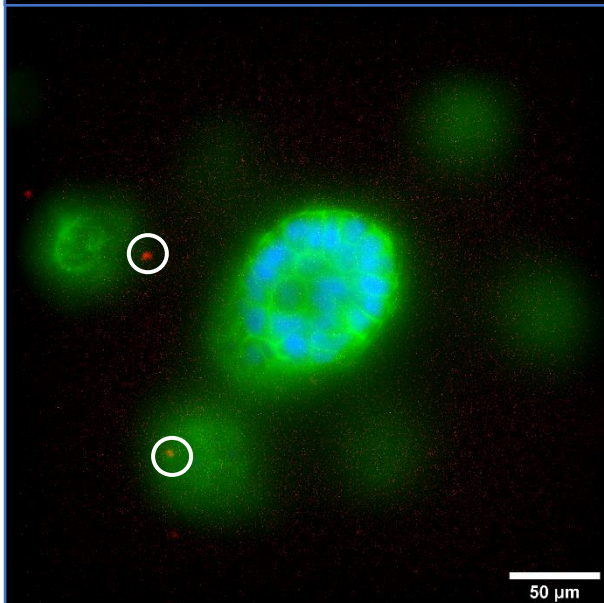
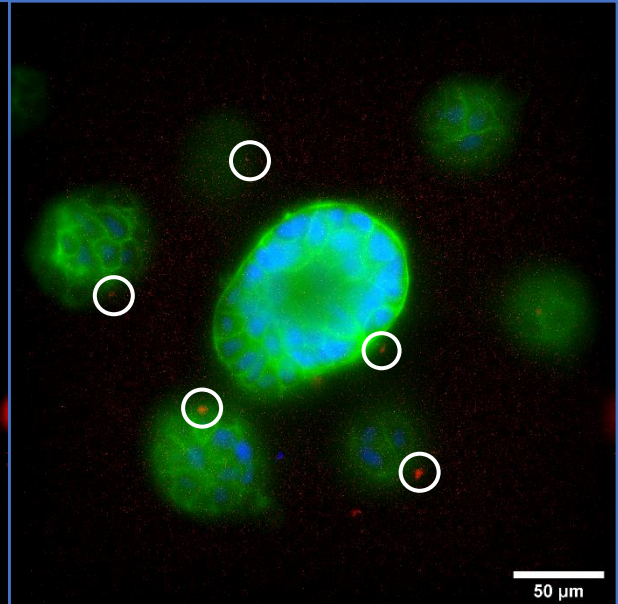
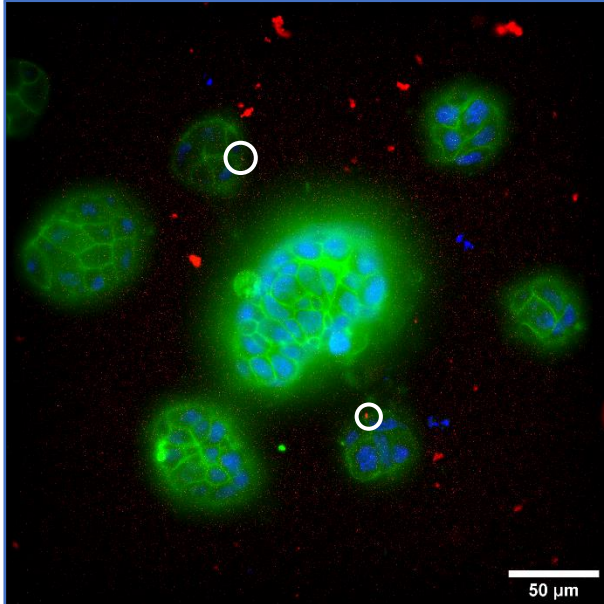
RESULTS:

Fig. 54 Result 4.1



In the first result I got, I can see that there are some nanoparticles just next to one spheroid, but it seems that they have not internalised yet.

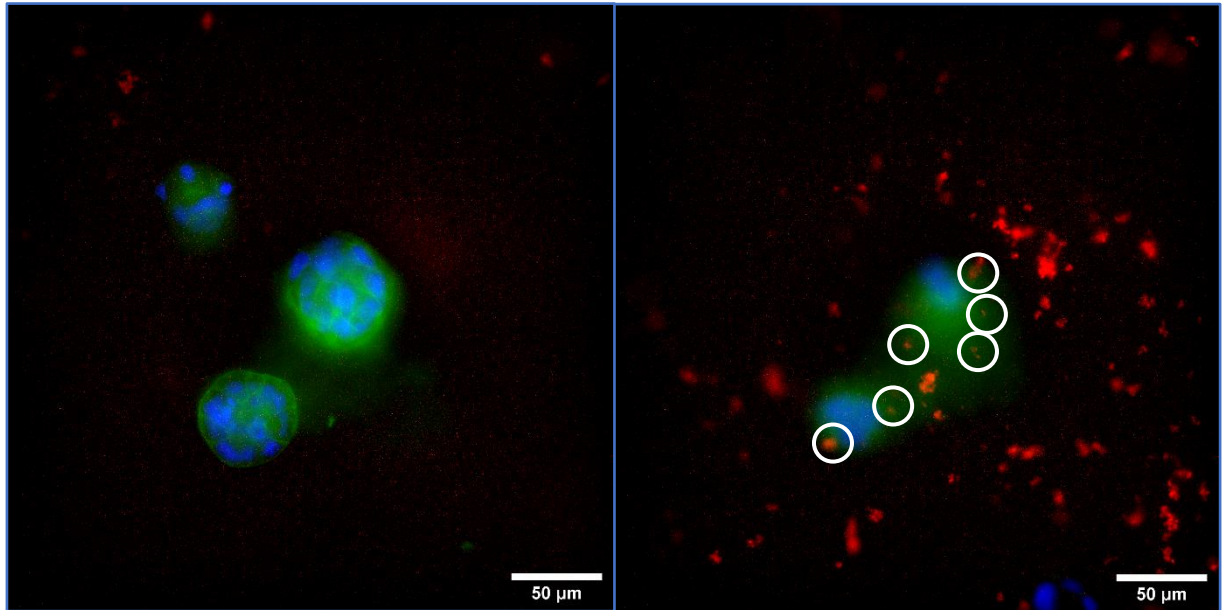
Fig. 55 Result 4.2



In the second result, I can see in different focus that there are some nanoparticles around a group of spheroids, and from all of these different focuses I can see nanoparticles that have internalised in spheroids.

[font pròpia]

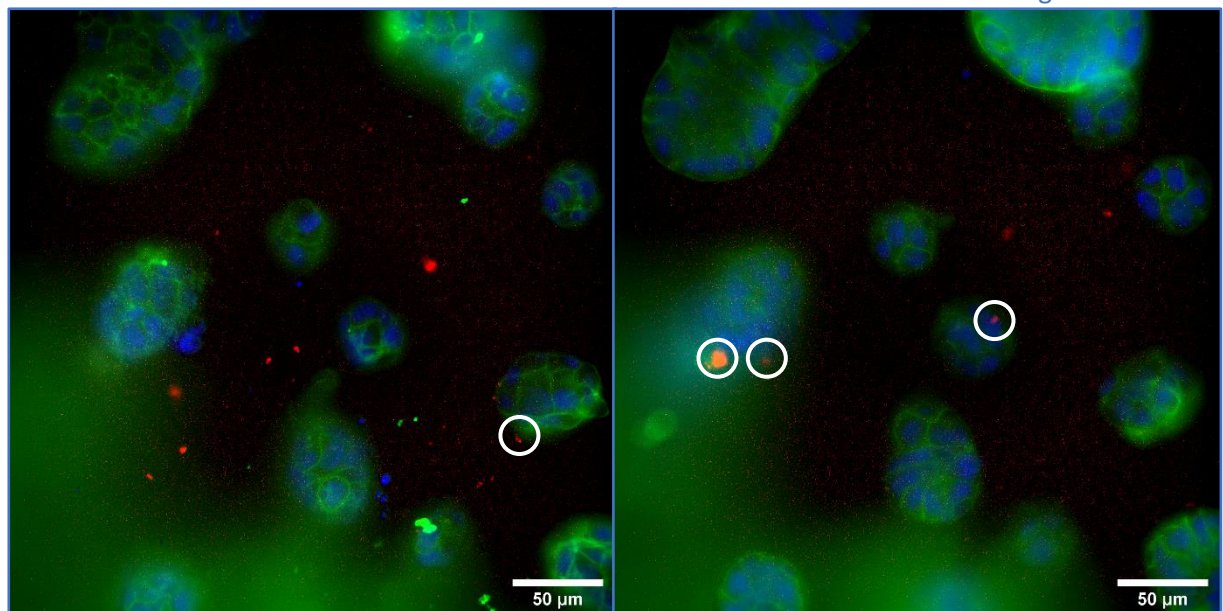
Fig. 56 Result 4.3



[font pròpia]

In the first focus, it seems that there are not any nanoparticles around these spheroids. But when I focus on the other face of the spheroid, I can see many of them. Some of those have internalised inside the spheroids.

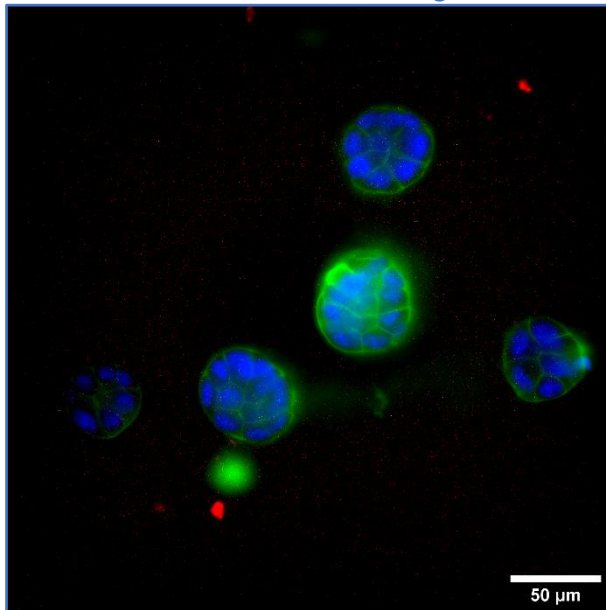
Fig. 57 Result 4.4



[font pròpia]

As the previous, in this result, I can see that in different focuses I see that some nanoparticles have been internalised inside the spheroids.

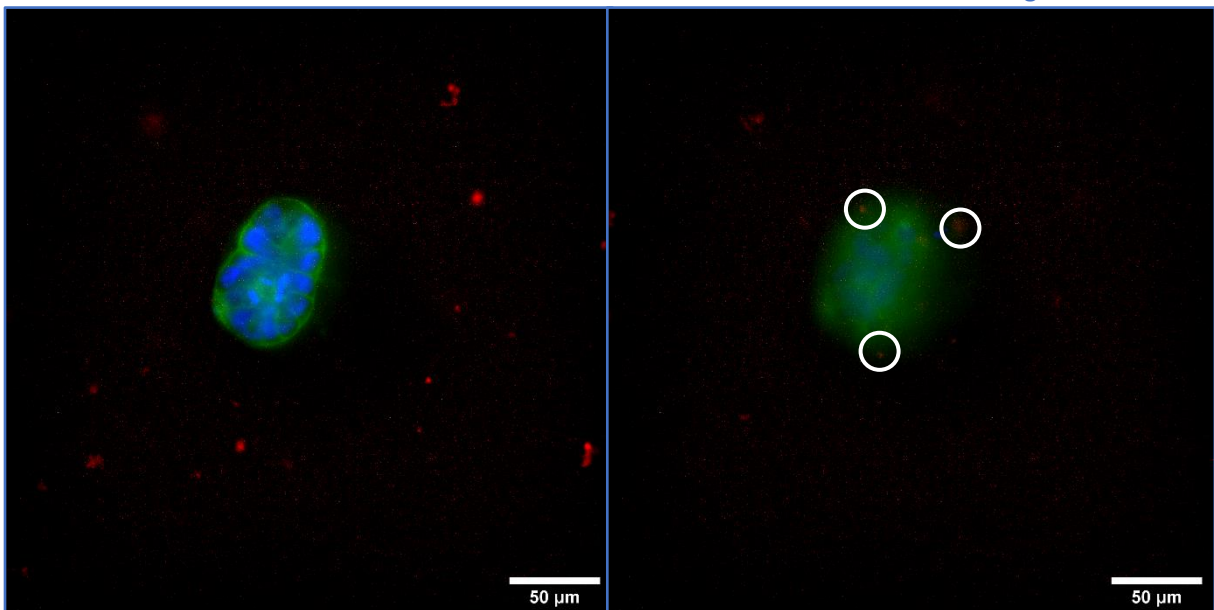
Fig. 58 Result 4.5



[font pròpia]

In the next result I can see that there is a very small quantity of nanoparticles around the spheroids and also, I cannot see any nanoparticle that has internalised inside the spheroids yet.

Fig. 59 Result 4.6



[font pròpia]

In the last result I have taken, I can see how, as in other previous results, there are some nanoparticles around the spheroid and, if I focus the other face of the spheroid, I can see (although not very clearly) how some of them have internalised.

3.2.4. Microfluidic Chips

This part of my research is a complement to what my main objective was. As I had the opportunity to take part in this process, I decided to carry on with it.

The objective of this extra experiment was to realize some 3D printing of microfluidic chips made of resin, in which the nanomotors would be transferred and later on and visualized with PET-CT.

Therefore, medical imaging techniques would be used to visualize nanomotors, first in vitro and then in vivo. Two weeks after the assays are realised with these microfluidic chips, the nanomotors would be injected into mice and we would see how they distribute in the bladder. The ultimate goal is that nanomotors can navigate the bladder, transport drugs specifically to a tumour and that they can be visualized by medical imaging techniques.

Due to the lack of time and experience, my tasks in IBEC were: working with 3D printing to create microfluidic chips with different designs and sizes to imitate veins or arteries and finally know how nanomotors perform in this type of structure.

a) Design the Microfluidic Chips

The Microfluidic Chips were already designed, but I had to fit them into the proportions needed and arrange them creating a structure so that the 3D Printer will be able to print them later on.

Fig. 60 Disenys chips de microfluídica



[font pròpia]

b) Print the Microfluidic Chips

When they are ready, they will be transferred to the 3D-printer. Depending on the layers created, the process will become slower, but also more accurate.

c) Remove the Microfluidic Chips and clean

When the printing is done, I will have to remove carefully the Microfluidic Chips from the Printer. Then, I am going to clean them with isopropanol.

d) Cure the Microfluidic Chips

After cleaning the prototypes, I will cure them in a Machine where heat and ultraviolet light will be used for them to reach their best functional properties.

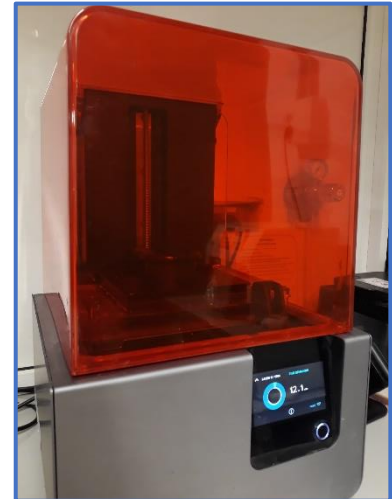
e) Remove the supports

The last step consists of removing the supports that have been created while printing. If desired, the microfluidic chips can be sanded so that imperfections don't remain.

RESULTS & PROBLEMS:

Apparently, the 3D-printer I used to create the samples didn't work out properly, as all the samples sent to it ended up having some problems and lots of imperfections, a fact that stood in the way of the Microfluidic Chips' function.

Fig. 61 3D-printing



[font pròpia]

Fig. 62 Microfluidic chips curing



[font pròpia]

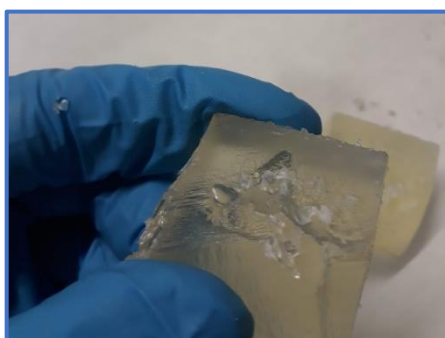
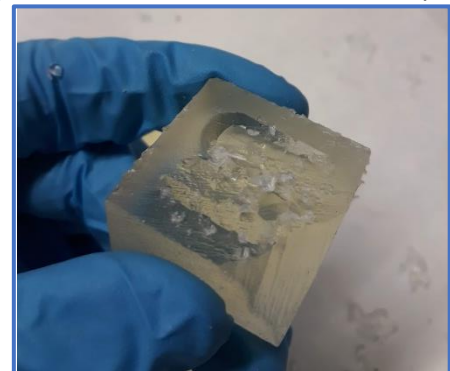


Fig. 63 & 64 Defective Microfluidic chips



[font pròpia]

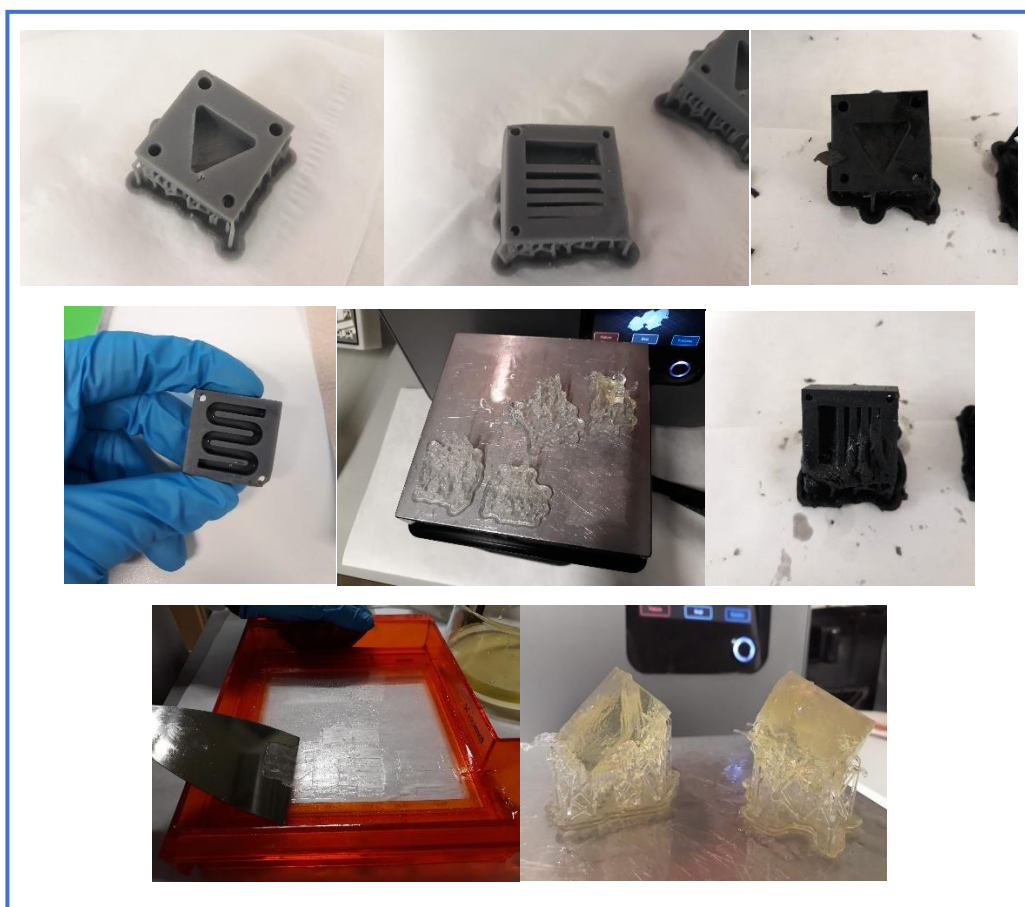
SOLUTION 1:

The first thing I tried was printing the Microfluidic Chips with other types of resins. I tried with the grey and the black one, which also have different properties. Despite that, the results still were faulty.

SOLUTION 2:

After seeing the results, I decided to try to create some holes near each corner of the Microfluidic Chips. This update would make the excess of resin to fall through them and there would be fewer flaws and imperfections. After trying this update with different types of resin again, I observed that, in some cases, there were some improves, but as the future assays must be very precise to see how the nanoparticles behave without any kind of outside intervention, it was not still enough. Therefore, we decided to contact Formlabs and ask them for some advice and help to fix the printer, and so I left this part of the investigation for future researches.

Fig. 65 More defective Microfluidic chips



[font pròpia]

4. CONCLUSIONS

En conclusió, pel que fa als objectius del treball, els he pogut complir tots.

Per una banda, he aconseguit, per descomptat, estudiar si les nanopartícules es dirigeixen cap a les cèl·lules canceroses depenent de si hi ha presència de fuel i/o anticòs.

D'altra banda, he pogut obtenir un munt d'informació sobre el càncer i la nanociència que després he resumit en aquest treball. He fet recerca a algunes de les webs amb més informació fiable com ho és la de l'Institut Nacional del Càncer. També recerca bibliogràfica amb llibres com "*el Nanomundo en tus manos*" o articles científics com "*Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery*". I a més he entrevistat a experts com al doctor Jordi Rubió. A més, he pogut aprendre a fer servir tots els programes informàtics necessaris per extreure'n les dades que he necessitat per fer la caracterització de les nanopartícules i les conclusions.

Cal dir que no tot el coneixement que m'ha aportat aquesta recerca es pot veure en aquestes pàgines. Les pràctiques les he dut a terme en un ambient de treball amb persones amb un nivell, científic i acadèmic, molt més avançat que el meu. Del tema que he fet recerca inicialment en sabia relativament poc i tot plegat ha estat un gran repte que ha comportat certa dificultat. També he après molt més, fins i tot part d'aquest coneixement que he obtingut estic segur que ara mateix ni en sóc conscient.

Pel que fa a la meva hipòtesi, un cop he realitzat els experiments he pogut comprovar que era en part correcta. Abans de comparar els resultats, cal dir que caldria fer més experiments per treure'n una conclusió més clara.

Així, el resultat en els experiments de les nanopartícules sense fuel i sense anticòs era l'esperat. En ambdós casos hi havia presència de nanopartícules a prop de les cèl·lules i poques d'aquestes s'havien internalitzat en els esferoides.

En el cas de les partícules sense una de les dues condicions (fuel o anticòs), hi havia més esferoides amb les cèl·lules del que s'havia esperat. Com que per una banda les nanopartícules no es podrien moure molt i per l'altra aquestes mateixes no reconeixien

a les cèl·lules, jo pensava que les nanopartícules no s'arribarien a internalitzar als esferoides. Possiblement en el cas de les nanopartícules amb fuel el factor de l'atzar haurà intervingut, tant en el lloc on s'aboquen les nanopartícules (si acaben a prop o no d'esferoides), com en la direcció a la que es dirigirien aquestes mateixes (cap als esferoides o no). Els resultats mostren que es poden trobar cèl·lules amb nanopartícules amb més probabilitat de l'esperada.

En el cas de les cèl·lules només amb anticòs, l'atzar haurà influït igual que en la resta d'experiments, però en aquest cas el fet que les nanopartícules sabessin cap a on s'havien de dirigir, tot i no tenir una bona propulsió, ha augmentat les probabilitats de trobar-ne dins dels esferoides, potser fins i tot més que el cas anterior.

Finalment, amb les primeres fotografies, la primera conclusió que havia abstret dels primers resultats de les nanopartícules amb fuel i anticòs refutava la hipòtesi, ja que les fotografies no tenien color, i sense identificar ben bé el que es veia representat a la foto no podia trobar moltes nanopartícules. En canvi, un cop vaig tenir les fotografies amb els marcadors dels colors corresponents, vaig poder veure que realment les nanopartícules es trobaven en un gran nombre d'ocasions dins els esferoides, i per això no en trobava tantes com en els altres casos.

Una altra dificultat ha sigut el temps. Si se'n disposés de més, per tal de completar aquesta recerca es podria realitzar l'experiment més d'una vegada per poder comparar els resultats i així obtenir-ne de més fiables. També es podria acabar la pràctica amb els xips de microfluídica i fins i tot, anar més enllà i comparar els obtinguts [in vitro](#) [15] amb els que es podrien obtenir [in vivo](#) [16] internalitzant les nanopartícules en ratolins de laboratori.

[15] Veure Glossari núm. 8

[16] Veure Glossari núm. 9

5. GLOSSARI

5.1. Termes oncològics

1. **ANTICÒS.** Glucoproteïnes segregades pels limfòcits de la sang amb l'objectiu de combatre una anomalia detectada pel sistema immunitari.
2. **ANTIGEN.** Molècula que és reconeguda com a estranya per l'organisme. Per aquest motiu el sistema immunitari sol identificar-lo i produir una resposta immunitària i producció d'anticossos.
3. **BASES NITROGENADES.** Compostos orgànics que formen la unitat bàsica del DNA.
4. **GANGLIS LIMFÀTICS.** Cèl·lules del sistema immunitari presents en els òrgans del nostre cos. Tenen una forma de fesol, i sovint són on primer es propaguen els càncers.
5. **HORMONES MITÒGENES.** Hormones inductores de mitosi, divisió cel·lular.
6. **SISTEMA IMMUNITARI.** Està compost per glòbuls blancs i òrgans i teixides del sistema limfàtic. La seva funció és combatre les infeccions i altres malalties.
7. **TERÀPIA BIOLÒGICA.** Tractament que utilitza substàncies produïdes per organismes vius per tractar el càncer.

5.2. Scientific terms – Termes científics

8. **IN VITRO.** Procés que es produeix en el laboratori i no en una cèl·lula viva.
9. **IN VIVO.** Procés que té lloc dins d'un organisme.
10. **PATHOGEN.** An infectious biological agent that causes a disease or disorder to its host.
11. **PELLET.** Part of the sample wanted. When the sample is centrifuged, it is usually the white or coloured liquid which remains on the bottom of the tube. It is frequently needed to vortex the pellet after centrifuging and removing the supernatant as it adopts a consistent conformation.
12. **SUPERNATANT.** Part of a sample that contains the excess liquid. When the sample is centrifuged, it is usually the transparent liquid that remains on the top.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1. Pàgines web

Cancer [En línia] [World Health Organization (WHO)].

<<https://www.who.int/topics/cancer/en/>> [Consulta: 19 juny 2019].

Càncer [En línia] [Canal Salut. Generalitat de Catalunya].

<<http://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer>> [Consulta: 19 juny 2019].

El cáncer [en línia] [Instituto Nacional del Cáncer (NIH)].

<<https://www.cancer.gov/espanol>> [Consulta: 18 juny 2019].

Lab Equipment [Biocompare] <https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/> [Consulta: 9 agost 2019].

¿Qué son las nanopartículas? [en línia] [Nanotec] <http://www.nanotec.es/que-son-las-nanoparticulas> [Consulta: 5 agost 2019].

Nanomedicine [en línia] [Nature] <<https://www.nature.com/subjects/nanomedicine>>

[Consulta: 3 agost 2019].

NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATIONS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY [en línia] [National Center for Biotechnology Information]

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3865110/#S2title>> [Consulta: 5 agost 2019].

Nanoscience vs nanotechnology [En línia] [Science.org]

<https://www.science.org.au/curious/technology-future/nanoscience-vs-nanotechnology> [Consulta: 26 agost 2019].

Sobre Nosaltres [en línia] [Barcelona: Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC)].

<<https://www.ibecbarcelona.eu/ca/about-us-2/benvinguda/>> [Consulta: 10 juny 2019].

6.2. Articles

TRAN, Stephanie [et al.]. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clinical and Translational Medicine* (2017).

SHI, Jinjun [et al.]. *Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities*. *Nature Reviews Cancer* (vol. 17, pàg. 20-37). Publicat online, 2016.

BLANCO, Elvin; SHEN, Haifa; FERRARI, Mauro. *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*. *Nature biotechnology* (vol. 33, núm. 9, pàg. 941-951). Publicat online 2015.

6.3. Llibres

JIMENO, Antonio. *Biologia*. Barcelona: Santillana, 2016.

MARTÍN-GAGO, José [et al.]. *El Nanomundo en tus manos*. Barcelona: Editorial Planeta, 2014.

Molta part de la informació que he obtingut per a realitzar aquest treball l'he obtingut d'altres fonts: pel que fa al càncer, l'entrevista al Dr. Jordi Rubió (Oncòleg mèdic de l'ICO de Girona) sobre el càncer de bufeta i els seus tractaments actuals; i pel que fa a la nanomedicina, les consultes sobre el procediment experimental, teòric i tècnic, a la Dra. Tania Patiño, a la Dra. Ana Hortelão i al tècnic de laboratori Angel Blanco (membres de l'Smart-Nano-Bio Devices group, de l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya).

7. ANNEXOS

7.1. ANNEX 1. L'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC)

La part pràctica del treball es realitzarà als laboratoris de l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), i per això m'ha semblat adient recollir una mica d'informació sobre aquest.

L'IBEC és un centre de recerca interdisciplinària d'excel·lència en les fronteres de l'enginyeria i les ciències de la vida, i busca generar nou coneixement des d'àrees com la nanomedicina, la biofísica, la biotecnologia, l'enginyeria de teixits i les aplicacions de les tecnologies de la informació en salut.

L'IBEC, amb seu a Barcelona, va ser creat l'any 2005 pels departaments d'Innovació, Universitats i Empresa i de Salut de la Generalitat de Catalunya, per la Universitat de Barcelona (UB) i per la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).

Actualment, l'Institut té 21 grups de recerca i 250 investigadors, així com personal procedent de 20 països diferents. Es troba ubicat al Parc Científic de Barcelona, un entorn biomèdic molt estimulant, i que li permet treballar de manera estreta amb organismes públics i privats interessats en les aplicacions biomèdiques de la nanotecnologia.

A més a més, es podria dir que l'IBEC, juntament amb l'Institut Fraunhofer d'Enginyeria Biomèdica (IBMT) o l'Institut Nacional de Bioenginyeria i Imatges Biomèdiques (NIBIB-NIH, EUA), és un institut model que representa l'evolució dels instituts biomèdics del segle XX.

7.2. ANNEX 2. Entrevista al Dr. Jordi Rubió

1. Quines són les fases de desenvolupament d'un nou tractament?

La primera fase dels estudis clínics d'un nou tractament és la FASE 0, en la que es prova el tractament en línies cel·lulars i després en rates de laboratori. La FASE 1 és quan ja es passa a fer les proves en humans, que solen ser pacients amb un càncer molt avançat el tractament actual del qual no seria vàlid. En aquesta fase es troba la dosi i l'eficàcia en quin tipus de tumors. Llavors a la fase 2, que ja coneixes la dosi i el tipus de tumor, es troba l'índex de resposta, que és quin percentatge es redueix el càncer i en quin percentatge de gent. També es troba quant dura la resposta i quan sobreviuen els malalts. En la FASE 3 es compara amb els medicaments actuals, i si és millor, se substitueix. Generalment s'acaba en aquesta FASE, però també existeix la FASE 4 en la que es fa el que es diu la farmacovigilància, que són els estudis per saber si realment el tractament funciona o hi ha factors que no s'esperaven. Tot i això, no se sol fer actualment, ja que quan s'arriba a la FASE 3 vol dir que ja ha passat totes les proves de "seguretat".

2. Com es classifica l'evolució del càncer de bufeta?

Segons el sistema TNM.

La T (que ve de Tumor) és el creixement del tumor primari. Un Ta és quan no passen de la membrana basal. Un T1 és quan han passat la membrana basal, han travessat aquesta zona que hi ha intermèdia on passen algunes venes o artèries però no han arribat al múscul. Un T2 és quan ja han arribat a la membrana muscular. Un T3 és quan arriben a la capa on s'acaba la bufeta però no l'envaeix, i un T4 és quan ja surt de la bufeta i ja t'està agafant algun òrgan adjacent.

La N (ve de Nòduls) és que tots els nostres òrgans s'envolten de ganglis limfàtics, que és el primer lloc on van les cèl·lules tumorals. Per tant, quan les cèl·lules arriben als ganglis hi ha la N1 2 o 3, depenent de *lo* lluny que es trobin les cèl·lules.

La M és si hi ha o no metàstasi (M0 o M1).

3. Quins són els estadis que recullen les dades anteriors i els tractament?

L'estadi I, és que el tumor està evadint la capa més superficial de la bufeta, però sense envair el múscul. A l'estadi II, el tumor està al múscul de la bufeta, i es podria produir metàstasi. A l'estadi III, el tumor ha envaït tot el teixit que envolta la bufeta o òrgans adjacents. També haurà afectat als ganglis limfàtics. A l'estadi IV, el tumor ja hauria envaït tota la paret de la pelvis o l'abdomen, ganglis limfàtics o hi hauria metàstasi.

(dibuixa i explica la següent taula)

ESTADI	TNM	TRACTAMENT
Estadi I	Ta - T1 N0 M0	RTU i Quimioteràpia intrevesical. Medicaments com la mitomicina o BCG (bacil de Calmette-Guerin).
Estadi II	T2 - T4 N0 M0	Cistectomia, i a vegades Quimioteràpia (T4). En algun T4 també es pot començar amb QT com en estadi III.
Estadi III	T1 - T4 N1 - N3 M0	Quimioteràpia primer i si es factible cirurgia. A vegades cal radioteràpia. Alguns estadi III es reconeixen després de la cistectomia en analitzar els ganglis i veure que estan afectats, aleshores es realitza quimioteràpia després de la cirurgia.
Estadi IV	Ta - T4 N1 - N3 M1	Quimioteràpia i Immunoteràpia.

4. Com es diagnostica un càncer de bufeta?

Quasi sempre és una hematúria (sagnat). El primer que fas és que el capçalera (metge) t'envia a l'uròleg. Aquest et demana un TAG, ja que podrà veure si hi ha metàstasi o ganglis afectats. També es fa una RTU (Resecció TransUretral), que consisteix en passar un tub que mira la bufeta, veu el tumor i te'l treu tot sencer, i amb el mateix acte es fa el diagnòstic i el tractament. També es podria fer una Ecografia de la bufeta per veure el tumor.