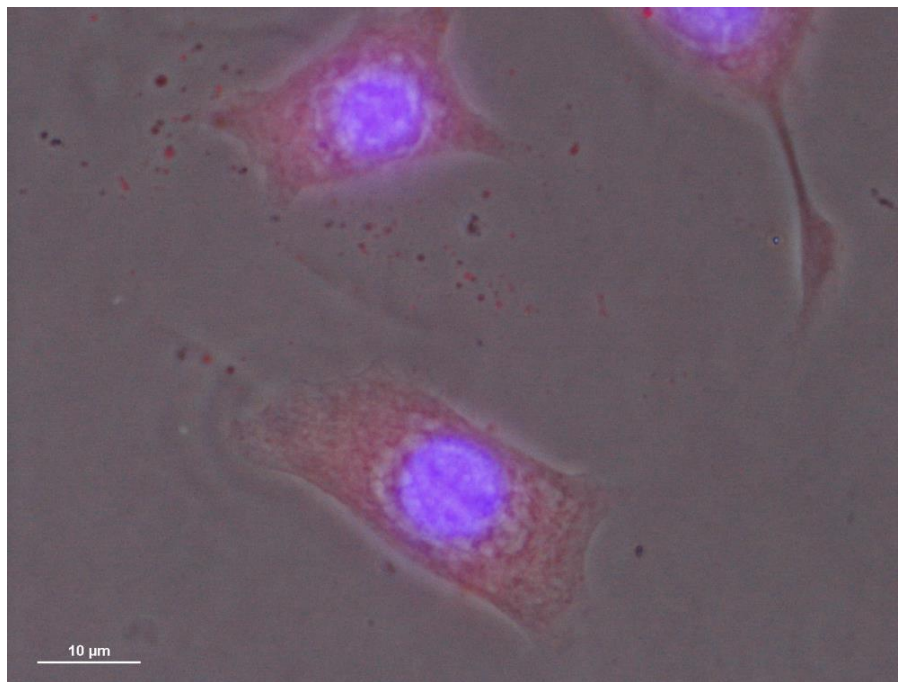


ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?



Pseudònim: Nettie Steven Nanopharmaceuticals

AGRAÏMENTS

En primer lloc voldria començar agraint a la meva tutora del treball de recerca, la qual m'ha guiat durant tot aquest temps i m'ha ajudat i donat suport sempre que ho he necessitat.

En segon lloc, evidentment cal destacar el Programa Argó pel qual sento un agraïment indubtable, ja que sense ell aquest treball de recerca no hagués estat el mateix i segurament no hagués ni estat possible. Per tant vull remarcar aquest agraïment en majúscules per aquesta gran oportunitat de la qual he tingut la immensa sort de gaudir, en un entorn universitari i amb eines a l'abast que no podria haver aconseguit de cap altra manera. Però, sens falta, vull agrair sobretot a la meva tutora de la universitat, la qual m'ha anat orientant al llarg de tot el treball i que m'ha introduït en aquest món de la nanomedicina que abans desconeixia pel complet. M'ha anat guiant en els moments que més ho he necessitat i sobretot m'ha omplert amb el seu coneixement.

Juntament amb la tutora de l'universitat voldria agrair també al David Montpeyó i a l'Eddi Paradas, ja que em van estar ajudant a desenvolupar la part pràctica del meu treball de recerca al laboratori.

Per últim, però no per això menys important, voldria agrair a la meva mare, la qual m'ha donat un immens suport i m'ha suportat durant tot aquest temps, però que sobretot m'ha transmès aquesta passió que tinc pel món de les ciències, el qual m'ha dut a acabar escollint aquest treball de recerca. Evidentment també vull donar les gràcies al meu pare i als meus germans que han cregut i confiat en mi i que m'han ajudat en els moments que més ho he necessitat.

ABSTRACT

In the last decades, the development and design of drug delivery systems have attracted great attention. Specially in the fields in search of new and more efficient cancer treatments. These innovative drug delivery systems are what we call nanopharmaceuticals, which basically consist in nanoparticles that carry chemotherapy drugs to tumor cells directly. This provides us with lots of benefits, such as the reduction of secondary effects.

The main objective of this review is to help in the understanding of what nanopharmaceuticals really are and how they work. In order to demonstrate their functionality, I have gone through different experiments which consisted in the synthesis of PLGA nanoparticles and their introduction in cervical cancer cells.

This review highlights the possibility of implementing nanopharmaceuticals in cancer treatment, because as we will see in this project, the benefits nanopharmaceuticals carry within them are numerous.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	4
MARC TEÒRIC	7
1. ELS FÀRMACS CONVENCIONALS.....	8
2. QUÈ SÓN LA NANOTECNOLOGIA I LA NANOMEDICINA?	11
3. ELS NANOFÀRMACS	13
4. DISTRIBUCIÓ DIRIGIDA DELS NANOFÀRMACS.....	19
5. BENEFICIS DELS NANOFÀRMACS	22
6. CLASSIFICACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES	24
6.1. LES NANOPARTÍCULES DE PLGA	32
7. EL CÀNCER.....	36
7.1. EFECTES SECUNDARIS DELS TRACTAMENTS ANTITUMORALS.....	39
7.2. LÍNIA CEL·LULAR HELA	41
8. NANOFÀRMACS PEL TRACTAMENT DEL CÀNCER APROVATS O EN ESTUDIS	43
PART PRÀCTICA	45
9. INTRODUCCIÓ A LA PART PRÀCTICA.....	46
9.1. PRÀCTIQUES DIA 1.....	49
9.2. PRÀCTIQUES DIA 2.....	64
9.3. PRÀCTIQUES DIA 3.....	81
9.4. PRÀCTIQUES DIA 4.....	101
9.5. COMPARACIÓ DEL DOXIL I DE LA DOXORUBICINA.....	112
10. CONCLUSIONS.....	114
11. GLOSSARI	117
12. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA.....	119

INTRODUCCIÓ

Sempre he sentit una gran passió envers les ciències, és cert que fins fa relativament poc no tenia gaire idea de quina carrera estudiar, però desde petita vaig tenir clar que preferia els números per davant de les lletres. Per tant, com us podeu imaginar, alhora d'escollir tema pel treball de recerca tenia molt clar que volia que tingués relació amb el món científic, però tot i així, em sentia molt perduda ja que no sabia cap a on enfocar-lo.

Per sort, els meus dubtes es van aclarir just quan vaig entrar a la web del Programa Argó. No sé com descriure-ho però només entrar en l'apartat de ciències i llegir un parell de frases vaig saber de què aniria el meu treball de recerca: dels nanofàrmacs. Els altres temes també em resultaven interessants, però cap em va cridar l'atenció, ni l'interès, ni va despertar una passió en mi com ho van fer els nanofàrmacs.

Per aquells que el desconeixeu, el Programa Argó otorga l'oportunitat a alumnes de batxillerat de dur a terme el treball de recerca a les instal·lacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota l'assessorament d'un/a professor/a especialista en el tema. Com és evident, per tant, no puc seguir sense tornar a agrair aquesta increïble oportunitat i experiència que vaig tenir la sort de realitzar. El fet de poder dur a terme les meves pràctiques a laboratoris de la universitat, em va donar una perspectiva de com funciona el món de la recerca i de l'investigació que abans no tenia i em va proporcionar les eines per dur a terme un treball de recerca molt més desenvolupat.

Els camps de la nanomedicina i de la nanotecnologia són molt amplis i aborden molts problemes del món actual, és difícil fer-se a la idea de tot el gran contingut que hi ha i que se'n pot extreure del món nanomètric. Quan parlem de nanomedicina i nanotecnologia d'entrada ens semblen ciències del futur, però la

realitat és que actualment ja n'utilitzem en el nostre dia a dia, fins i tot hi ha molts estudis en relació amb aquests àmbits i cada cop hi ha més i més avenços.

Els nanofàrmacs neixen de la necessitat de millorar els sistemes de distribució dels fàrmacs actuals. Actualment en els fàrmacs convencionals que prenem, només entre el 5 i el 3% de la dosi presa ens arriba a la zona desitjada, la resta es perd per degradació o perquè arriba a zones no afectades i això provoca, entre diversos inconvenients, els efectes secundaris.

Els efectes secundaris en segons quins fàrmacs poden arribar a ser molt greus. Sobretot en el cas del càncer, ja que els fàrmacs que s'utilitzen en la quimioteràpia són molt tòxics. Els efectes secundaris de la quimioteràpia són tan greus que poden arribar a ser la causa de mort d'alguns pacients. Quan vaig començar a informar-me del que eren els nanofàrmacs, per tant, vaig voler focalitzar el meu treball en la millora i en els beneficis que aquests poden aportar al tractament del càncer. I la meva hipòtesis, per tant, gira entorn això ja que crec que els nanofàrmacs podrien ser la solució als efectes secundaris de la quimioteràpia.

Pel que fa a l'estructura del meu treball de recerca, l'he dividit en dos parts bàsiques (la part teòrica i la part pràctica): la primera part del meu treball es centra sobretot en la comprensió dels nanofàrmacs, en la bona entesa del seu funcionament i els grans beneficis que ens aporten de cara al càncer. A més també em centro en el càncer i els principals inconvenients de la quimioteràpia, per a comparar-ho després amb la nanomedicina. La funció principal d'aquesta primera part és donar una base per a facilitar la comprensió de la meva hipòtesi i de les pràctiques que he dut a terme per comprovar-la.

La segona part del meu treball de recerca es centra en la comprovació a través del mètode científic de la meva hipòtesi: **Els nanofàrmacs amb nanopartícules de PLGA podrien servir com a millora del tractament del càncer de cèrvix.** És a dir, aquesta segona part es basa en les pràctiques que vaig dur a terme al

laboratori de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona a principis de Juliol.

La meva hipòtesi sempre ha girat entorn als nanofàrmacs per a millorar el càncer, però a mesura que m'he anat informant més del tema i que he anat adquirint més coneixements, he anat especificant la meva hipòtesi per a que es centrés en un cas en concret per tal de que la seva comprovació fos possible. He d'admetre que quan vaig començar el treball de recerca em va costar decidir cap a quin tipus de càncer volia enfocar la meva hipòtesi. Durant molt de temps vaig estar organitzant el meu treball al voltant d'un glioblastoma (càncer de cervell). Vaig estar a punt de participar en una pràctica amb una noia que realitzava el seu treball de final de grau de la síntesis d'una nanopartícula que tractés un glioblastoma, però malauradament es va complicar i no va ser possible.

Us convido per tant, a gaudir llegint el meu treball de recerca i a ampliar el vostre coneixement amb alguns dels increïbles avenços que desconeixem però que es duen a terme dia a dia en el món de la recerca científica.

MARC TEÒRIC

1. ELS FÀRMACS CONVENCIONALS

Què prenem quan tenim mal de cap? I quan tenim una inflamació? O quan tenim dolor muscular? La pregunta és bastant fàcil de respondre, un paracetamol o un ibuprofè. I no us pregunteu com pot ser que el paracetamol ens alleugi dolors tan diferents i en punts tan distants del nostre cos? Doncs això és degut a que el paracetamol és un fàrmac general que es distribueix de forma sistèmica pel nostre cos, com la majoria dels fàrmacs convencionals.

La majoria dels fàrmacs que prenem avui en dia per via oral o per injecció, es distribueixen pel nostre cos de manera descontrolada a través del sistema de circulació sanguini. Aquesta distribució homogènia del medicament provoca que aquest arribi tant a les cèl·lules afectades com a les no afectades en parts iguals.

Quan ingerim un fàrmac, aquest passa per diferents fases definides per la farmacocinètica. Aquestes fases són l'alliberació, l'absorció, la distribució, el metabolisme i l'excreció. Durant algunes d'aquestes fases, però, el fàrmac es troba amb una sèrie de barreres que en provoquen la seva degradació i que es perdi gran part del fàrmac.

Els fàrmacs que prenem per via oral, en la fase d'absorció, es troben amb l'estómac. Els fàrmacs ionitzats no travessen barreres, en canvi els no ionitzats travessen les barreres. Amb els fàrmacs àcids a l'estómac no hi ha problema, ja que com que no ionitzen, travessen la barrera sense dificultats. El problema són els fàrmacs bàsics, els quals són la majoria, perquè a l'estómac els líquids àcids que allibera afavoreixen molt la ionització del fàrmac, el qual fa que l'absorció sigui difícil i que per tant una part es degradi.

A més, els fàrmacs es troben amb barreres difícils de travessar, com bé la paret gastrointestinal, la qual també degrada part del fàrmac, ja que no permet passar a qualsevol tipus de substància.

Durant la fase de distribució, diferents tipus de proteïnes vehiculitzades en el plasma sanguini s'adhereixen a gran quantitat del fàrmac alliberat. La unió de fàrmacs i proteïnes generalment es produeix a través d'enllaços iònics, ponts d'hidrogen, forces de Van der Waals i, amb menys freqüència, enllaços covalents. El problema és que només els fàrmacs lliures poden travessar la majoria de les membranes biològiques i interaccionar amb les dianes i ser eficaços.

Un altre problema amb el que es troben els fàrmacs són els enzims, a la fase de metabolisme. Aquests reconeixen aquesta substància estranya que es troba a l'organisme, i com a mètode de defensa per al nostre cos, per tal de contrarestar els possibles efectes perjudicials: els enzims degraden, oxiden, redueixen i hidrolitzen part del fàrmac. Això provoca la pèrdua d'una part de la seva estructura i en la major part dels casos també perden l'efecte.

Totes aquestes condicions provoquen que els fàrmacs sistèmics tinguin una sèrie de conseqüències i inconvenients. Aquests són la distribució homogènia, les diferents barreres fisiològiques a les que es sotmeten els fàrmacs, les diferents proteïnes plasmàtiques que s'hi adhereixen i els enzims -els quals provoquen una pèrdua important de quantitat del fàrmac (en alguns casos, una pèrdua del 95% del fàrmac)-: hem de prendre dosis més grans per tal de que ens faci efecte en la zona desitjada.

Això provoca que el temps de detoxificació (temps que el fetge triga en eliminar el medicament del nostre cos) sigui més llarg degut a que hem pres més quantitat d'aquell fàrmac. A la llarga, l'eliminació de gran quantitat de fàrmacs danya els ronyons i el fetge, per tant com més dosis haguem de prendre d'un fàrmac, més danys es causaran als ronyons i al fetge, els quals s'encarreguen de dur a terme la fase d'excreció. A més, tampoc podem prendre quantitats excessives d'aquest fàrmac, ja que podria acabar resultant tòxic per al nostre organisme.

El fet de que el medicament arribi a cèl·lules no afectades provoca el que anomenem efectes secundaris, els quals augmenten en haver de prendre dosis més grans. En el cas del paracetamol, els efectes secundaris són pocs, però hi ha altres fàrmacs que tenen efectes secundaris molt nocius per al nostre cos, com és el cas dels fàrmacs utilitzats per a tractar malalties com el càncer. A més, el fet de que el temps de detoxificació sigui més llarg al augmentar la dosi, fa que el fàrmac romangui més temps al nostre cos, a les cèl·lules no afectades, augmentant encara més els efectes secundaris i els danys que aquests causen.

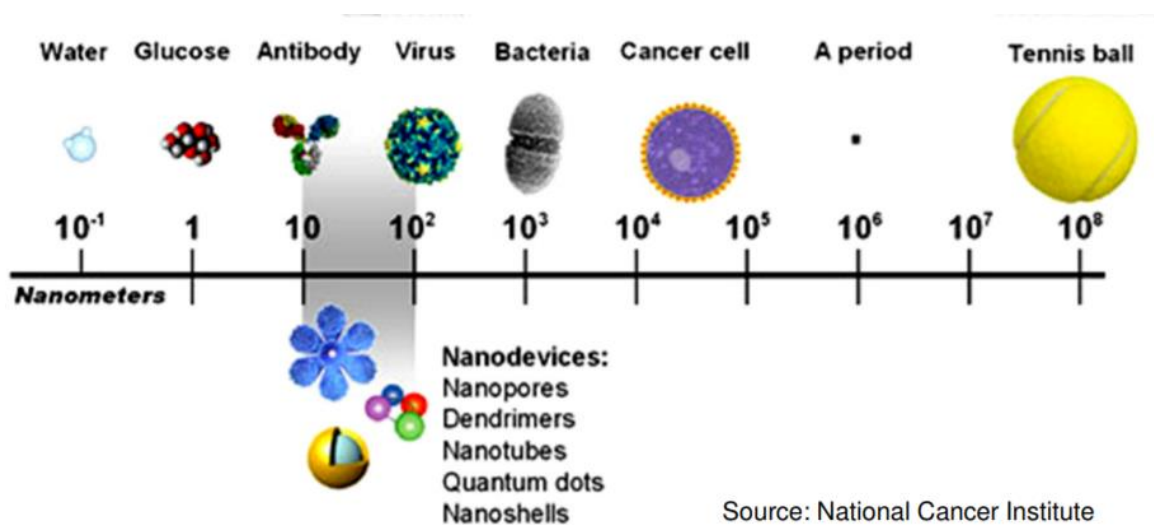
Tal i com va dir David J. Anderson (un neurobiòleg americà del “Institute of Technology” de Califòrnia): “Current medication is like getting a can of oil and pouring it all over your car engine. Some of that oil will dribble into the right spot, but the majority of it is wasted and some of it even does harm”. És a dir: “La medicina actual és com agafar un pot de benzina i abocar-lo per tot el motor del cotxe. Alguna part del combustible anirà a parar al lloc adequat, però la majoria es malgastarà i fins i tot farà malbé el motor”.

2. QUÈ SÓN LA NANOTECNOLOGIA I LA NANOMEDICINA?

Abans d'entendre com la nanomedicina (concretament els nanofàrmacs) pot arribar a ajudar-nos amb els diversos inconvenients dels fàrmacs sistèmics actuals és important fer una petita introducció del que realment és la nanomedicina i la nanotecnologia.

La nanotecnologia és l'estudi de la matèria a escala atòmica i molecular. Estrictament es refereix a la manipulació, creació i estudi d'estructures amb tamany pertanyents a l'escala nanomètrica, és a dir amb dimensions d'entre 1 i 100 nanòmetres. La manipulació de la matèria a aquesta escala ens permet construir i utilitzar materials i dispositius nous al nivell de molècules i àtoms. En el sector de la salut, per exemple, ens permet construir nous sistemes de diagnòstic o noves teràpies.

Per tal d'entendre millor l'escala nanomètrica molts cops es compara amb el metre, el qual equival a 1.000.000.000 nanòmetres. La diferència de tamany entre un metre i un nanòmetre equival a la diferència de tamany entre una castanya i el planeta Terra.



Source: National Cancer Institute

Figura 1: Escala de tamany en nanòmetres des de la mida d'una pilota de tennis fins a una molècula d'aigua. **Font:** National Cancer Institute

ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?

La nanomedicina és l'aplicació de la nanotecnologia en el camp de la medicina per tal de millorar tractaments, teràpies i sistemes de diagnòstic, o crear-ne de nous. Segons l'Institut Nacional de la Salut dels Estats Units, la nanomedicina consisteix en l'ús de dispositius que pertanyen a la micro i a la nanotecnologia pel tractament, diagnòstic, seguiment i prevenció d'una malaltia.

3. ELS NANOFÀRMACS

Actualment, la solució que s'està trobant als inconvenients del repartiment sistèmic dels fàrmacs convencionals és la distribució dirigida de fàrmacs per tal de localitzar i dirigir la medicació als teixits d'interès. Aquesta alliberació de fàrmacs intel·ligent es duu a terme a partir dels nanofàrmacs.

Els nanofàrmacs són productes farmacèutics dissenyats a escala nanomètrica. Es tracta de nanopartícules que contenen un fàrmac a l'interior. En anglès els nanofàrmacs també es coneixen com a *drug nanocarriers*, és a dir com a nanotransportadors de molècules i d'actius terapèutics (fàrmacs).

Tenen un ampli espectre d'aplicacions terapèutiques amb potencial per alliberar el fàrmac en un determinat òrgan o lloc de teixits, ja sigui passivament o activament. Per tant el repartiment dels nanofàrmacs no és sistèmic, sinó que dirigeix als fàrmacs al lloc específic, a les cèl·lules malmeses o òrgan afectat.

La diferència de tamany entre una pilota de futbol i el planeta Terra és la mateixa diferència de tamany que hi ha entre aquesta mateixa pilota i una nanopartícula:



Figura 2: Imatge que compara la diferència de tamany d'una pilota i el planeta Terra amb la diferència de tamany entre la pilota i una nanopartícula. *Font: Mark E. Davis*

Tot i així, cal tenir en compte que realment els fàrmacs que transporta la nanopartícula són més petits d'un nanòmetre. Les nanopartícules són grans comparades amb les molècules del fàrmac que transporten. Per tant els nanofàrmacs poden transportar una gran quantitat de fàrmac a l'interior i a vegades no poden accedir a zones del cos on hi poden accedir molècules petites com les que formen el fàrmac transportat. Canvien la farmacocinètica del fàrmac.

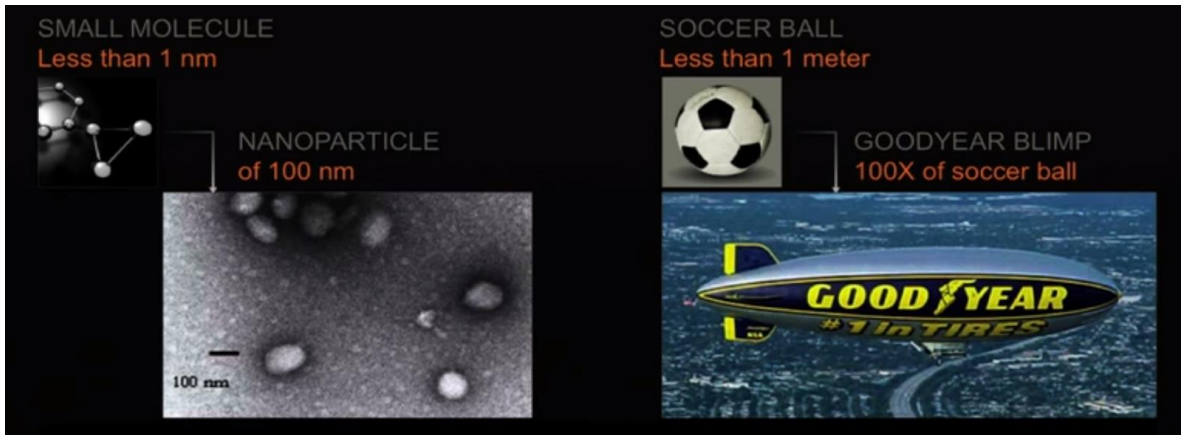


Figura 3: Imatge que compara la diferència de tamany entre un globus aerostàtic i una pilota de futbol amb la diferència de tamany entre una nanopartícula i el fàrmac que transporta a l'interior.

Font: Mark E. Davis

Els nanofàrmacs poden estar compostos per gran varietat de materials: poden estar formats per material natural com el midó o els lípids, per material sintètic com polímers o per material inorgànic com l'or. La forma dels nanofàrmacs normalment és esfèrica, però hi ha alguns amb forma cilíndrica, de plat, etc.

El tamany, la forma, els components químics que formen l'estructura del nanofàrmac, la hidrofilitat i la càrrega de la nanopartícula són clau de cara a la farmacocinètica, és a dir, de cara a l'absorció correcte del fàrmac, a la acumulació adequada en el lloc corresponent del fàrmac, a la biodistribució correcta del fàrmac i a la seva correcta eliminació. La mida dels nanofàrmacs és molt important en alguns casos, un exemple en seria quan el nanofàrmac ha de passar per una estructura porosa d'una membrana cel·lular.

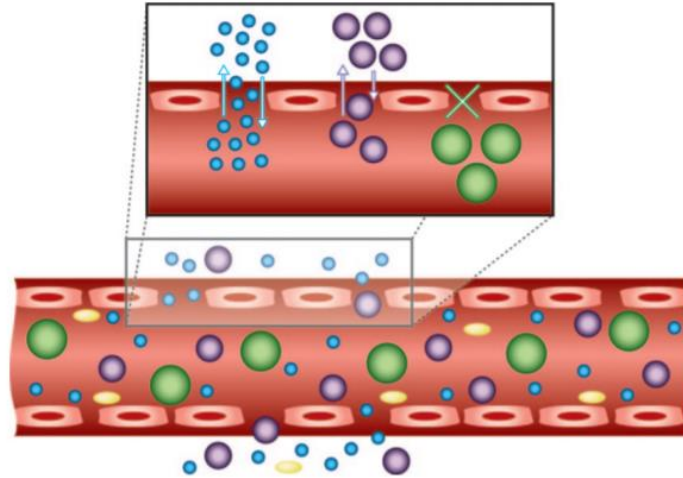


Figura 4: Imatge que mostra com l'eficàcia dels nanofàrmacs depèn molt de la seva mida i forma, ja que afecta a la seva biodistribució. **Font:** Omid C. Farokhzad i Robert Langer

Els paràmetres importants per a l'alliberament específic exitós del fàrmac són:

- L'ús de materials biocompatibles
- Evitar l'atac dels macròfags
- El nanofàrmac no ha de ser tòxic
- La nanopartícula ha de ser biodegradable després de la distribució
- La nanopartícula ha de protegir en tot moment al fàrmac que transporta per tal d'evitar-ne la degradació
- El nanofàrmac ha de mostrar propietats farmacocinètiques efectives

Per tal d'aconseguir aquests paràmetres, als nanofàrmacs se'ls enllaça amb diversos lligands i components químics. Aquests lligands els permeten a travessar les diferents barreres que un fàrmac convencional no pot i els permeten alliberar el fàrmac al teixit, cèl·lules o òrgan específic. Els lligands dels nanofàrmacs poden variar segons la funció d'aquell nanofàrmac, la qual ve condicionada per l'aplicació d'aquell cas. Segons el fàrmac que es transporti i el lloc específic on s'envii, alguns lligands es modificaran.

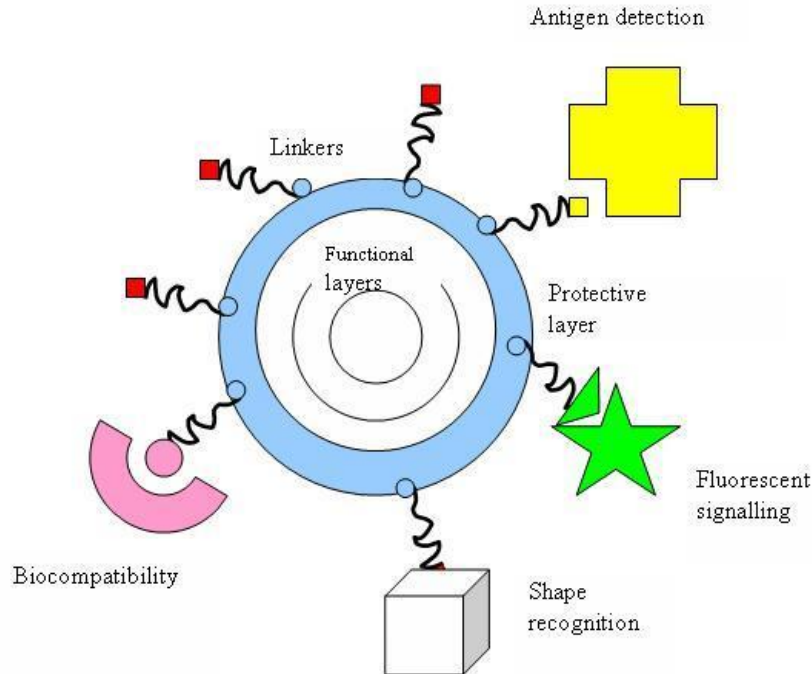


Figura 5: Representació esquemàtica d'una nanopartícula i els seus lligands. **Font:** Wikipèdia

Alguns lligands als que els nanofàrmacs es troben enllaçats són:

- **Senyalització fluorescent** (com a tècnica de detecció òptica).
- **Detecció d'antígens** (lligand que es troba en nanofàrmacs antitumorals, ja que diferencia les cèl·lules tumorals de les sanes per tal d'alliberar el fàrmac a la zona desitjada).
- **Reconeixement de forma**
- **Capas funcionals**
- **Altres enllaços** (depenen de la funció del nanofàrmac): cada nanofàrmac té uns lligands específics que fan que puguin detectar el teixit específic on es vol alliberar el fàrmac.

Apart dels lligands, per tal de fer biocompatibles a les nanopartícules i protegir-les del nostre sistema immune, a les nanopartícules se les encobreix amb diferents capes:

- **Capa biocompatible** com el dextran (fa que el nanofàrmac no sigui rebutjat pel nostre cos), altres exemples de capes biocompatibles són biopolímers com el col·lagen, monocapes d'algunes molècules petites.

- **Capa protectora:** L'incorporació de polímers de polietilenglicol (PEG) a la superfície dels nanofàrmacs aporta diversos beneficis: redueix la immunogenicitat, és a dir, fa al nanofàrmac invisible al nostre sistema immunitari; augmenta la solubilitat del nanofàrmac, ja que crea una capa hidrofílica al voltant del nanofàrmac; preveu els enllaços entre nanopartícules o amb components de la sang, permetent així una millor biodistribució; etc. Per tant millora la tolerabilitat del nanofàrmac i n'allarga així el temps de circulació.

Una altra característica a destacar de les nanopartícules és la gran superfície que aquestes tenen. Al reduir-ne el tamany, la superfície augmenta de forma exponencial. Aquesta propietat és molt positiva, ja que ens permet enllaçar molts lligands a la superfície de les nanopartícules per a millorar-ne així la distribució.

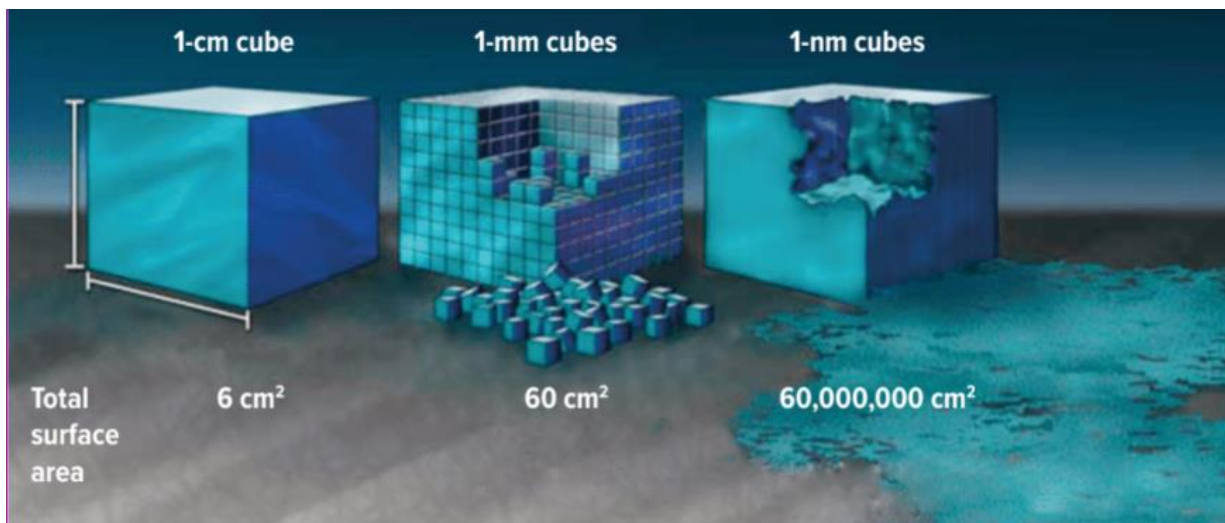


Figura 6: Representació gràfica de l'augment exponencial de la superfície quan disminuïm el tamany. Per a entendre el concepte, mostra 1 cub de 6 cm² de superfície, el qual, al tallar-lo a trossets augmenta d'àrea, ja que ara les cares dels cubs que abans quedaven amagades es compten com a superfície i així successivament fins arribar al tamany nanomètric. **Font:** C. Lee

Ventola

Tots aquests factors que poden variar entre els diferents tipus de nanofàrmacs (gran varietat de materials que els poden compondre, els diferents fàrmacs que poden arribar a transportar, els diferents tipus de lligands específics que poden formar la seva superfície, les diferents vies a través de les quals els podem

ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?

administrar, la forma, la càrrega, la mida, etc.) donen lloc a la seva complexitat funcional, ja que hi ha molts factors a tenir en compte segons la funció d'aquell nanofàrmac.

4. DISTRIBUCIÓ DIRIGIDA DELS NANOFÀRMACS

Hi ha diferents formes de distribució específica dels nanofàrmacs cap al conjunt de cèl·lules o teixits afectats. En anglès, aquesta distribució específica dels nanofàrmacs es diu *targeting drug delivery*, és a dir distribució dirigida del fàrmac. Principalment hi ha dos tipus de direccionament o *targeting*:

- **Targeting actiu (*Active targeting*):** Consisteix en dirigir el nanofàrmac al teixit o cèl·lules d'interès a través de lligands (molècules petites, pèptids, anticossos, etc.) enllaçats a la superfície de la nanopartícula. Aquests lligands són específics segons el tipus de cèl·lules on es vol dirigir el nanofàrmac, ja que s'enllacen als receptors de la superfície de la cèl·lula d'interès (diana terapèutica). Aquest reconeixement i enllaç de la nanopartícula a les cèl·lules és degut a les interaccions lligand-receptor. Per tant, per tal d'aconseguir aquesta especificitat, el receptor al qual es vulgui enllaçar el lligand ha de trobar-se a les cèl·lules d'interès ja sigui únicament o en una major quantitat que a la resta. En el cas del càncer, per exemple, les nanopartícules que s'hi volen dirigir de forma activa utilitzen un lligand que s'adhereix a antigens específics d'aquell tipus de cèl·lules tumorals.
- **Targeting passiu (*Passive targeting*):** El *targeting* passiu és aquell en el que el nanofàrmac arriba fins al teixit d'interès simplement per característiques de tamany i mida de la nanopartícula, que fan que s'hi acumuli.

Els nanofàrmacs antitumorals que es troben al mercat actual utilitzen el *targeting* passiu gràcies a l'anomenat efecte EPR, en anglès *Enhanced Permeability and Retention effect* (efecte que millora la permeabilitat i la retenció). Aquest efecte és degut a que els vasos sanguinis que es formen les cèl·lules tumorals com a font d'oxigen i nutrients per tal de poder seguir creixent i reproduint-se tenen porus de tamany nanomètrics que

provoquen l'acumulació de forma passiva dels nanofàrmacs a les cèl·lules tumorals. Aquestes fenestracions són degudes al creixement i a la reproducció descontrolada i amb molta rapidesa que tenen les cèl·lules tumorals; a diferència d'un endoteli vascular format per cèl·lules sanes, el qual no té cap fenestració ja que sinó tindriem hemorràgies internes constantment. A més els vasos tumorals tenen escàs drenatge limfàtic, el qual contribueix en l'acumulació de les nanopartícules.

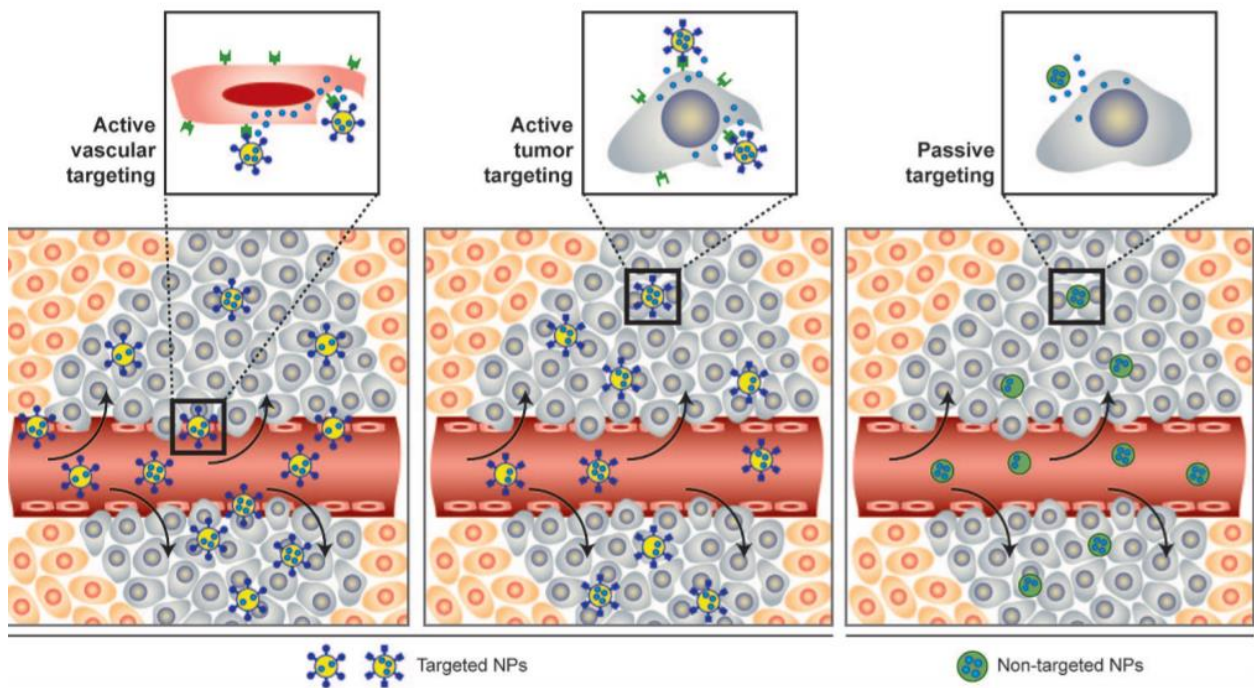


Figura 7: Representació dels diferents tipus de distribució dirigida dels nanofàrmacs. (Esquerre) Targeting actiu, les nanopartícules (NPs) estan plenes de lligands enllaçats a la seva superfície. (Mig) Targeting actiu i passiu, ja que les nanopartícules es dirigeixen al tumor gràcies a l'efecte EPR i contenen lligands per fer la distribució encara més efectiva. (Dreta) Targeting passiu amb efecte EPR. **Font:** Omid C. Farokhzad i Robert Langer

Un cop la nanopartícula arriba a la cèl·lula, s'hi col·loca a sobre. S'hi està allà fins que la pròpia cèl·lula l'acaba deixant entrar per endocitosi. La cèl·lula permet a la nanopartícula entrar al seu interior per a que els lisosomes cel·lulars se'n desfacin, però un cop a dins, la nanopartícula es degrada i allibera així el fàrmac.

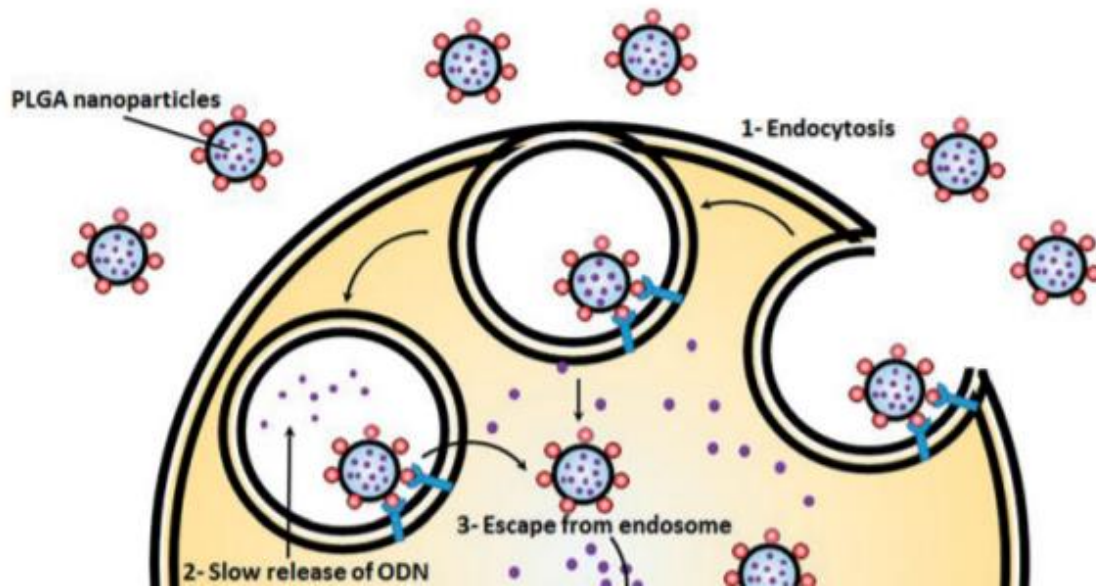


Figura 8: Representació de l'entrada de les nanopartícules a la cèl·lula a través d'endocitosis. (1): Cèl·lula forma una vesícula o endosoma per deixar entrar les nanopartícules a l'interior. (2): Les nanopartícules es degraden i alliberen el fàrmac un cop a dins de la vesícula. (3): El fàrmac s'escapa de la vesícula alliberant-se així a l'interior de la cèl·lula. **Font:** Leila Farahmand, Behrad Darvishi i Keivan Majidzadeh-A.

5. BENEFICIS DELS NANOFÀRMACS

Gràcies a l'encapsulació del fàrmac a escala nanomètrica, en nanopartícules, aconseguim modificar-ne les propietats per poder canviar la distribució per a una més dirigida i localitzada a la zona d'interès (sense arribar a modificar l'efectivitat del fàrmac). Aquesta alliberació intel·ligent del fàrmac ens aporta molts beneficis, ja que redueix de forma significant els inconvenients amb els que ens trobem amb els fàrmacs sistèmics.

Per començar, la distribució dirigida provoca que el fàrmac només arribi als teixits afectats, per tant, al ser una quantitat ínfima o inexistent de fàrmac la que arriba a les cèl·lules sanes, els efectes secundaris es veuen molt reduïts o inexistent.

A més, gràcies a les capes amb les que es cobreixen les nanopartícules per a fer-les biocompatibles, per a protegir-les i fer-les invisibles al nostre sistema immune i gràcies al seu tamany nanomètric s'arriba a evitar la degradació del fàrmac i per tant no en perdem tanta quantitat a les barreres que provoca que només arribi entre un 3-5% del fàrmac sistèmic a les cèl·lules d'interès.






El tamany nanomètric provoca que les nanopartícules no puguin accedir a zones on el fàrmac sistèmic sí, això allarga el temps de circulació de les nanopartícules pel nostre cos; a diferència dels fàrmacs sistèmics que s'eliminen amb rapidesa a la bufeta urinària i que per evitar-ho s'augmenta encara més la dosi de fàrmac sistèmic de la necessària.

El fet de perdurar més temps en circulació pel cos (en dosis no excessives ja que sinó acabaria resultant tòxic) provoca que pugui acumular-se més a la zona desitjada. Per exemple, quan tractem un càncer de forma convencional, una part del fàrmac sistèmic sí que s'acumula a les cèl·lules tumorals degut a l'efecte EPR, però gran quantitat del fàrmac es perd i per tant al augmentar les dosis el fàrmac també s'acaba acumulant en cèl·lules sanes. En canvi, al tractar-lo amb

nanofàrmacs i augmentar el temps de circulació, les nanopartícules s'acumulen en grans quantitats a les cèl·lules tumorals per efecte EPR, millorant així la distribució dirigida.

En general totes aquestes característiques milloren la distribució localitzada a les cèl·lules d'interès, el qual provoca que la dosi de fàrmac necessària sigui molt menor a la que es necessita en els fàrmacs convencionals, reduint així encara més els efectes secundaris i la toxicitat amb la que es troba el nostre cos quan hem d'augmentar molt les dosis.

Per tant, els beneficis més importants de la distribució dirigida gràcies als nanofàrmacs són:

-  DEGRADACIÓ I PÈRDUA DEL FÀRMAC
-  DOSI PER A FER EFECTE
-  EFECTES SECUNDARIS
-  TOXICITAT
-  TEMPS DE CIRCULACIÓ

6. CLASSIFICACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES

Les característiques físiques de les nanopartícules com la seva forma, el tamany, la permeabilitat i la superfície són molt importants ja que condicionen les seves propietats i la seva farmacocinètica. Aquestes característiques s'aconsegueixen en el procés de síntesi de la nanopartícula, on la mida i l'estructura final depenen dels additius de sal i surfactants, concentracions de reactius, temperatures de reacció i condicions de dissolvent utilitzades.

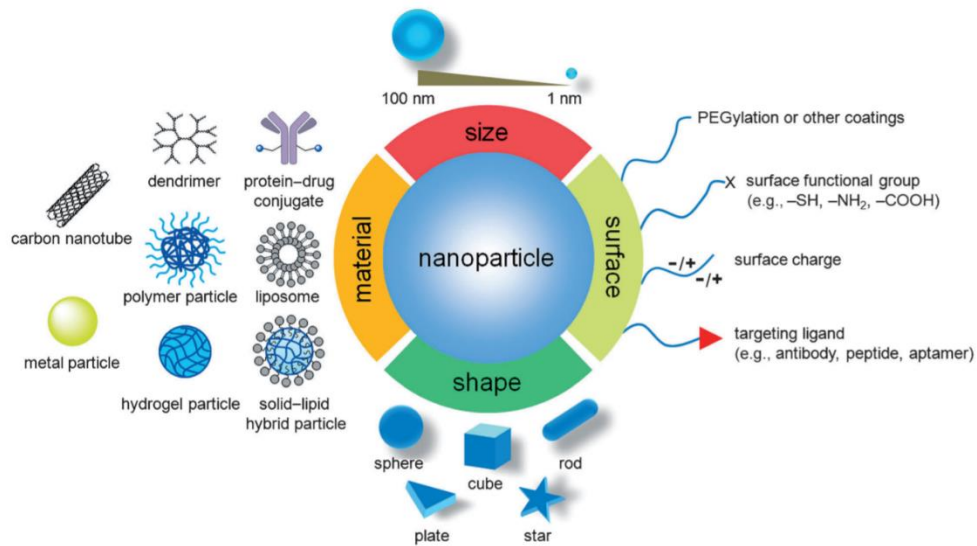


Figura 9: Esquema que mostra la gran varietat de nanopartícules que hi poden haver segons les característiques físiques. **Font:** Hendrik Heinz, Chandrani Pramanik, Ozge Heinz, Yifu Ding, Ratan K. Mishra, Delphine Marchon, Robert J. Flatt, Irina Estrela-Lopis, Jordi Llop, Sergio Moya, Ronald F. Ziolo.

Per tant, com podem comprovar, una gran varietat de nanopartícules i materials són utilitzats en la nanomedicina, els quals tenen una gran influència en la funció i aplicació. Segons aquestes característiques podem classificar les nanopartícules en dos grans grups: les inorgàniques i les orgàniques.

- **LES NANOPARTÍCULES INORGÀNIQUES:**

- NANOPARTÍCULES D'OR:

Les nanopartícules d'or normalment mesuren menys de 100 nanometres i tenen una gran superfície disponible per a funcionalització (per enllaçar-hi lligands), en comparació amb el seu tamany. Són utilitzades per al transport d'un fàrmac o de gens, com a agents de diagnòstic i com a millora de la radioteràpia. Les nanopartícules d'or poden potenciar processos òptics com l'absorció de la llum, la dispersió i la fluorescència a causa de la interacció dels electrons lliures a la nanopartícula amb llum. Sobretot es caracteritzen per ser excel·lents per a detectar i tractar malalties com el càncer a través de teràpies fototèrmiques.



Figura 10: Nanopartícules d'or de diferents tamanyes en suspensió. **Font:** Nanocomposix

- NANOPARTÍCULES DE PLATA:

Són bastant semblants a les nanopartícules d'or en algunes característiques, ja que tenen tamanyes i superfícies semblants i també es poden utilitzar per transportar fàrmacs o gens, com a agents de diagnòstic o per a millorar la radioteràpia. Però, sobretot s'utilitzen com a component de ciment ossi o per a lluitar contra infeccions bacterianes.



Figura 11: Nanopartícules de plata en suspensió. **Font:** Nanovex biotechnologies

- NANOPARTÍCULES D'ÒXID DE FERRO:

Les nanopartícules d'òxid de ferro estan formades generalment per un nucli central de Fe_3O_4 envoltat per una capa hidrofílica de dextran o d'algun altre compost biocompatible per tal d'augmentar l'estabilitat de les nanopartícules. Les seves aplicacions són diverses, ja que es pot utilitzar com a agent de contrast de ressonància magnètica per tal de rastrejar i monitoritzar cèl·lules d'interès, per a detectar l'apoptosi i expressió genètica, per a transportar un fàrmac fins al teixit d'interès, etc. Es poden dirigir a punts específics del cos gràcies a l'aplicació d'un camp magnètic extern.

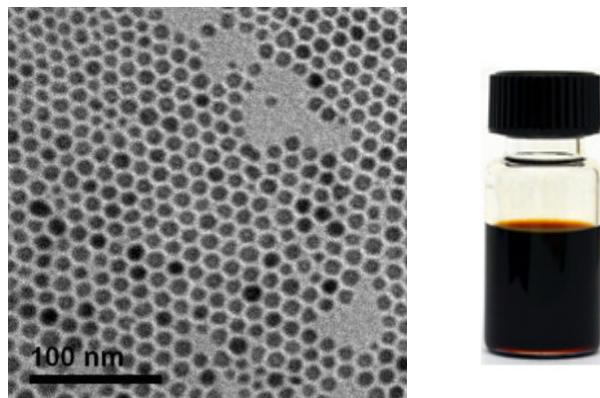


Figura 12: Nanopartícules d'òxid de ferro. **Font:** Cytodiagnosics

- PUNTS QUÀNTICS:

Els punts quàntics són partícules (nanocristalls) semiconductors que tenen un diàmetre de menys de 10 nm. Mostren propietats electròniques i òptiques úniques dependents de la mida i tenen un ampli espectre d'excitació. Estan formats per un nucli inorgànic (CdSe) i una capa orgànica aquosa (ZnS) per tal de millorar-ne les propietats òptiques. Tenen temps de circulació per la sang llargs i poden mantenir la fluorescència durant diversos mesos *in vivo*. A més, tenen una gran superfície, el qual permet adherir-hi lligands i

agents per al transport localitzat del fàrmac, per aplicacions de diagnòstic per la imatge o per a l'enginyeria de teixits.



Figura 13: Punts quàntics de diferents tamanys en suspensió. *Font:* Peter Shadbolt

- **LES NANOPARTÍCULES ORGÀNIQUES:**

- **NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES:** Les nanopartícules polimèriques poden fabricar-se en una àmplia gamma de varietats i mides, que van des de 10 nm fins a 1 µm.

- **PLGA:**

Es tracta d'un polímer sintètic utilitzat en estudis per regenerar teixits i per cicatrització de ferides, tot i que actualment s'està utilitzant amb èxit com a nanofàrmac, per a dirigir fàrmacs antitumorals a les cèl·lules d'interès. El PLGA (àcid poli làctic-co-glicòlic) és un dels polímers biodegradables més desenvolupats. Té una alta biodegradabilitat i biocompatibilitat i ha estat aprovat per la FDA (Food and Drug Administration) i per l'EMA (Agència Europea del Medicament) en sistemes de lliurament de fàrmacs per a l'administració parenteral. Les nanopartícules de PLGA es sintetitzen a través de blocs de copolímers de diferents hidrofobicitats. Aquests copolímers s'ajunten espontàniament en una formació de micel·les en un ambient aquós. Poden encapsular tant fàrmacs hidrofòbics com fàrmacs hidrofílics, també poden encapsular proteïnes i macromolècules d'àcid nucleic.

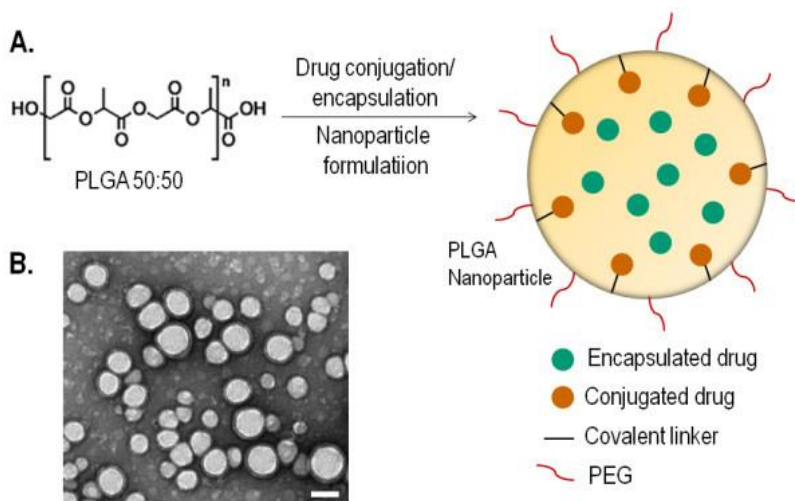


Figura 14: Nanopartícules PLGA: (A) Conjugació química i representació de l'encapsulació en nanopartícules PLGA modificades per PEG. (B) Imatge de microscòpia electrònica de transmissió de les nanopartícules PLGA. Barra d'escala: 100 nm. **Font:** Rania Harfouche

○ DENDRÍMERS:

Els dendrímers són macromolècules ramificades regularment a partir d'elements sintètics o naturals que inclouen aminoàcids, sucres i nucleòtids. Tenen un nucli central, capes interiors de branques i una superfície exterior. Aquesta estructura permet que a les branques de la nanopartícula s'hi enllacin molècules per ajudar amb la distribució dirigida del fàrmac. Algunes aplicacions dels dendrímers són la teràpia gènica, el transport localitzat d'un fàrmac, immunoassaig i agent de contrast de ressonància magnètica.

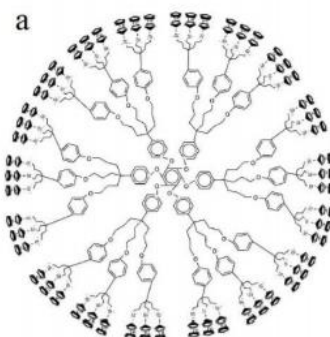


Figura 15: Representació gràfica de l'estructura d'un dendrímer. **Font:** Anu Mary Ealias i Saravanakumar MP

- **NANOPARTÍCULES NO POLIMÈRIQUES:**

- **LIPOSOMES:**

Els liposomes són vesícules esfèriques formades per bicapes de fosfolípids. El fàrmac transportat es troba dins del nucli buit, protegit per la bicapa fosfolipídica que evita la seva degradació. Actualment ja hi ha 12 medicaments terapèutics basats en liposomes aprovats clínicament, d'entre ells es troben liposomes que contenen Doxorubicina (fàrmac antitumoral) per al tractament del càncer d'ovari i de mielomes múltiples. Els components dels liposomes són semblants a les membranes cel·lulars humanes naturals, per tant, són altament biocompatibles i biodegradables. Els liposomes poden transportar i subministrar teràpies hidrofíliques o hidròfobiques.

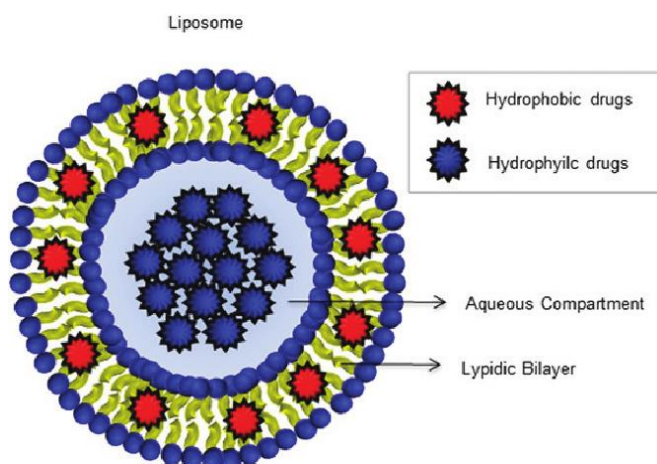


Figura 16: Representació esquemàtica d'un liposoma i la distribució dels fàrmacs que transporta segons la seva hidrofilitat. **Font:** Eloah Rabello Suarez

- **NANOTUBS DE CARBONI:**

Es tracta d'una capa de grafit cargolada en forma de cilindre. Aquesta capa està formada per xarxes hexagonals d'àtoms de carboni d'entre 1-100 nm, el qual li proporciona propietats tèrmiques mecàniques i elèctriques úniques. La seva gran superfície en comparació amb el tamany permet enllaçar-hi

diversos fàrmacs. Algunes de les seves aplicacions són el transport de molècules d'ADN a cèl·lules d'interès i el transport de fàrmacs antitumorals com a millora del tractament del càncer.

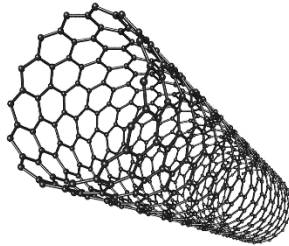


Figura 17: Nanotub de carboni. *Font:* Cell press

o MICEL·LES:

Les micel·les tenen forma esfèrica i estan formades per un nucli hidrofòbic envoltat per una capa hidrofílica, el qual permet que passin a través de membranes i barreres fisiològiques durant la seva farmacocinètica. La seva aplicació principal és el transport de fàrmacs hidrofòbics de forma dirigida al teixit d'interès. Poden alliberar el fàrmac amb la variació del pH, el qual és interessant pel tractament del càncer ja que les cèl·lules tumorals tenen un pH característic.

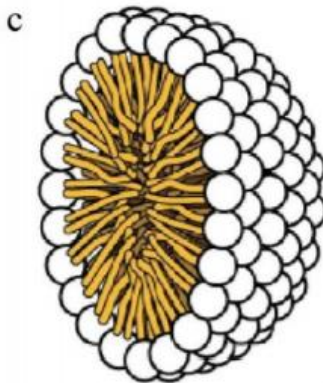


Figura 18: Representació gràfica d'una micel·la. La part groga (nucli) representa la part hidrofòbica, on conté el fàrmac; la capa que envolta el nucli representa la capa hidrofílica. *Font:*

Anu Mary Ealias i Saravanakumar MP

○ PROTEÏNES (ALBÚMINA):

Es tracta de nanopartícules de proteïnes d'albumina que transporten fàrmacs hidrofòbics per la sang. L'albumina s'uneix naturalment a les molècules hidrofòbiques amb un enllaç reversible no covalent, evitant toxicitats basades en el dissolvent. El 2005 va ser aprovat per la FDA un nanofàrmac anomenat Abraxane format per una nanopartícula d'albumina d'uns 130 nm que transporta paclitaxel (fàrmac antitumoral), per al tractament del càncer de mama.



Figura 19: Abraxane (nanofàrmac antitumoral format per nanopartícules d'albumina). **Font:** *Nanotechnology in City Environments (NICE)*

6.1. LES NANOPARTÍCULES DE PLGA

Les pràctiques que he dut a terme en el laboratori han consistit, en part, en la síntesis de nanopartícules de PLGA amb rodamina a l'interior. És per això que vull endinsar-me una mica més en aquest tipus de nanopartícules polimèriques, les quals, degut a la seva alta biodegradabilitat i biocompatibilitat són molt utilitzades per la síntesis de nanofàrmacs. Vull remarcar, però, que el procés de síntesis d'aquestes està redactat de forma més específica a la part pràctica del meu treball.

Les nanopartícules de PLGA tenen forma esfèrica i són buides, ja que a l'interior s'hi introdueix el fàrmac a transportar. El PLGA (àcid poli làctic-co-glicòlic) és un polímer sintètic biodegradable format per àcid làctic i àcid glicòlic. L'àcid làctic es degrada amb el pH, el qual provoca que depenent de la quantitat d'àcid làctic que contingui una nanopartícula, aquesta alliberarà el fàrmac més ràpidament o més lentament. Aquesta característica resulta molt interessant, ja que permet regular el temps que triga en degradar-se la nanopartícula.

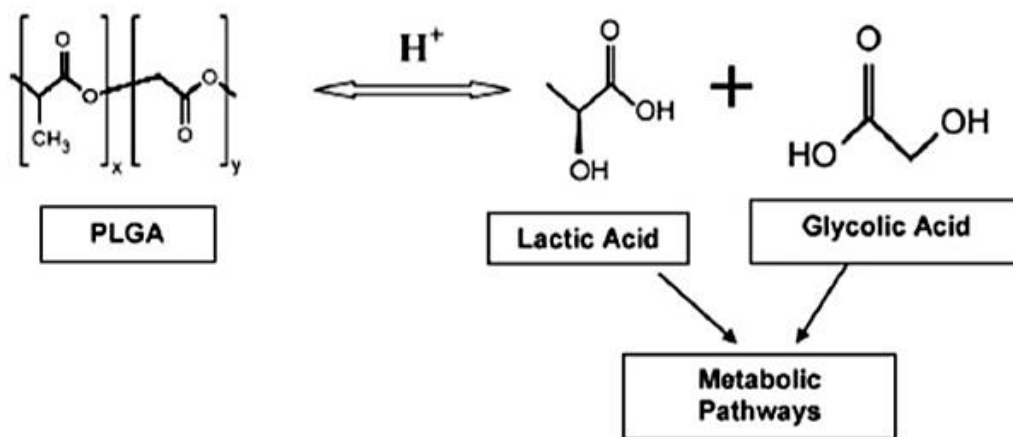


Figura 20: Esquema de l'hidròlisi del polímer de PLGA. **Font:** Fabienne Danhiera, Eduardo Ansorena, Joana M.Silva, RégisCoco, Aude Le Breton i Véronique Préat.

Aquestes nanopartícules es sintetitzen a través d'un procés de doble emulsió. Consten de diverses fases o capes. La capa interna és on es troba el fàrmac,

aquesta capa consisteix bàsicament d'una dissolució del fàrmac a transportar i aigua, per tant es tracta d'una capa hidrofílica. La capa que envolta aquesta, anomenada fase orgànica o segona capa, està formada pel polímer de PLGA, diclorometà i el SPAN-80 (es tracta d'una capa hidrofòbica). I l'última capa és una dissolució d'alcohol polivinílic i NaCl (capa hidrofílica). La funció del SPAN-80 i de l'alcohol polivinílic és unir les diferents capes entre sí, tot i les seves diferents hidrofobicitats, bàsicament es tracta de surfactants o emulsionants amb caràcter amfipàtic. Aquestes fases es sintetitzen primer individualment i es barregen. Un cop obtingudes, sotmetem les capes a un procés de dues sonicacions (d'aquí el nom de doble emulsió), es deixa reposar i les nanopartícules es sedimenten i s'extreuen gràcies a diversos processos de centrifugació el dia següent.

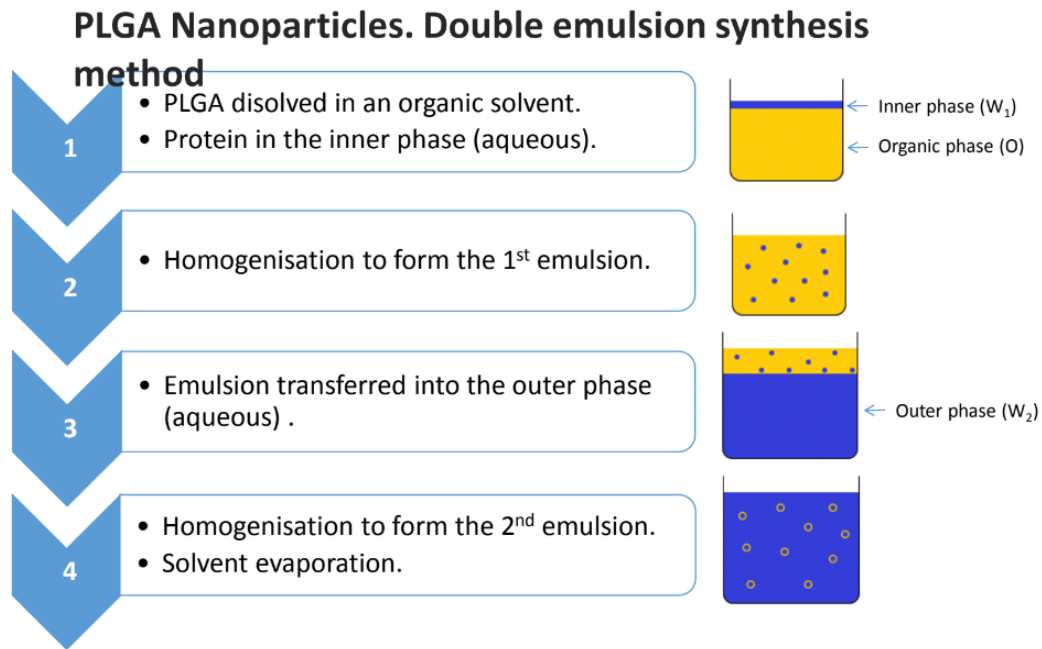


Figura 21: Resum esquemàtic de la síntesis de les nanopartícules de PLGA a través del mètode de la doble emulsió. **Font:** *Estudi propi*

Algunes de les aplicacions d'aquestes nanopartícules (que s'estan duent a terme o que estan en estudis per a dur a terme en un futur) són per a tractaments antitumorals (contra el càncer), per a tractaments contra inflamacions, tractaments de medicina regenerativa, tractaments de malalties cardiovasculars, tractaments de l'osteoporosi, tractaments de la diabetis, tractaments de tumors de cervell, etc.

ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?

Receptors	Ligands	Therapeutic compounds	Study design
<i>Vaccination</i>			
Targeted nanoparticles			
Toll-like receptors	MPLA	OVA	Preclinical (mice)
C-type lectins	Mannan	OVA	Preclinical (mice)
Siglec	Anti-Siglec-7 polyclonal antibody	-	<i>In vitro</i>
Claudins	CPE30	Influenza hemagglutinin	Preclinical (mice)
$\alpha_v\beta_1$ integrins	RGD/RGDp LDV/LDVp	OVA	Preclinical (mice)
STAT3	JSI-124	-	Preclinical
<i>Cancer</i>			
Untargeted nanoparticles			
		Paclitaxel	Preclinical (mice)
		9-nitro-camptothecin	<i>In vitro</i>
		Rh-G-CSF	<i>In vitro</i>
		siRNA targeting MBD1	<i>In vitro</i>
		shRNA targeting AnxA2	Preclinical (mice)
Targeted nanoparticles			
ICAM-1	cLAbL	Doxorubicin	<i>In vitro</i>
Folate receptor	Folate	Paclitaxel	Preclinical
Specific receptor of lymphatic metastatic tumors	LyP-1	-	Preclinical
Prostate specific receptor	PSMA	Cisplatin	Preclinical
$\alpha_v\beta_3$ integrins	RGD	Paclitaxel	Preclinical (mice)
Nucleolin	AS1411	Paclitaxel	<i>In vivo</i>
HER-2	rhuMAbHER2	PE38KDL	Preclinical (mice)
<i>Inflammation</i>			
Untargeted nanoparticles			
		Diclofenac	<i>In vivo</i>
		Flubiprofen	Preclinical (rabbit)
		Rolipram	Preclinical
		Tacrolimus	Preclinical (rats)
		Betamethasone	Preclinical (rabbit)
		PS-341	Preclinical
<i>Cerebral diseases</i>			
Untargeted nanoparticles			
		Superoxide dismutase	Preclinical (rats)
Targeted nanoparticles			
Transferrin receptor	Lactoferrin	Urocortin	Preclinical (rats)
Opioid receptor	Simil-opioid peptide (g7)	Loperamide	Preclinical
Opioid receptor	Simil-opioid peptide (g7)	Sialic acid	Preclinical
Specific brain receptor	Pep TGN	-	Preclinical
<i>Regenerative medicine</i>			
		GDNF	Preclinical (rats)
		VEGF	Preclinical (mice)
		FGF-2	Preclinical (mice)
		BMP-7/BMP-2	<i>In vitro</i>
<i>Cardiovascular diseases</i>			
Untargeted nanoparticles			
		DNA	Preclinical (pig coronary arteries)
<i>Infections</i>			
Untargeted nanoparticles			
		Sparfloxacin	Preclinical (rabbits)
		Gentamycin	<i>In vivo</i>
		-	
<i>Osteoporosis</i>			
Untargeted nanoparticles			
		Calcitonine	<i>In vivo</i>
<i>Diabetes</i>			
Untargeted nanoparticles			
		Insulin	Preclinical

Figura 22: Taula d'exemples de diverses aplicacions de les nanopartícules de PLGA desenvolupades actualment per al tractament de diferents patologies. **Font:** Fabienne Danhiera, Eduardo Ansorena, Joana M.Silva, RégisCoco, Aude Le Breton i Véronique Préat.

ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?

Ligand-targeted PLGA nanoparticles for cancer therapeutics

Nanoparticle	Drug loaded	Ligand	Target site	Inference
PLGA	Paclitaxel	ScFv antibody	Hepatic cancer	Improved cellular cytotoxicity against Chepp-3 cells
PLGA-PEG	Cisplatin	PSMA targeting aptamer	Prostate	The NPs were readily taken up by receptor mediated endocytosis
PLGA-PEG	Paclitaxel	RGDp	Human umbilical vein endothelial cells	Enhanced uptake by integrin expressing malignant cells

PLGA nanoparticles for gene delivery

Nanoparticles	Gene Delivered	Target	Inference
PLGA nanoparticles	DNA	COS-7 and Cf2 th cells	Localization into the endo-lysosomal compartment, 250-fold protein expression in cells
Chitosan-PLGA nanoparticles	Antisense oligonucleotides	Lung cancer cells	Efficient delivery of antisense oligonucleotides
DEPA-PVA-PLGA nanoparticles	Anti-luciferase siRNA	H1299 cell line	80-90% knockdown of the luciferase reporter gene

PLGA-PEG nanoparticles for anticancer drug delivery

Nanoparticles	Drug loaded	Target	Inference
PLGA-mPEG nanoparticles	Cisplatin	BALB/c mice	Higher survival rate and delayed tumour growth was observed for PLGA-mPEG nanoparticle-treated mice in comparison with animals treated with the free drug
PLGA-PEG nanoparticles	Docetaxel	Solid tumors	Biological half-life of the drug is significantly augmented, while imparting considerable solid tumour accumulation

Figura 23: Altres taules d'exemples d'aplicacions actuals de les nanopartícules de PLGA en tractaments antitumorals i tractaments de teràpia gènica. **Font:** *Shweta Sharma, Ankush Parmar, Shivpoojan Kori i Rajat Sandhir.*

7. EL CÀNCER

El tractament del càncer a través de quimioteràpia resulta molt tòxic per als pacients i comporta molts efectes secundaris, molt greus. És per això que veient els beneficis que els nanofàrmacs aporten, he volgut focalitzar el meu treball amb el tractament del càncer amb nanomedicina.

El càncer és un tipus de malaltia en la que un grup de cèl·lules es comencen a reproduir de forma descontrolada i a ritme molt més ràpid que el ritme de mort cel·lular. Aquest grup de cèl·lules forma el que anomenem un tumor maligne, el qual envaeix els teixits del seu voltant i en casos greus, pot arribar a estendre's a altres punts del cos a través de la limfa o de la sang, donant lloc així, al que anomenem metàstasi.

No tots els tumors són malignes, al contrari, quan el ritme de reproducció d'un grup de cèl·lules és molt més elevat que el ritme de mort cel·lular, però les cèl·lules filles encara no s'han especialitzat, parlem d'un tumor benigne (no fa cap funció, ja que les cèl·lules filles no s'han especialitzat).

El procés que es duu a terme per a reproduir les nostres cèl·lules s'anomena mitosi. La mitosi consisteix bàsicament en la divisió cel·lular per donar lloc a cèl·lules filles exactament iguals que la cèl·lula mare. Aquestes, tenen la mateixa quantitat de material genètic que la cèl·lula mare (23 parells de cromatines, en el cas dels humans). La mitosi dona lloc al creixement dels nostres teixits i provoca que a mesura que ens anem fent grans anem augmentant de tamany.

La vida cel·lular passa per diferents fases:

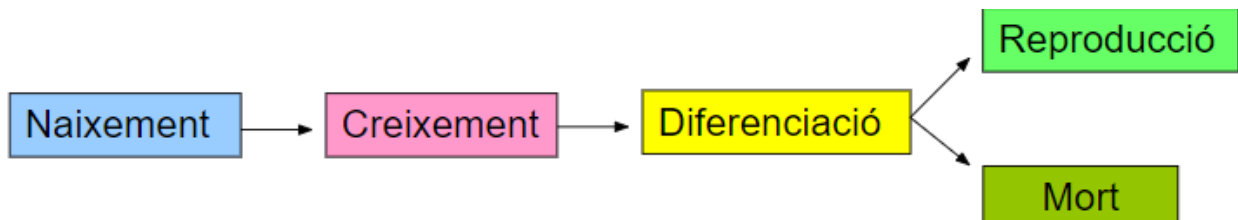


Figura 24: Esquema de les diferents fases de la vida cel·lular. *Font:* Noèlia Teruel

La durada d'aquest cicle és variable, pot durar entre unes hores (cèl·lules de la mucosa intestinal) o tota la vida d'aquell organisme (neurones).

En general, les cèl·lules viuen menys que l'individu. Però cal que el ritme de reproducció cel·lular sigui major o igual al ritme de mort cel·lular, per tal de mantenir un equilibri (els humans generem 2 milions de cèl·lules per segon per mantenir aquest equilibri).

La mort cel·lular, la qual té lloc per autòlisi dels lisosomes cel·lulars, està programada en els gens, totes les cèl·lules tenen marcat en el seu ADN quan moriran. Però, en quan una cèl·lula té alguna malaltia o algun problema que provoca que no pugui dur a terme la seva funció vital, aleshores, aquesta es destrueix abans de temps, per tal d'evitar mals majors i afectar d'alguna manera a les cèl·lules del seu voltant. Aquesta mort provocada s'anomena apoptosi.

El problema del càncer és que encara que les cèl·lules estiguin malmeses, eviten l'apoptosi i continuen multiplicant-se de manera descontrolada.

Molts tumors malignes són provocats per mutacions en el material genètic de les cèl·lules. Existeixen molts agents cancerígens que són capaços de produir mutacions en l'ADN i originar transformacions neoplàsiques (pas d'una cèl·lula sana a una cancerígena). Alguns agents cancerígens són les radiacions nuclears, UV i X, el quitrà, l'amiant, el pa torrat cremat, alguns conservants i edulcorants, begudes alcohòliques, el tabac, etc.

A més, en el nostre cos, apart dels gens antioncogens (gens supressors), els quals inhibeixen la divisió cel·lular; també hi ha uns gens que, pel contrari, poden esdevenir oncogens amb facilitat i induir la transformació neoplàstica.

El càncer també pot ser provocat per virus oncogènics, els quals introdueixen oncogens a la cèl·lula originant la transformació neoplàstica d'aquesta. Un exemple en seria el virus del papil·loma humà.

Davant d'un tumor maligne, el nostre cos detecta les cèl·lules cancerígenes degut a que aquestes presenten molècules distintives a la seva membrana (antígens), i com a defensa allibera anticossos. El problema és que aquests no són suficients per acabar amb les cèl·lules canceroses.

7.1. EFECTES SECUNDARIS DELS TRACTAMENTS ANTITUMORALS

Generalment, les principals teràpies que es fan servir en el tractament del càncer són la cirurgia, la quimioteràpia, altres medicaments amb indicació anticancerígena, i la radioteràpia. Les quals, com he explicat anteriorment, tenen molts efectes secundaris degut a la toxicitat que comporten de cara al nostre cos.

Per tant, per tornar a destacar la importància de la millora del tractament del càncer gràcies als nanofàrmacs, m'agradaria mencionar alguns dels molts efectes secundaris que acabem negligint amb l'ajuda de la nanomedicina:

- **Anèmia:** disminució de quantitat d'hemoglobina en sang.
- **Alopècia:** Caiguda del cabell
- **Canvis en la pell i en les ungles**
- **Problemes de fertilitat**
- **Deliri**
- **Diarrea**
- **Dolor**
- **Edema:** acumulació anormal de fluids (principalment limfa) en l'espai tissular intercel·lular o intersticial, la qual causa inflamació i dolor sever.
- **Estrenyiment**
- **Pèrdua de l'apetit**
- **Fatiga**
- **Neutropènia:** concentració baixa de neutròfils en sang. Els neutròfils són un tipus de glòbuls blancs que formen part del nostre sistema immune, ja que ens defensen de les infeccions. La neutropènia, per tant, pot arribar a provocar greus infeccions. Pot arribar a ser una malaltia crònica.
- **Limfedema:** És un edema crònic produït per una obstrucció en els canals limfàtics de l'organisme. Es produeix per l'acumulació de la limfa en els espais intersticials.

- **Nàusees i vòmits**
- **Neuropatia perifèrica:** Els nervis del sistema nerviós perifèric es danyen.
- **Problemes de memòria o de concentració**
- **Alteracions en la mucosa de la boca**
- **Problemes per dormir**
- **Problemes de salut sexual**
- **Problemes urinaris i de bufeta**
- **Trombocitopènia:** Disminució de plaquetes en sang
- **Cardiotoxicitat:** Problemes en la musculatura del cor i en el seu funcionament.

7.2. LÍNIA CEL·LULAR HELA

Una altra part de les pràctiques que he dut a terme en el laboratori ha consistit en la sembra i cultiu de cèl·lules HeLa. És per això que m'hi he volgut endinsar una mica més, per a facilitar més endavant la comprensió de la meva part pràctica.

Les cèl·lules HeLa constitueixen un llinatge de cèl·lules epitelials humanes procedents d'un carcinoma cervical. Concretament es tracta de la primera línia cel·lular que es va fer servir per a cultius cel·lulars als anys 50. És a dir, aquestes cèl·lules porten gairebé 70 anys creixent ininterrompudament.

Aquesta línia cel·lular prové de les cèl·lules de càncer de cèrvix que li van extreure a la pacient Henrietta Lacks (d'aquí el nom) en una operació quirúrgica als anys 50, les quals, al proliferar tan fàcilment en cultius cel·lulars es van començar a utilitzar per a la investigació.

S'utilitzen al laboratori per a fer experiments, la raó per la qual es fa experiments més sovint amb cèl·lules cancerígenes que amb cèl·lules sanes és perquè, apart del creixement tan ràpid de les cèl·lules tumorals en comparació amb la resta, tenen una gran capacitat d'adaptació i molt difícilment es moren en comparació amb les cèl·lules no tumorals. Actualment s'utilitzen en el món de la investigació a gran escala i es troben a laboratoris d'arreu del món.

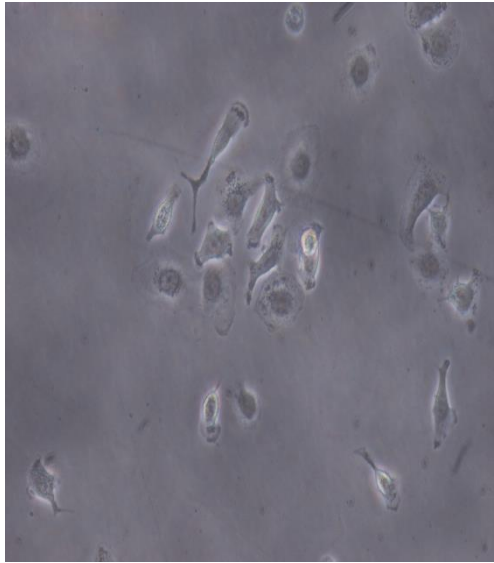


Figura 25: Cèl·lules HeLa observades des d'un microscopi òptic. **Font:** *Estudi propi.*

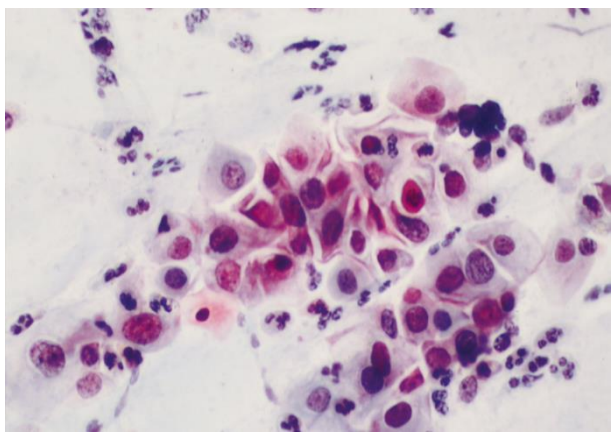


Figura 26: Teixit de cèrvix amb cèl·lules sanes. Com es pot comprovar, en comparació amb la figura 24, les cèl·lules que constitueixen aquest teixit tenen formes regulars i la seva disposició en l'espai és de forma ordenada, sense deixar grans espais entre elles. **Font:** *Achim Schneider. Institute for cytology and dysplasia.*

8. NANOFÀRMACS PEL TRACTAMENT DEL CÀNCER APROVATS O EN ESTUDIS

Year approved	Name	Type	Active drug	Diameter (references)	Type of cancer
Japan (1994)	Zinostatin stimalamer	Polymer protein conjugate	Styrene maleic anhydride neocarzinostatin (SMANCS)	*	Renal cancer
FDA (1995) EMA (1996)	Doxil/caelyx	Liposome (PEGylated)	Doxorubicin	80–90 nm [82]	HIV-associated Kaposi's sarcoma, ovarian cancer, metastatic breast cancer, multiple myeloma
FDA (1996)	DaunoXome	Liposome (non-PEGylated)	Daunorubicin	45 nm [83]	HIV-associated Kaposi's sarcoma
Taiwan (1998)	Lipo-Dox	Liposome	Doxorubicin	180 nm [84]	Kaposi's sarcoma, breast and ovarian cancer
FDA (1999)	DepoCyt	Liposome	Cytosine arabinoside (cytarabine)	10–20 µm [84]	Neoplastic meningitis
EMA (2000)	Myocet	Liposome	Doxorubicin	190 nm [84]	Breast cancer
FDA (2005) EMA (2008)	Abraxane	Nanoparticle albumin bound	Paclitaxel	130 nm [27]	Advanced non-small-cell lung cancer, metastatic pancreatic cancer, metastatic breast cancer
FDA (2006)	Oncaspar	PEG protein conjugate	L-Asparaginase	50–200 nm [84]	Leukemia
South Korea (2007)	Genexol-PM	PEG-PLA polymeric micelle	Paclitaxel	20–50 nm [85]	Breast cancer, Lung cancer, Ovarian cancer [126]
EMA (2009)	MEPACT	Liposome (non-PEGylated)	Mifamurtide	*	Osteosarcoma
EMA (2010)	NanoTherm	Iron oxide nanoparticle	–	20 nm [86]	Thermal ablation glioblastoma
FDA (2012)	Marqibo	Liposome (non-PEGylated)	Vincristine	100 nm [87]	Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukemia
FDA (2015)	MM-398 (Onivyde)	Liposome (PEGylated)	Irinotecan	80–140 nm [88]	Metastatic pancreatic cancer (2nd line)

Figura 27: Taula de nanofàrmacs pel tractament del càncer actualment aprovats, és a dir, actualment es troben disponibles en el mercat farmacèutic. *Dades no trobades. **Font:** *Stephanie Tran, Peter-Joseph DeGiovanni, Brandon Piel i Prakash Rai.*

ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?

Year	Name	Type of nano-particle	Active drug	Phase of trial	Size (nm)	Type of cancer
2017	NU-0129	Gold	Gold and siRNAs	I	*	Glioblastoma multiforme
2017	MM-398	Liposome	Irinotecan	I, II, III	80–140	Small cell lung cancer, metastatic pancreatic adenocarcinoma, pediatric solid tumors
2016*	Genexol-PM	Polymer	Paclitaxel	I/II	< 50	Gynecologic cancer, hepatocellular carcinoma, advanced breast cancer, non-small cell lung cancer
2016	CRLX101	Polymer	Camptothecin	I/II	30–40	Ovarian, rectal, renal, fallopian tube, lung (small cell and non-small cell) primary peritoneal, stomach, gastroesophageal, and esophageal cancers
2016	AuroLase	Silica-Gold	Gold	I	150	Prostate, head and neck, lung
2016	Vincristine sulfate liposome injection	Liposome	Vincristine	I/II	~ 100	Kaposiform hemangioendotheloma, Kasabach–Merritt Syndrome, tufted angioma, rhabdomyosarcoma, recurrent adult acute myeloid leukemia, lymphoblastic leukemia***, multiple lymphomas (non-hodgkin, follicular, mantle-cell, small-cell, and B-cell [Marginal Zone]), Waldenstrom macroglobulinemia
2016	Anti-EGFR immuno-liposome	Liposome	Doxorubicin	II	130–200	Breast cancer
2015	Mitoxantrone HCl liposome injection (plm60-s)	Liposome	Mitoxantrone	II	60	Breast cancer, diffuse large B-cell lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, and peripheral T/NK lymphomas
2014	CPX-351	Liposome		I	*	Acute myeloid leukemia
2014	LipoCURC	Liposome	Curcumin	I/II	*	Advanced cancer with failed standard of care therapy
2014	SGT-53	Liposome	Plasmid containing normal human wild type p53 DNA	I/II	*	Glioblastoma, neoplasm, metastatic pancreatic cancer
2013	LiPlaCis	Liposome	Cisplatin	I/II	*	Advanced or refractory solid tumours, metastatic breast cancer
2012	PROMITIL	Liposome	Mitomycin-C	I	~ 90	Solid tumors
2011	Abraxane	Protein-drug conjugate	Paclitaxel	II	~ 130	Breast cancer**

Figura 28: Taula de nanofàrmacs pel tractament del càncer que actualment es troben en estudis, per a ser aprovats en un futur. *Dades no trobades. **Tots els pacients d'aquest estudi tenen més de 65 anys. ***Pacients entre l'edat 1-21. **Font:** *Stephanie Tran, Peter-Joseph DeGiovanni, Brandon Piel i Prakash Rai.*

PART PRÀCTICA

9. INTRODUCCIÓ A LA PART PRÀCTICA

La part pràctica del meu treball de recerca la vaig realitzar durant unes estades que vaig tenir la immensa sort de poder fer a la Universitat Autònoma de Barcelona. Vaig estar realitzant les estades Argó des del 25 de Juny fins al 12 de Juliol, durant les quals no només vaig poder dur a terme les meves pràctiques, sinó que també vaig poder gaudir d'una experiència increïble envoltada d'un entorn universitari.

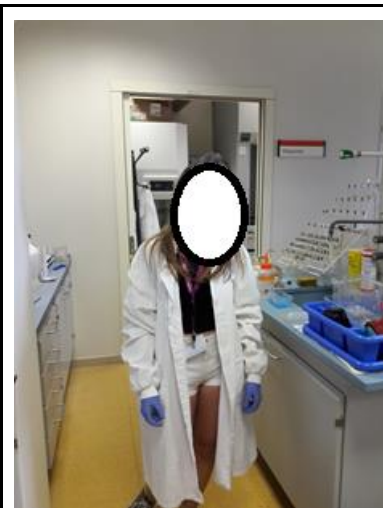


Figura 29: Emocionada a punt de començar les pràctiques a un laboratori de la universitat!!! **Font:** *Estudi propi*

Vaig dur a terme les pràctiques a un dels laboratoris de l'Institut de Recerca de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) de l'UAB. Els dies que vaig dedicar exclusivament a les pràctiques van ser quatre i és per això que he estructurat les pràctiques segons els quatre dies.

Davant de tot el que vaig aprendre amb la part teòrica del meu treball de recerca, vaig formular la següent hipòtesis:

- **Els nanofàrmacs amb nanopartícules de PLGA podrien servir com a millora del tractament del càncer de cervix**

Concretament em vaig interessar per les nanopartícules de PLGA per la seva alta biodegradabilitat i biocompatibilitat i pel càncer de cèrvix perquè coneixia de l'existència de les cèl·lules HeLa, amb les quals sabia que no tindria problema per a dur a terme les meves pràctiques.

L'objectiu principal de les pràctiques, per tant, era fer la síntesis de nanopartícules de PLGA (50% àcid làctic i 50% àcid glicòlic) carregades amb rodamina isotiocianat i sembrar un cultiu de cèl·lules de la línia cel·lular HeLa, on més tard vam introduir les nanopartícules; per a després observar els resultats a través d'un microscopi de fluorescència i un microscopi electrònic de rastreig.

El primer dia el vam dedicar a la síntesis de les nanopartícules de PLGA; el segon al rentat d'aquestes a través de diverses centrifugacions i vam cultivar les cèl·lules de càncer de cèrvix; el tercer dia vam introduir les nanopartícules als cultius cel·lulars, vam dur a terme una DLS i vam preparar els portaobjectes per a poder observar les mostres a través dels microscopis; per acabar, l'últim dia el vam dedicar a observar els resultats a través dels microscopis de rastreig i de fluorescència.

Al llarg de les pràctiques podem diferenciar entre dos importants variables, on la variable independent és aquella que nosaltres modifiquem per veure com varia una condició en concret (aquesta condició l'anomenem variable dependent) i la variable dependent és aquella que varia segons les condicions que nosaltres establim.

- Variable dependent: la presència de fluorescència a la cèl·lula (observada a través del microscopi de fluorescència).
- Variable independent: presència de rodamina isotiocianat en les nanopartícules.

A part de la variable dependent, vam dur a terme diverses mostres control per comprovar que la presència de fluorescència a les cèl·lules en el resultat final

realment era deguda a la presència de les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat. Aquestes mostres control eren:

- Nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat sinó amb aigua a la part interna (per demostrar que la presència de fluorescència no era provocada per les nanopartícules de PLGA en si).
- Cèl·lules a les quals no vam introduir nanopartícules (per demostrar que la presència de fluorescència no era provocada per les cèl·lules).




Apart de les pràctiques que vaig estar duent a terme al laboratori, he afegit també una comparació d'un fàrmac antitumoral convencional amb la nanopartícula que transporta aquest fàrmac de forma dirigida, per tal de reforçar la meva hipòtesis i comprovar que realment els nanofàrmacs ens aporten beneficis molt importants i de forma significativa.

9.1. PRÀCTIQUES DIA 1

-MATERIALS:

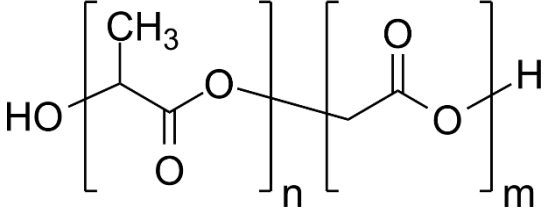
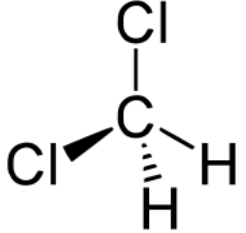
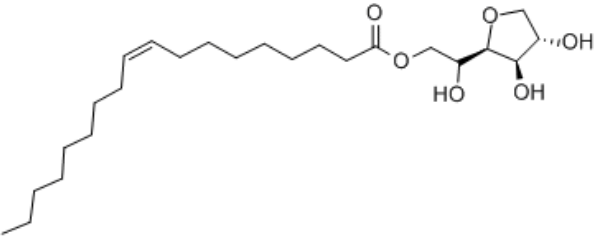

- ESTRIS I APARELLS DE LABORATORI:



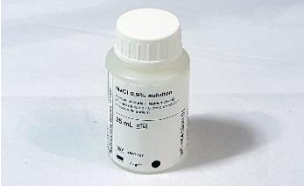

<u>NOM, DESCRIPCIÓ I UNITATS</u>	<u>IMATGE</u>
<p>6 Mosques magnètiques: Petit imant que serveix per a barrejar substàncies amb l'ajuda de l'agitador magnètic.</p>	
<p>1 Agitador magnètic: Aparell que genera un camp magnètic que fa girar la mosca magnètica, provocant així barrejar la substància d'interès.</p>	
<p>1 Espàtula: Utilitzada per agafar petites quantitats de compostos sòlids.</p>	
<p>1 Balança analítica: Utilitzada per a pesar compostos amb molta precisió. Té una sensibilitat de fins a una desena mil·lèsima de gram.</p>	
<p>4 Vials: Pot on dipositar substàncies amb les quals s'està treballant.</p>	

<p>2 Tubs d'Eppendorf: Apart d'utilitzar-se de la mateixa forma que els vials, també s'utilitzen per a centrifugar substàncies.</p>	
<p>1 Pipetejador: Estri utilitzat per a traspassar quantitats precises de líquids d'un recipient a un altre. No fa el buit, per tant depèn de la capil·laritat del dissolvent que aquest no es perdi.</p>	
<p>1 Pipetejador especial per a dissolvents orgànics: Pipetejadors utilitzats només en solvents orgànics que agafen directament el líquid i fan el buit, de manera que no permeten que la viscositat del dissolvent provoqui que aquest es perdi.</p>	
<p>1 Capsa amb puntes pel pipetejador: Les puntes es col·loquen a la part inferior del pipetejador, és on es troba el líquid abans de deixar-lo anar a l'altre recipient. És important anar canviant les puntes cada cop que agafem una substància diferent amb el pipetejador, per tal d'evitar contaminar cap mostra.</p>	

<p>1 Sonicador: Aparell amb una agulla que genera unes vibracions d'alta intensitat, les quals generen ones d'ultrasò que agiten la substància o les partícules.</p>	
<p>2 Pipetes graduades: Són utilitzades pel mateix que els pipetejadors, tot i que les pipetes graduades funcionen manualment i traspassen d'un recipient a un altre quantitats més grans de líquids que el pipetejador.</p>	
<p>1 Pipetejador elèctric: S'utilitza per aspirar les substàncies per a que puguin entrar dins de la pipeta graduada.</p>	
<p>1 Vas de precipitats: Recipient de laboratori utilitzat per barrejar substàncies, escalfar-les, contenir-les, etc.</p>	
<p>1 Suport elevador: Utilitzat per elevar i mantenir qualsevol estri de laboratori a una certa alçada.</p>	

• COMPOSTOS QUÍMICS:

<u>NOM, DESCRIPCIÓ I UNITATS</u>	<u>IMATGE</u>
<p>25 mg PLGA (àcid poli làctic-co-glicòlic): Polímer format per 50% d'àcid làctic i un 50% d'àcid glicòlic. És un dels polímers sintètics biodegradables més utilitzats per generar nanopartícules biocompatibles, ja que és una plataforma aprovada pel FDA i EMA als Estats Units per al subministrament de medicaments en humans.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of PLGA, a copolymer of lactide and glycolide. It consists of two repeating units: a lactide unit with a methyl group (CH₃) and a hydroxyl group (HO) on the chiral carbon, and a glycolide unit with two hydroxyl groups (H and OH) on the chiral carbon. The units are linked by ester bonds and are enclosed in brackets with subscripts 'n' and 'm' respectively.</p>
<p>750 microlitres Diclorometà (CH₂ Cl₂): És un líquid incolor volàtil molt usat com solvent. Encara que no és miscible amb aigua ho és amb molts solvents orgànics.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of dichloromethane (CH₂Cl₂). It features a central carbon atom bonded to two chlorine atoms (Cl) and two hydrogen atoms (H). One chlorine atom is positioned above the carbon, and the other is to the left, both shown with solid wedge bonds. The two hydrogen atoms are to the right and below the carbon, shown with dashed wedge bonds.</p>
<p>30 microlitres SPAN-80: És un surfactant o emulsionant. Té caràcter amfipàtic i per tant fa d'estabilitzador, permetent que substàncies hidrofíliques i hidrofòbiques puguin estar en contacte.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of SPAN-80. It consists of a long, branched hydrophobic chain (a long-chain alcohol) attached to a hydrophilic head group. The head group is a sorbitol derivative, specifically a sorbitol molecule with a hydroxyl group (OH) and a hydroxyl group (OH) on the ring, and a hydroxyl group (OH) on the side chain.</p>
<p>190 microlitres H₂O destil·lada: Aigua que ha estat netejada i purificada mitjançant el procés de destil·lació.</p>	 <p>The image shows a photograph of a white plastic jug of distilled water. The label on the jug clearly reads "AGUA DESTILADA" and includes some smaller text and a logo.</p>

<p>10 microlitres Rodamina Isotiocianat:</p> <p>Substància fluorescent innòcua amb característiques fisiològiques semblants a la Doxorubicina (fàrmac antitumoral), utilitzem la Rodamina Isotiocianat enlloc de la Doxorubicina per qüestions de seguretat.</p>	
<p>4,7 ml Alcohol polivinílic (PVA) al 4%:</p> <p>Es tracta d'un surfactant o emulsionant, és a dir, a l'igual que el SPAN-80, també té caràcter amfipàtic (té una part hidrofílica i una hidrofòbica) i al col·locar-se en la interfície entre les substàncies amb diferents hidrofilitats (amb el costat hidrofílic en contacte amb l'hidrofílic i amb el costat hidrofòbic en contacte amb l'hidrofòbic) permet el contacte entre elles.</p>	
<p>4,7 ml NaCl</p>	
<p>Gel</p>	

-EXPLICACIÓ: Les nanopartícules de PLGA (50% àcid làctic i 50% àcid glicòlic) es sintetitzen a través d'un procés de doble emulsió. Consten de diverses fases o capes. La capa interna és on es troba el fàrmac, en aquest cas es tracta de la rodamina isotiocianat diluïda en aigua destil·lada, per tant es tracta d'una capa

hidrofílica. La fase orgànica o segona capa és formada pel polímer de PLGA, diclorometà i el SPAN-80 (es tracta d'una capa hidrofòbica). I l'última capa és una dissolució d'alcohol polivinílic i NaCl (capa hidrofílica).

-PROCEDIMENT:

- Comencem amb la **fase orgànica** (capa intermitja hidrofòbica):
 1. Pesem uns 25 mg de PLGA (dipositats en un vial amb l'ajuda d'una espàtula), amb una balança analítica.



Figura 30: 24,9 mg de PLGA pesats en una balança analítica. **Font:** *Estudi Propi*

2. Afegim en el vial 750 µl de diclorometà (CH_2Cl_2) amb l'ajuda del pipetejador especial per a dissolvents orgànics.



Figura 31: Transferint al vial de la fase orgànica els 750 µl de diclorometà amb l'ajuda del pipetejador especial per a solvents orgànics. **Font:** *Estudi propi*

3. Finalment afegim en el vial 30 µl SPAN-80 amb el pipetejador especial per a dissolvents orgànics (degut a la alta viscositat de l'emulsionant). El SPAN-80 permetrà que la fase orgànica

(hidrofòbica) pugui entrar en contacte amb la fase interna (hidrofílica).



Figura 32: Transferint els 30 μ l de SPAN-80 amb el pipetejador especial per a solvents orgànics. **Font:** *Estudi propi*

4. I per acabar la fase orgànica, introduïm en el vial una mosca magnètica i col·loquem el vial damunt l'agitador magnètic, el qual provocarà que es barregi i formi una dissolució homogènia.

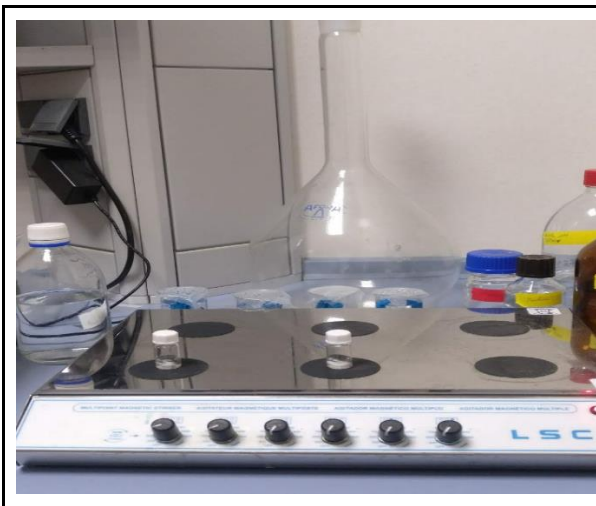


Figura 33: Les dues mostres de fase orgànica en els seus vials corresponents (una mostra és la control), a l'agitador magnètic barrejant-se. **Font:** *Estudi propi*

- REPETIM EL PROCÉS: (sintetitzem dos cops la fase orgànica en dos vials diferents), per tal de poder dur a terme una mostra control més endavant.

- Seguidament, preparem la **fase interna** (capa hidrofílica):
 5. Per començar, fem els càlculs necessaris per a trobar la quantitat de rodamina isotiocianat i d'aigua destil·lada que necessitem, tenint en compte les següents qüestions:
 - Per a que les nostres nanopartícules tinguin un tamany d'uns 200 nm aproximadament, ens interessa que la proporció entre el diclorometà i la fase interna sigui 1/10. Per tant, com que en la fase orgànica tenim 750 µl de diclorometà, necessitarem uns 75 µl de rodamina isotiocianat. Tot i així, en preparem una mica més (uns 100 µl, amb ajuda del pipetejador) perquè a vegades pipetejant se'n perd una mica i els aparells no són del tot precisos.
 - La rodamina isotiocianat que tenim es troba a la seva màxima solubilitat en aigua, a 10 mg/ml. El problema és que si treballem amb la rodamina isotiocianat en la seva màxima concentració, després observarem les nanopartícules amb el microscopi fluorescent, tindrem massa senyal i no es veurà amb claredat. Per tant diluïrem 10 cops més la rodamina isotiocianat, donant-li així una concentració de 1 mg/ml.
 6. Arribem aleshores a la conclusió de que si volem que la fase interna sigui una dissolució 1/10 formada per rodamina isotiocianat i aigua destil·lada d'uns 100 µl en total, necessitarem 10 µl de rodamina isotiocianat i uns 90 µl d'aigua destil·lada.
 7. Afegim doncs l'aigua destil·lada i la rodamina isotiocianat en les seves proporcions adequades, en un tub d'Eppendorf, amb l'ajuda d'un pipetejador.
 8. Per finalitzar aquesta fase, agitem manualment la fase interna fins a que formi una dissolució homogènia.



Figura 34: Rodamina isotiocianat diluïda en aigua en un tub d'Eppendorf.

Font: Estudi propi

- REPETIM UN COP MÉS EL PROCÉS: però aquest cop enlloc d'introduir rodamina isotiocianat, la fase interna simplement constarà de 100 µl d'aigua destil·lada (dipositem la segona fase interna en un altre tub d'ependorf). Aquesta segona fase interna es tracta d'una mostra control per a demostrar que la fluorescència que es vegi a les cèl·lules amb el microscopi de fluorescència és degut només a les nanopartícules amb rodamina. Les cèl·lules amb nanopartícules sense rodamina no haurien de mostrar cap presència de fluorescència.
- I finalment preparam l'última capa que ens queda, la **fase externa** (hidrofílica):
 9. Necessitem l'alcohol polivinílic (PVA) al 2% massa/ volum, però per evitar que aquest es contamiï es troba al laboratori el doble de concentrat (al 4% massa/ volum), per tant com que en necessitavem 9,4 ml, n'agafarem la meitat, és a dir, uns 4,7 ml amb una pipeta graduada i el pipetejador elèctric, el qual dipositem en un altre vial. L'alcohol polivinílic, al ser també un surfactant, farà la mateixa funció que el SPAN-80 i permetrà que la fase externa (hidrofílica) pugui estar en contacte amb la fase intermitja (hidrofòbica).

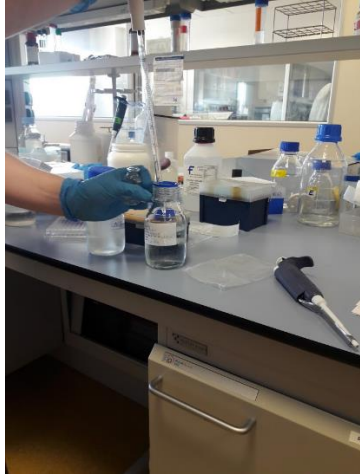


Figura 35: Introducció dels 4,7 ml d'alcohol polivinílic al 4% amb ajuda de la pipeta graduada i el pipetejador elèctric en un vial. **Font:** *Estudi propi*

10. A més, s'ha comprovat que si a la fase externa, juntament amb l'alcohol polivinílic, hi ha presència de NaCl, la quantitat de rodamina isotiocianat que ens queda fora de les nanopartícules es redueix (mai hi ha un 100% d'encapsulació) i per tant s'incrementa el tant per cent d'encapsulació d'un 30% a un 40-45% d'encapsulació, el qual és un percentatge d'encapsulació bastant bo. Per tant, en dipositarem uns 4,7 ml en el vial amb una altra pipeta graduada i el pipetejador elèctric.

- REPETIM EL PROCÉS: (sintetitzem dos cops la fase externa en dos vials diferents), per tal de poder dur a terme una mostra control.
- Seguidament durem a terme la **sonicació** de les diferents fases per tal d'acabar la síntesis de les nanopartícules de PLGA:
 11. Per començar introduïm la fase interna dins del vial que conté la dissolució de la fase orgànica o intermitja.



Figura 36: Vial amb la fase orgànica i tub d'Eppendorf amb la fase interna a punt per barrejar-se i dur a terme la primera emulsió. **Font:** *Estudi propi*

12. Preparam el sonicador afegint-li l'agulla del tamany que ens interessa, per tal de que ens capiga amb facilitat a l'interior del vial.

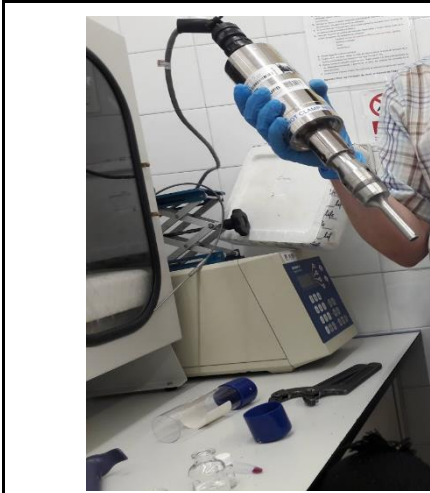


Figura 37: Canviant-li l'agulla al sonicador.

Font: Estudi propi



Figura 38: Sonicador preparat, abans d'introduir-hi les substàncies a sonicar. *Font: Estudi propi*

13. Introduïm gel en el vas de precipitats, ja que la sonicació escalfa molt la substància i en el cas de proteïnes pot arribar a desnaturalitzar-les; col·loquem el vial amb la fase orgànica i la interna a l'interior del vas de precipitats i col·loquem el vas de precipitats damunt d'un suport elevador, dins del sonicador, per a que l'agulla del sonicador quedi just a l'interior del vial (sense tocar el vidre, ja que les vibracions podrien trencar-lo).

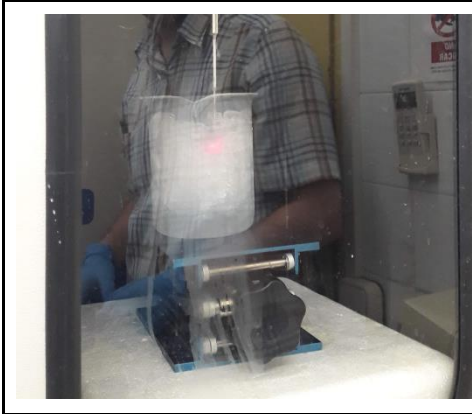


Figura 39: Vas de precipitats amb gel i amb el vial amb la fase orgànica i la fase interna sonificant-se. La petita zona rosa que s'observa a la part superior del vas de precipitats, entre el gel, és el vial. S'observa d'aquest rosa clar degut a la barreja del polímer de PLGA (blanc) i la rodamina isotiocianat (rosa fucsia). **Font:** *Estudi propi*

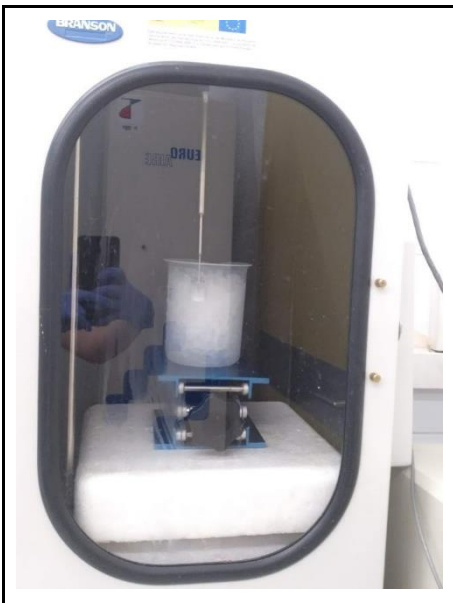


Figura 40: Vas de precipitats amb gel i amb el vial amb la fase orgànica control i la fase interna control sonificant-se. A la part superior del vas de precipitats, entre el gel, es pot observar el vial. No s'observa el rosa clar de la fotografia anterior degut a que la fase interna control no conté rodamina isotiocianat. **Font:** *Estudi propi*

14. Tot seguit soniquem 90s a 25% d'amplitud, el resultat d'aquí serà la primera emulsió. Al sonicar, les ones d'ultrasons provoquen que la fase interna formi bombolles de tamany nanomètric i que la fase intermitja quedi pel voltant. Aquest resultat és el mateix que ens passa quan agitem un compost d'aigua i oli, l'oli forma bombolles i tot seguit s'ajunten fins acumular-se tot formant una capa per sobre de l'aigua. Aquest fenomen passa perquè l'oli al ser hidrofòbic, vol tenir el mínim contacte amb l'aigua possible, i abans d'ajuntar-se i acumular-se tot junt, es troba en forma d'esfera (forma amb la qual entra amb el mínim contacte possible amb l'aigua). Passa el mateix en aquest cas degut a les diferents hidrofilitats de la fase interna i

l'orgànica, tot i que la fase interna queda en forma de bombolles nanomètriques gràcies al SPAN-80 (estabilitzador), que provoca que no s'ajuntin ja que baixa la tensió superficial.

15. Introduïm aleshores aquesta primera emulsió en el vial de la fase externa i col·loquem el vial al vas de precipitats, dins del sonicador (és el mateix procés que el pas 12).



Figura 41: Primera emulsió amb la rodamina isotiocianat (part rosa) introduïda en el vial de la fase externa, a punt per a la sonicació.

Font: Estudi propi



Figura 42: Mostra control de la primera emulsió (és de color blanc degut a que en la fase interna no hi conté rodamina isotiocianat) introduïda en el vial de la fase externa, a punt per a la sonicació.

Font: Estudi propi

16. Soniquem 90s a 25% d'amplitud i el resultat serà semblant al pas 13, ja que la fase orgànica forma bombolles nanomètriques per sobre de les bombolles nanomètriques de la fase interna (les quals no s'ajuntaran gràcies a l'alcohol polivinílic i la fase externa en quedarà pel voltant). Aquest resultat és el que anomenem la segona emulsió.



Figura 43: Resultat de les dues segones emulsions. El vial de l'esquerra (el que conté la substància blanca) és la mostra control, la qual no conté rodamina isotiocianat, per això l'observem el color blanc degut al PLGA. El vial de la dreta (el que conté la substància rosa) és la que conté les nanopartícules amb rodamina isotiocianat. **Font:** *Estudi propi*

17. Dipositem una mosca magnètica al vial de la segona emulsió i el col·loquem en l'agitador magnètic.

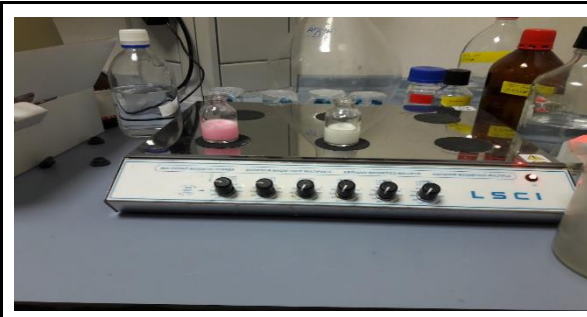


Figura 44: Els dos vials amb les dues segones emulsions a l'agitador magnètic. **Font:** *Estudi propi*

18. Deixem la segona emulsió agitant-se *overnight*, és a dir durant tota la nit. En aquest temps, s'evaporarà el diclorometà de la fase orgànica, quedant així el polímer de PLGA sòlid formant una càpsula al voltant de la fase interna. La segona emulsió que conté rodamina isotiocianat s'ha de tancar amb un objecte (caixa de cartró) per tal de no perdre la fluorescència, però amb forats per a que s'evapori el diclorometà.



Figura 45: Els dos vials amb les segones emulsions deixant-se agitar *overnight*. El vial tapat amb una capsa de cartró amb forats és el de la mostra que conté la rodamina isotiocianat, la qual és fluorescent, per això es cobreix, per tal de no perdre la seva fluorescència. **Font:** *Estudi propi*

- REPETIR PROCÉS AMB LA MOSTRA CONTROL.

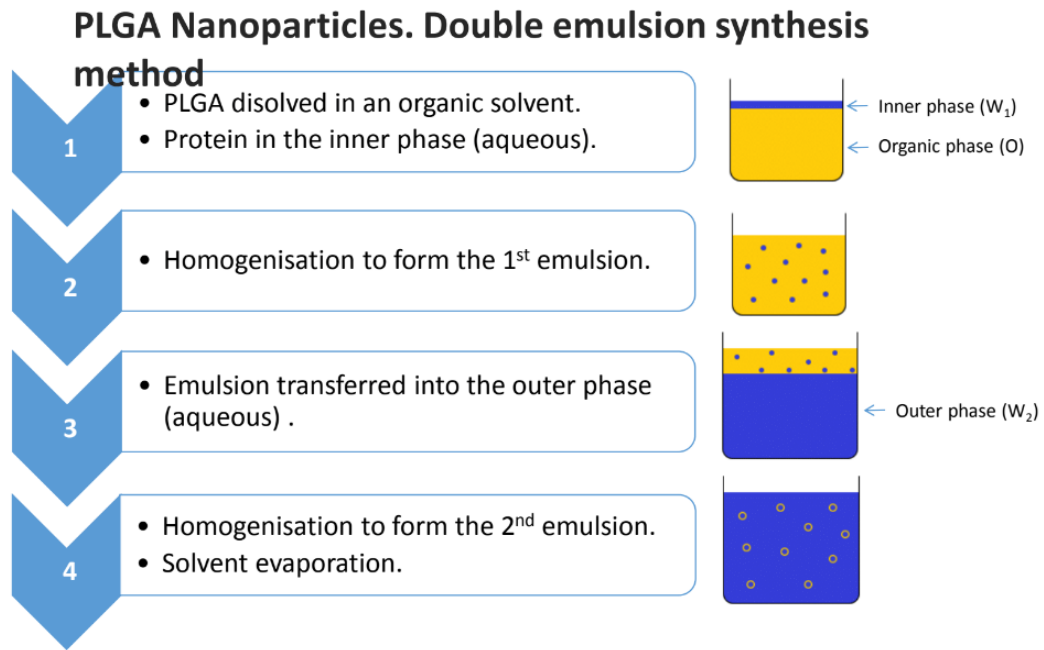
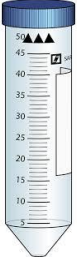










Figura 46: Resum esquemàtic de la síntesis de les nanopartícules de PLGA a través del mètode de la doble emulsió. **Font:** *Estudi propi*







9.2. PRÀCTIQUES DIA 2

-MATERIALS:

- ESTRIS I APARELLS DE LABORATORI:

<u>NOM, DEFINICIÓ I UNITATS</u>	<u>IMATGE</u>
<p>3 Tubs de falcon: Tub on dipositar substàncies amb les quals s'està treballant.</p> <p>Sobretot és utilitzat per a contenir la substància que s'està centrifugant en una centrifugadora.</p>	
<p>1 Campana de seguretat biològica: Es tracta d'un recinte o espai de treball tancat i ventilat, els forats de la ventilació del qual són de tamany nanomètric, de manera que l'aire de l'interior de la cabina és estèril.</p> <p>S'utilitza per treballar amb substàncies i compostos que no ens interessa que es contaminin com podrien ser cultius cel·lulars.</p>	
<p>1 Incubadora: És un aparell que serveix per a mantenir i fer créixer a cultius microbiològics o cultius cel·lulars. La incubadora manté la temperatura, la humitat i altres condicions en estat òptim i constant per a mantenir aquests cultius vius. (Podem regular aquestes condicions segons ens interressi).</p>	

<p>2 Centrifugadores: Es tracta d'un aparell que utilitza la força centrífuga per tal d'accelerar i provocar la sedimentació, decantació o precipitació de mescles homogènies.</p>	
<p>4 Tubs d'Eppendorf</p>	
<p>1 Pipetejador</p>	
<p>1 Capsa amb puntes pel pipetejador</p>	
<p>1 Vòrtex: Es tracta d'un agitador de substàncies per tal de barrejar-les. La punta superior tremola agitant així la substància que s'hi estigui aguantant amb força manualment.</p>	
<p>6 Tubs d'assaig: Tubs on dipositar substàncies amb les quals s'està treballant.</p>	

<p>1 Gradeta: És un instrument de laboratori que té com a finalitat aguantar drets els tubs d'assaig.</p>	
<p>1 Sonicador de bany d'ultrasons: Es tracta d'un aparell que emet ultrasons que agiten la substància o les partícules.</p>	
<p>2 Pipetes pasteur estèrils: Estri utilitzat per a traspassar quantitats precises de líquids d'un recipient a un altre.</p>	
<p>1 Bomba de buit: Es tracta d'un dispositiu que s'encarrega d'aspirar i extreure substàncies no desitjades.</p>	
<p>6 Pipetes graduades</p>	
<p>1 Pipetejador elèctric</p>	

<p>3 Plaques de petri: S'utilitza en els laboratoris principalment en el cultiu de bacteris o altres microorganismes, tot cobrint el fons amb diferents medis de cultiu segons el microorganisme que es vol cultivar.</p>	
<p>3 Cobreobjectes: Es tracta d'un vidre molt prim que es col·loca sobre la mostra que es vol observar amb un microscopi.</p>	
<p>1 Encenedor: Dispositiu que genera una flama. És utilitzat per encendre altres objectes. Al laboratori es pot utilitzar per tal d'esterilitzar objectes.</p>	
<p>1 Pinceres de laboratori: Utilitzades per agafar objectes petits.</p>	
<p>1 Microscopi òptic: Es tracta d'un aparell que utilitza llum visible i un sistema de lents òptiques per augmentar la imatge d'una mostra no visible a ull nu.</p>	

- COMPOSTOS QUÍMICS:

<u>NOM, DESCRIPCIÓ I UNITAT</u>	<u>IMATGE</u>
<p>Aigua destil·lada</p>	
<p>Els dos vials del dia anterior amb les nanopartícules de PLGA</p>	
<p>17 ml DMEM (medi de cultiu cel·lular): Es tracta d'un líquid que ajuda amb la proliferació i creixement cel·lular, ja que els hi proporciona un medi on créixer i nutrients per poder-ho fer.</p>	
<p>10 ml Tampó fosfat salí (PBS): És una solució tampó generalment utilitzada en recerca biològica. Es tracta d'una solució aquosa salina que conté fosfat d'hidrogen del sodi, clorur de sodi i, dins algunes formulacions, clorur de potassi i fosfat de monopotassi.</p>	

Flascó de cultiu cel·lular amb cèl·lules HeLa:

Es tracta d'un flascó que conté medi de cultiu amb cèl·lules de la línia cel·lular HeLa creixent-hi a l'interior. La línia cel·lular HeLa és una línia cel·lular de càncer de cèrvix, concretament es tracta de la primera que es va fer servir per a cultius cel·lulars als anys 50, per tant aquestes cèl·lules porten gairebé 70 anys creixent ininterrompudament. S'utilitzen al laboratori per a fer experiments, la raó per la qual es fa experiments més sovint amb cèl·lules cancerígenes que amb cèl·lules sanes és perquè, apart del creixement tan ràpid de les cèl·lules tumorals en comparació amb la resta, tenen una gran capacitat d'adaptació i molt difícilment es moren en comparació amb les cèl·lules no tumorals.



3 ml de Tripsina: Es tracta d'un enzim que hidrolitza proteïnes. És utilitzada al laboratori sobretot per desadherir els cultius cel·lulars que creixen adherits a la superfície del flascó on creixen i proliferen, ja que s'encarrega de tallar les proteïnes que enganxen les cèl·lules amb la base.



Alcohol 100% pur



-PROCEDIMENT:

- Comencem netejant les nostres nanopartícules a través de la **centrifugació**:
 1. Omplim 4 tubs d'Eppendorf amb 1 ml cadascun de la segona emulsió de nanopartícules amb rodamina isotiocianat amb l'ajuda d'un pipetejador. Les nanopartícules d'un d'aquests tubs seran les que introduïrem a les cèl·lules per tal de comprovar més endavant si hi han entrat o no. Les nanopartícules dels altres 3 tubs d'Eppendorf seran per dur a terme una DLS més endavant. En canvi, el contingut del vial que conté la mostra control de la segona emulsió la repartirem en dos tubs falcon o tubs de centrifuga amb l'ajuda d'un pipetejador. El contingut d'un d'aquests tubs falcon serà el que introduïrem a unes altres cèl·lules i el de l'altre tub també l'utilitzarem més endavant per a dur a terme una DLS.

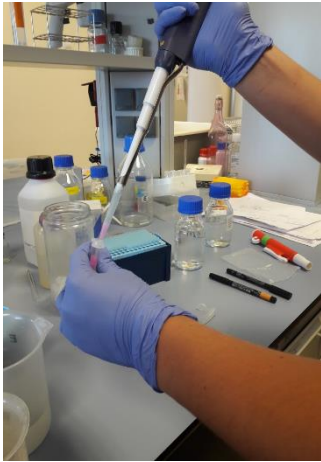


Figura 47: Repartint el contingut del vial amb les nanopartícules amb rodamina isotiocianat en els tubs d'Eppendorf. **Font:** *Estudi propi*

2. Tot seguit col·loquem els 4 tubs d'Eppendorf que contenen les nanopartícules amb rodamina isotiocianat en una centrifugadora de forma ben repartida. És a dir, ens ha de quedar el mateix nombre de tubs d'Eppendorf a cada costat de la centrifugadora, ja que sinó aquesta es desequilibrarà degut a que hi haurà un costat on la pressió a la qual es veurà sotmesa serà major a la de l'altra costat.



Figura 48: Centrifugadora amb els tubs d'Eppendorf amb les nanopartícules amb rodamina isotiocianat. (Hi ha més de 4 tubs d'Eppendorf degut a que vaig realitzar la pràctica amb més noies i per tant en vam col·locar més). **Font:** *Estudi propi*

3. Aleshores ho centrifuguem a una velocitat d'uns 30000 G (30000 cops la gravetat terrestre) durant una hora per tal de precipitar les nanopartícules.



Figura 49: Condicions aplicades a la centrifugadora, a la pantalla es pot veure que hem programat la velocitat a uns 30000 G. **Font:** *Estudi propi*

4. Més tard, a l'extreure els tubs d'Eppendorf de la centrifugadora, podem observar una acumulació a la punta de baix dels tubs de color rosa, això són les nanopartícules precipitades. El líquid transparent de color rosat de per sobre és el que anomenem sobrenedant, el qual conté sulfat i colorant sobrant de la rodamina isotiocianat que no s'ha encapsulat.



Figura 50: Tub d'Eppendorf amb les nanopartícules amb rodamina isotiocianat després de la primera centrifugació. Podem observar i distingir les nanopartícules acumulades a la part baixa d'un color rosa intens i el sobrenedant per a sobre de les nanopartícules.

Font: Estudi propi

5. Aboquem el sobrenedant de tots els tubs d'Eppendorf manualment en un tub d'assaig, amb compte per tal de no abocar-hi les nanopartícules acumulades a la part inferior.
6. Afegim aleshores 1 ml d'aigua destil·lada en cadascun dels tubs d'Eppendorf amb l'ajuda d'un pipetejador.
7. Per tal de resuspendre les nanopartícules, col·loquem els tubs d'Eppendorf sobre el vòrtex. I per acabar d'individualitzar les nanopartícules, sotmetem la dispersió col·loïdal de nanopartícules amb aigua destil·lada en un bany de sonicació.



Figura 51: Resuspenent les nanopartícules amb l'ajuda del vòrtex. *Font: Estudi propi*

- REPETIM EL PROCÉS DE CENTRIFUGAR, RESUSPENDRE I SONICAR 3 COPS MÉS: és a dir en total haurem centrifugat les nanopartícules 4 cops i tindrem 3 tubs d'assaig amb sobrenedant. El

resultat serà que el sobrenedant de l'última centrifugació serà transparent del tot, ja que ja no contindrà sulfats ni colorant ni rodamina isotiocianat no encapsulada, aquest últim sobrenedant transparent el deixem al tub d'Eppendorf.

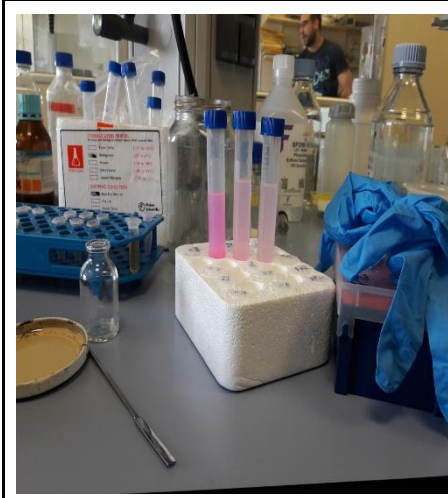


Figura 52: Tubs d'assaig amb els tres sobrenedants de les 3 primeres centrifugacions. El canvi de color de cada tub d'assaig és degut a que el sobrenedant cada cop té menys colorant, ja que cada cop té menys rodamina isotiocianat sense encapsular.

Font: Estudi propi

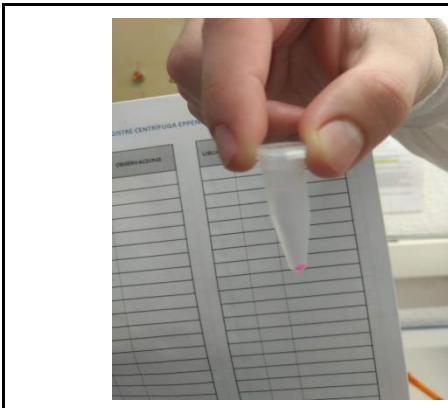


Figura 53: Nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat en un tub d'Eppendorf després de l'última centrifugació. Com es pot observar, el sobrenedant d'aquesta última centrifugació és totalment transparent, sense cap resta de sulfat ni colorant.

Font: Estudi propi

8. En el cas dels tubs falcon o tubs de centrifuga amb les mostres control, els sotmetrem en el mateix procediment (el mateix nombre de cops), l'única diferència és que els centrifugarem en una altra centrifugadora que pot contenir tubs més grans, com serien tubs falcon.



Figura 54: Centrifugadora amb els 2 tubs falcon amb les nanopartícules sense rodamina isotiocianat. **Font:** *Estudi propi*

- Paral·lelament, mentre esperem durant les hores entremig de les centrifugacions, abans de preparar el cultiu cel·lular duem a terme la **tripsinació** per tal de poder extreure les cèl·lules després (tot aquest procés el duem a terme en una campana de seguretat biològica per tal d'evitar la contaminació de les cèl·lules):

9. Les cèl·lules que sembrarem es troben en un medi de cultiu (DMEM) en un flascó que està en una incubadora, a una temperatura d'uns 37° C . Aquestes cèl·lules, però, es troben adherides a la superfície del flascó i per tant per extreure-les, els hi hem d'afegir tripsina, la qual s'encarrega de tallar les proteïnes que enganxen les cèl·lules amb el flascó.

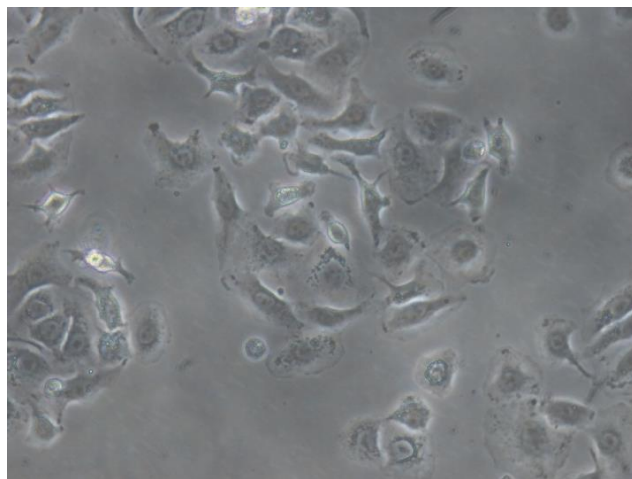


Figura 55: Cèl·lules HeLa observades amb el microscopi òptic a la UAB. Com es pot comprovar, les cèl·lules tumorals són cèl·lules amb formes molt irregulars i que creixen sense ordre, disperses de forma espontània. **Font:** *Estudi propi*

10. Abans, però, haurem d'extreure'ls el medi de cultiu cel·lular, ja que aquest no permetria que la tripsina actués sobre les proteïnes de les cèl·lules, ja que les protegeix. Extraïem doncs el medi de cultiu amb una pipeta pasteur estèril enganxada a una bomba de buit que aspirarà el medi de cultiu del flascó.



Figura 56: Extraient el medi de cultiu cel·lular del flascó amb la pipeta pasteur connectada a una bomba de buit. **Font:** *Estudi propi*

11. De seguida, sense trigar gaire ja que les cèl·lules es troben sense medi i si s'assequen moriran; introduïm al flascó uns 10 ml de tampó fosfat salí (PBS) amb una pipeta graduada i un pipetejador elèctric. El PBS ens serveix per retirar les restes que ens puguin quedar de medi.

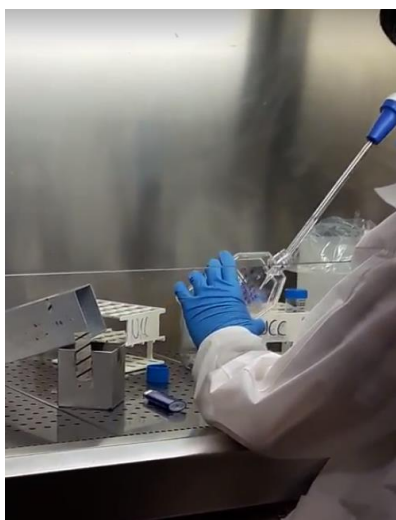


Figura 57: Afegint els 10 ml de PBS al flascó amb les cèl·lules adherides, amb ajuda de la pipeta graduada i el pipetejador elèctric. **Font:** *Estudi propi*

12. Extraïem aleshores el PBS amb una altra pipeta pasteur estèril connectada a una bomba de buit.

13. I afegim 3 ml de tripsina amb una altra pipeta graduada i el pipetejador elèctric.

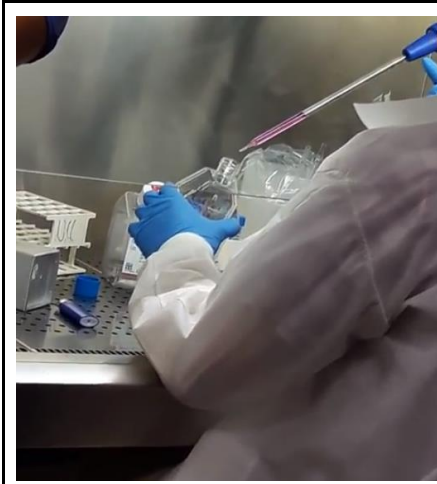


Figura 58: Afegint la tripsina al flascó per tal de desadherir les cèl·lules de la superfície del flascó. **Font:** *Estudi propi*

14. Deixem el flascó amb les cèl·lules en tripsina a la incubadora a uns 37° C durant uns 5 minuts màxim, ja que un cop la tripsina hagi actuat sobre les proteïnes que adhireixen a les cèl·lules, començarà a actuar sobre altres proteïnes, el qual no ens interessa, ja que acabaria trencant les membranes de les cèl·lules.



Figura 59: Condicions de la incubadora. **Font:** *Estudi propi*

15. Un cop passats els 5 minuts, neutralitzem l'acció de la tripsina afegint-hi 7 ml de medi de cultiu (DMEM) amb una pipeta graduada i un pipetejador elèctric.



Figura 60: Afegint el medi de cultiu cel·lular (DMEM) amb l'ajuda de la pipeta graduada i el pipetejador elèctric al flascó per tal de neutralitzar l'acció de la tripsina. **Font:** Estudi propi

16. Transferim aleshores aquests 10 ml en un tub falcon estèril amb l'ajuda d'una pipeta graduada i el pipetejador elèctric.

17. Extraïem el 30% del tub de falcon és a dir extraïem 3 ml amb la mateixa pipeta graduada i el pipetejador elèctric i els dipositem al flascó per tal de que segueixin creixent-hi cèl·lules i seguir així amb la línia cel·lular. Hi afegim també al flascó amb una altra pipeta graduada i el pipetejador elèctric, uns 10 ml de medi de cultiu per a que les cèl·lules es puguin alimentar i créixer.

18. Finalment amb els 7 ml restants del tub falcon fem una dissolució 1/10 amb aigua destil·lada, amb l'ajuda d'una altra pipeta graduada i un pipetejador elèctric.

- Aleshores **preparam el cultiu cel·lular** (tot aquest procés el durem a terme en una campana de seguretat biològica per tal d'evitar la contaminació de les cèl·lules):

19. Introduïrem les cèl·lules en plaques de petri on les sembrarem per tal d'afegir-hi després les nanopartícules de PLGA. El problema és que la placa de petri està feta de plàstic i l'índex de refracció de la llum

del plàstic provocaria que a l'observar les cèl·lules amb el microscopi de fluorescència no es veiés bé, ja que es veuria la fluorescència de la rodamina isotiocianat dispersa. Per tant introduïrem un cobreobjectes en la placa de petri per tal de que les cèl·lules hi creixin per sobre i poder-les observar millor després, ja que el cobreobjectes és de vidre i no crearà aquesta refracció de la llum.

20. Abans, però, haurem d'esterilitzar els cobreobjectes per tal de que no contaminin el cultiu. Això ho farem mullant-los en alcohol 100% pur amb l'ajuda d'unes pinces de laboratori i posteriorment, encenent el cobreobjectes amb un encenedor, cremant l'alcohol per tal d'eliminar qualsevol tipus de microorganisme que hi pugui haver i esterilitzar així el cobreobjectes.



Figura 61: Esterilitzant els cobreobjectes.

Font: Estudi propi

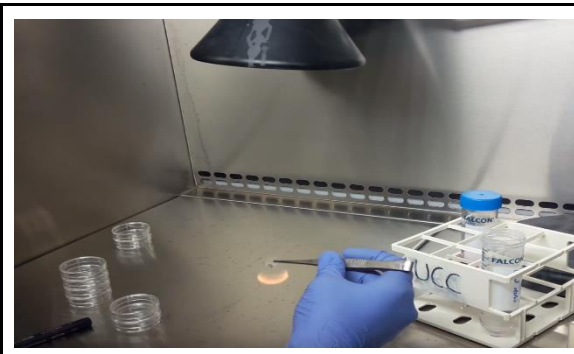


Figura 62: Cremant l'alcohol del cobreobjectes per acabar-ne l'esterilització. *Font: Estudi propi*

21. Introduïm el cobreobjectes estèril dins de la placa de petri, la qual és estèril per dins i per tant ja podem introduir-hi les cèl·lules sense que es puguin contaminar.

22. Per tant, amb una pipeta graduada i el pipetejador elèctric, transferim 1,5 ml d'aquestes cèl·lules HeLa diluïdes 1/10 en medi de cultiu del tub falcon a les plaques de petri que contenen el cobreobjectes esterilitzat. Hem d'assegurar-nos de que tota la superfície de la placa de petri queda recoberta.



Figura 63: Treballant dins la campana de seguretat biològica, preparant la pipeta graduada i el pipetejador elèctric per a poder transferir les cèl·lules HeLa a la placa de petri.

Font: Estudi propi

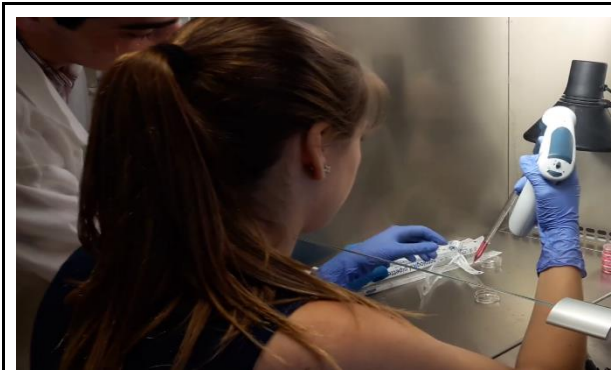


Figura 64: Transferint les cèl·lules HeLa a la placa de petri que conté el cobreobjectes, per tal de deixar-les durant la nit creixent. **Font:**

Estudi propi

23. Deixem créixer les cèl·lules durant tota la nit a la incubadora a uns 36,5° C. Així, l'endemà les cèl·lules hauran crescut prou com per a que puguem dur a terme els següents experiments.

- REPETIM EL PROCÉS 3 COPS: així tindrem 3 plaques de petri amb un cobreobjectes estèril i les cèl·lules creixent-hi. En una d'aquestes plaques de petri hi introduïrem les nanopartícules amb rodamina isotiocianat, les altres dos són mostres control, ja que en una introduïrem les nanopartícules sense rodamina isotiocianat i en l'altra no hi introduïrem res, per tal de demostrar així que l'aparició de

fluorescència és només degut a la presència de nanopartícules amb rodamina isotiocianat.









Figura 65: Plaques de petri amb les cèl·lules HeLa dil·luides 1/10 en medi de cultiu del tub falcon a les plaques de petri que contenen el cobreobjectes esterilitzat. *Font: Estudi propi*

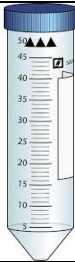






9.3. PRÀCTIQUES DIA 3







-MATERIALS:


- ESTRIS I APARELLS DE LABORATORI:

<u>NOM, DESCRIPCIÓ I UNITATS</u>	<u>IMATGE</u>
1 Campana de bioseguretat biològica	
1 Pipetejador	
1 Vòrtex	
1 Sonicador de bany d'ultrasons	
1 Incubadora	
1 Retolador	




ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?



<p>1 Tub Falcon</p>	
<p>3 Pipetes graduades</p>	
<p>1 Pipetejador elèctric</p>	
<p>1 Vareta de vidre: Estri de laboratori utilitzat per barrejar substàncies i formar dissolucions.</p>	
<p>1 Capsa de pipetes</p>	
<p>1 Balança analítica</p>	
<p>2 Vasos de precipitats</p>	



<p>1 Espàtula</p>	
<p>1 Aparell de DLS: Permet veure el radi hidrodinàmic, és a dir, el tamany de les nanopartícules en una dissolució. Aquest aparell projecta un làser sobre la dissolució, el qual rebotja contra les nanopartícules, determinant-ne així el seu tamany segons la desviació d'aquest làser.</p>	
<p>1 Congelador: Manté les substàncies a temperatures per sota 0° C, segons l'interès, es pot programar una temperatura o una altra.</p>	
<p>1 Pinces de laboratori</p>	
<p>1 Tub d'Eppendorf</p>	
<p>1 Agulla</p>	

<p>3 Portaobjecte: Placa de vidre rectangular on es dipositen les mostres per a observar-les més tard amb el microscopi.</p>	
---	--

- COMPOSTOS QUÍMICS:

NOM, DESCRIPCIÓ I UNITATS	IMATGE
<p>Medi de cultiu cel·lular (DMEM)</p>	
<p>4 Tubs d'Eppendorf amb les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat després de l'última centrifugació (preparats anteriorment)</p>	
<p>3 Plaques de petri amb les cèl·lules HeLa i cobreobjectes que hem deixat cultivant durant tota la nit</p>	

<p>2 Tubs falcon amb les nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat després de l'última centrifugació (preparats anteriorment)</p>	
<p>PBS (Tampó fosfat salí)</p>	
<p>Aigua destil·lada</p>	
<p>BSA: Albúmina de sèrum boví (proteïna molt abundant en la sang)</p>	
<p>Metanol fred: Provoca que les cèl·lules precipitin proteïnes, les quals fan que les cèl·lules es fixin en una superfície, en el nostre cas, sobre el cobreobjectes.</p>	

<p>DAPI: Substància que tenyeix el nucli de les cèl·lules de color blau per tal de poder distingir el nucli de la resta de la cèl·lula quan l'observem a través d'un microscopi de fluorescència.</p>	
<p>Medi de muntatge: Substància líquida incolora i neutre utilitzada per microscopia, per tal d'enganxar i subjectar millor el cobreobjectes amb el portaobjectes. També manté la fluorescència, el qual permet observar la mostra d'interès durant més temps a través del microscopi de fluorescència.</p>	

-PROCEDIMENT:

- **Preparem les nanopartícules que introduïrem a les cèl·lules** (tot aquest procés el durem a terme en una campana de seguretat biològica per tal d'evitar cap tipus de contaminació):
 1. Comencem amb el tub d'Eppendorf que conté les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat que utilitzarem per introduir a una de les plaques de petri amb les cèl·lules HeLa que hem deixat proliferant i creixent durant tota la nit. Primer li extraïem el sobrenedant de l'última centrifugació, amb compte per tal de no perdre les nanopartícules del fons del tub d'Eppendorf.
 2. Omplim aleshores el tub d'Eppendorf amb 1 ml de medi de cultiu cel·lular (DMEM) amb ajuda del pipetejador.



Figura 66: Introduint el medi de cultiu cel·lular (DMEM) amb el pipetejador al tub d'Eppendorf que conté nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat. **Font:** *Estudi propi*

3. Suspenem les nanopartícules en el medi de cultiu amb l'ajuda del vòrtex i per acabar d'individualitzar les nanopartícules, sotmetem el tub d'Eppendorf a un bany de sonicació.

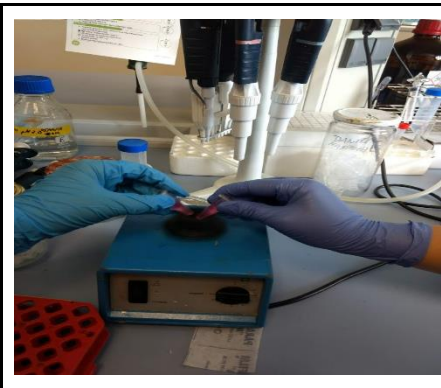


Figura 67: Suspensió de les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat en el medi de cultiu amb l'ajuda del vòrtex. **Font:** *Estudi propi*

- REPETIM EL PROCÉS AMB LES NANOPARTÍCULES SENSE RODAMINA ISOTIOCIANT: és a dir seguim el mateix procés amb el tub falcon que conté les nanopartícules sense rodamina isotiocianat que utilitzarem per introduir a una altra placa de petri amb cèl·lules HeLa. Tot i que, enlloc d'omplir el tub falcon amb 1 ml de medi, l'omplim amb uns 4 ml. El resultat dels dos processos és un tub falcon amb nanopartícules sense rodamina isotiocianat suspeses en medi de cultiu cel·lular i un tub d'Eppendorf amb nanopartícules amb rodamina isotiocianat també suspeses en medi de cultiu cel·lular.

- **Introduïm les nanopartícules a les plaques de petri** (tot aquest procés el durem a terme en una campana de seguretat biològica per tal d'evitar la contaminació de les cèl·lules):
 4. Abans de res, traiem de la incubadora les 3 plaques de petri amb el cobreobjectes i les cèl·lules HeLa que hem deixat tota la nit creixent.
 5. Comencem extraient el medi de cultiu de dues de les plaques de petri (aquestes dues són a les que els hi introduïrem les nanopartícules de PLGA), abocant-lo manualment en un vas de precipitats. Al buidar el medi de cultiu, les cèl·lules de càncer de cèrvix es queden a la placa de petri, ja que a l'haver-les deixat sembrant durant tota la nit, s'han adherit a la superfície.



Figura 68: Extraient el medi de cultiu de les cèl·lules HeLa, per tal d'introduir-li més tard medi de cultiu amb nanopartícules. **Font:** *Estudi propi*



Figura 69: Placa de petri amb cèl·lules HeLa sembrades després d'extreure'ls-hi el medi de cultiu (DMEM). En la fotografia es pot observar el cobreobjectes enganxat a la placa de petri. **Font:** *Estudi propi*

6. Afegim aleshores les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat suspeses en medi de cultiu que es troben en un tub d'Eppendorf, amb l'ajuda d'un pipetejador, a la placa de petri. Marquem amb retolador la placa de petri per fora per a distingir-la després.



Figura 70: Introduint les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat suspeses en medi de cultiu (DMEM) a la placa de petri amb cèl·lules HeLa. **Font:** *Estudi propi*

7. Afegim en una altra placa de petri amb cèl·lules HeLa les nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat suspeses en medi de cultiu que es troben en un tub falcon. Tot i que, només n'afegim 1 ml, amb l'ajuda del pipetejador. Marquem amb retolador la placa de petri per fora per a distingir-la després.



Figura 71: Afegint 1 ml de nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat suspeses en medi de cultiu (DMEM) a les cèl·lules de càncer de cèrvix. **Font:** *Estudi propi*

8. La tercera placa de petri a la qual no li hem afegit nanopartícules, és la placa de petri control, la qual ens servirà per demostrar que la presència de fluorescència vista a través del microscopi de fluorescència és només degut a la rodamina isotiocianat. Marquem també la placa de petri amb retolador.
 9. Per últim tornem a deixar les plaques de petri a la incubadora a una temperatura d'uns 36,5/ 37° C. Durant el temps que les deixem, les cèl·lules agafaran nutrients del medi de cultiu a través d'endocitosis, per a poder créixer i proliferar. Al agafar els nutrients, segons la meva hipòtesis haurien d'integrar també les nanopartícules a través d'endocitosis.
- **Preparem les nanopartícules per a la DLS:**
 10. Comencem extraient l'aigua destil·lada de dos dels tubs d'Eppendorf que contenen les nanopartícules amb rodamina precipitades després de l'última centrifugació. El tercer tub d'Eppendorf el deixem amb l'aigua destil·lada, ja que farem la DLS de les nanopartícules amb rodamina suspeses en aigua. Marquem el tub d'Eppendorf amb retolador per a distingir-lo.

11. Omplim un dels dos tubs d'Eppendorf dels que hem buidat l'aigua destil·lada amb tampó fosfat salí (PBS). El problema és que el PBS el tenim 10 cops més concentrat del que volem i per tant el diluïm amb aigua. Fem doncs una dissolució amb 5 ml de PBS i 45 ml d'aigua destil·lada, ja que en total volem fer una dissolució d'uns 50 ml. Preparem la dissolució en un tub falcon amb l'ajuda de dues pipetes graduades i el pipetejador elèctric i, per finalitzar la dissolució, evidentment barregem el tub falcon manualment.



Figura 72: Duent a terme la dissolució de PBS i aigua destil·lada amb ajuda de la pipeta graduada i el pipetejador elèctric. *Font: Estudi propi*

12. Afegim doncs 1 ml de PBS diluït en el tub d'Eppendorf amb l'ajuda del pipetejador. Marquem també el tub d'Eppendorf per reconèixer després que es tracta de nanopartícules en PBS.

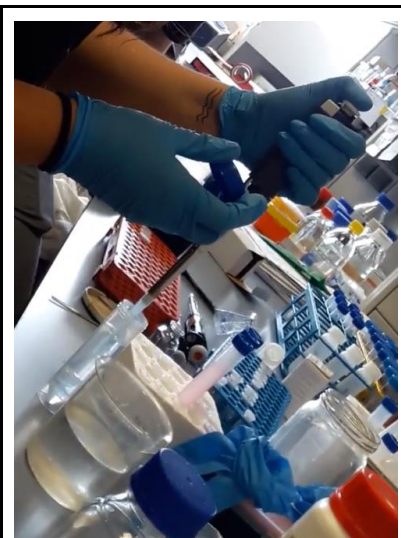


Figura 73: Afegint el PBS diluït en el tub d'Eppendorf amb ajuda del pipetejador. *Font: Estudi propi*

13.Finalment, omplim el tercer tub d'Eppendorf que ens queda amb una dissolució de PBS i BSA.

14.Per a realitzar aquesta dissolució comencem pesant 300 mg de BSA en un vas de precipitats, amb l'ajuda de l'espàtula i de la balança analítica.

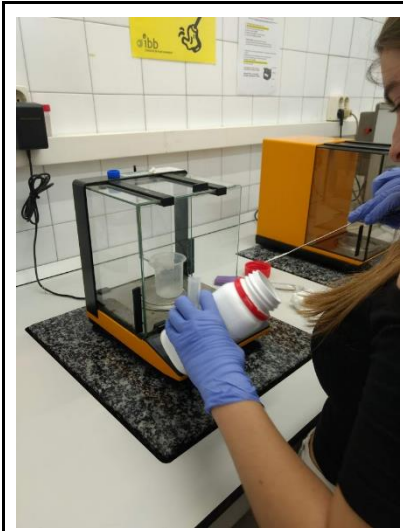


Figura 74: Pesant els 300 mg de BSA amb l'ajuda d'una espàtula i un vas de precipitats, en una balança analítica. **Font:** *Estudi propi*

15.Afegim al vas de precipitats 9,1 ml de PBS amb l'ajuda de la pipeta graduada i el pipetejador elèctric. Acabem la dissolució barrejant-la amb una vareta de vidre.

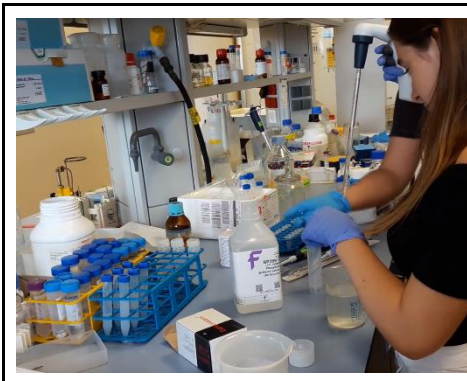


Figura 75: Afegint els 9,1 ml de PBS al vas de precipitats amb ajuda de la pipeta graduada i el pipetejador elèctric.

Font: *Estudi propi*

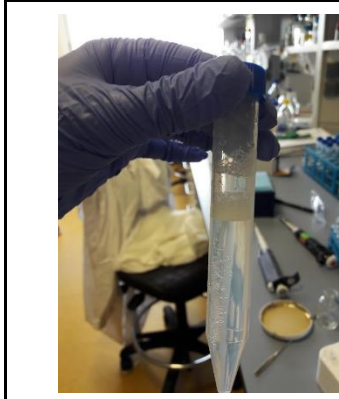


Figura 76: Dissolució de PBS i BSA. **Font:** *Estudi propi*

16. Aleshores, afegim 1 ml d'aquesta dissolució en el tercer tub d'Eppendorf amb un pipetejador.

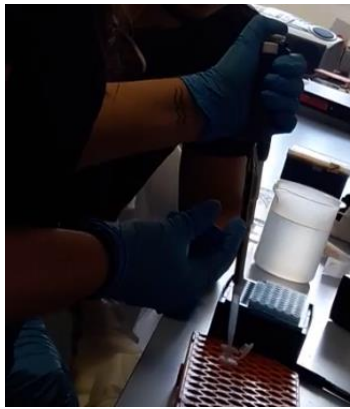


Figura 77: Afegint la dissolució de BSA i PBS en un tub d'Eppendorf amb l'ajuda del pipetejador. **Font:** *Estudi propi*

17. Per acabar la preparació de les nanopartícules per a la DLS, les suspenem en el medi en el qual es troben amb l'ajuda del vòrtex. I per acabar d'individualitzar-les, les sotmetem a un bany de sonicació.

18. Acabem amb el tub falcon restant, en el qual bàsicament suspenem les nanopartícules en la mateixa aigua destil·lada en la que es troben després de l'última centrifugació (amb el vòrtex) i les individualitzem gràcies al bany de sonicació. Tot seguit extraïem 1 ml del tub falcon amb l'ajuda d'un pipetejador i l'introduïm en un nou tub d'Eppendorf.

19.El resultat són tres tubs d'Eppendorf amb nanopartícules amb rodamina isotiocianat suspeses en tres medis diferents, unes en aigua destil·lada, les altres en PBS diluït i les últimes en una dissolució de PBS i BSA; i un tub d'Eppendorf amb nanopartícules sense rodamina isotiocianat suspeses en aigua destil·lada.

- **Preparem els portaobjectes** amb les cèl·lules que hem sembrat i incubat en un medi amb nanopartícules, per a poder-les observar després amb el microscopi de fluorescència:

20.Traiem les cèl·lules de la incubadora on es trobaven en medi amb les nanopartícules i els hi extraiem el medi.

21.Les cèl·lules es troben adherides a la superfície de la placa de petri i del cobreobjectes, però no fixades, per tant per a fixar-les, afegim un parell de gotes de metanol fred a les cèl·lules de les plaques de petri i ho deixem reposar uns 15 minuts al congelador. Per a introduir el metanol fred a les cèl·lules, però, aboquem les gotes contra la paret de la placa de petri per tal de no malmetre les cèl·lules del cobreobjectes (el fred abocat de cop podria desadherir cèl·lules del cobreobjectes); i aleshores movem manualment la placa de petri per tal de repartir el metanol. Hi ha diversos mètodes de fixació, però aquest és bastant ràpid, l'únic problema és que el metanol provoca que algunes parts de les cèl·lules, com el citoesquelet, després no es puguin observar bé i amb precisió en el microscopi de fluorescència, però com que no tenim interès en mirar el citoesquelet, utilitzem aquest mètode.

22.Aleshores, afegim una dissolució d'1 µl de DAPI i de 500 µl de PBS a les cèl·lules (amb un pipetejador) per tenyir els seus nuclis

de color blau. Després, les incubem durant uns 3-5 minuts per a que els seus nuclis absorbeixin el DAPI.

23. Mentre tenim les cèl·lules a la incubadora, posem medi de muntatge sobre el portaobjectes, aquest provocarà que el cobreobjectes que li col·loquem després s'hi adhireixi i a més, mantindrà la fluorescència, de tal manera que podrem observar la rodamina durant més temps.

24. Un cop passats els 5 minuts, extraiem la dissolució de DAPI i PBS i netegem les cèl·lules amb PBS per eliminar qualsevol resta de la dissolució. Afegim aproximadament 1 ml de PBS amb el pipetejador, movem la placa de petri per repartir correctament el PBS i finalment l'extraiem.

25. Tot seguit, extraiem el cobreobjectes de la placa de petri amb l'ajuda d'unes pinces de laboratori i d'una agulla.

26. Girem el cobreobjectes i el col·loquem finalment damunt del portaobjectes que havíem preparat, de manera que les cèl·lules adherides i fixades al cobreobjectes quedin cara avall (en contacte amb el portaobjectes).

- REPETIM EL PROCÉS AMB LES DOS PLAQUES DE PETRI AMB CÈL·LULES RESTANTS.

- **Finalment duem a terme la DLS (Dynamic light scattering):**

27. Simplement hem d'anar introduint les mostres que es troben en els tubs d'Eppendorf a l'aparell (d'un en un) per a que vagi fent els càlculs del tamany de les nanopartícules en cada cas. Recordem, les mostres eren:

ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?

- Un tub d'Eppendorf amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat suspeses en aigua destil·lada. (Li direm NPs rodamina en aigua).
- Un tub d'Eppendorf amb nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat suspeses en aigua destil·lada. (Li direm NPs aigua en aigua).
- Un tub d'Eppendorf amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat suspeses en la dissolució de PBS. (Li direm NPs rodamina en PBS).
- Un tub d'Eppendorf amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat suspeses en la dissolució de PBS amb BSA. (Li direm NPs rodamina en PBS+BSA).

28. Duem a terme 3 mesures per cada mostra per a comprovar la variació de tamany entre les nanopartícules d'una mateixa mostra.

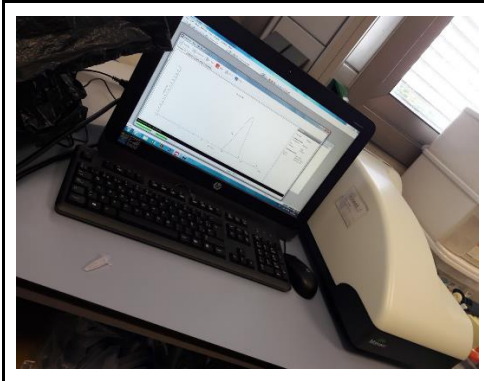


Figura 78: Duent a terme les DLS de les mostres amb un aparell de DLS (dynamic light scattering) de l'Universitat Autònoma de Barcelona. **Font:** *Estudi propi*

- A continuació, introdueixo els resultats que ens van aparèixer en la DLS:

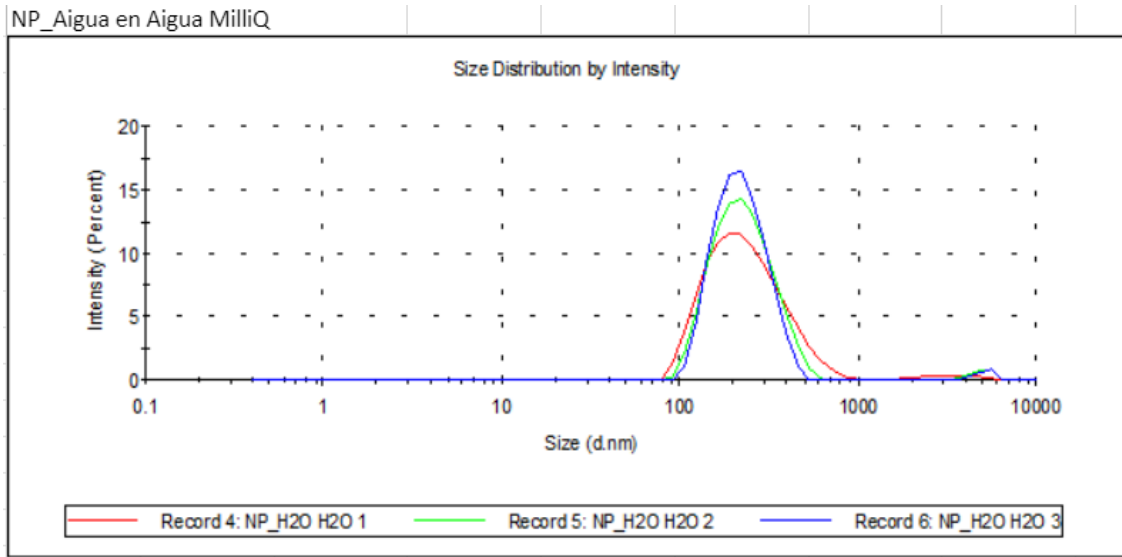


Figura 79: Taula que mostra els resultats de la DLS de les nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat suspeses en aigua. Els diferents colors representen les tres repeticions de la DLS per mostra. Com es pot veure, tot i variar la intensitat del làser de la DLS, les 3 repeticions indiquen que les nanopartícules tenen aproximadament la mateixa mida (es troben al mateix punt de l'eix de les x). **Font:** *Estudi propi*

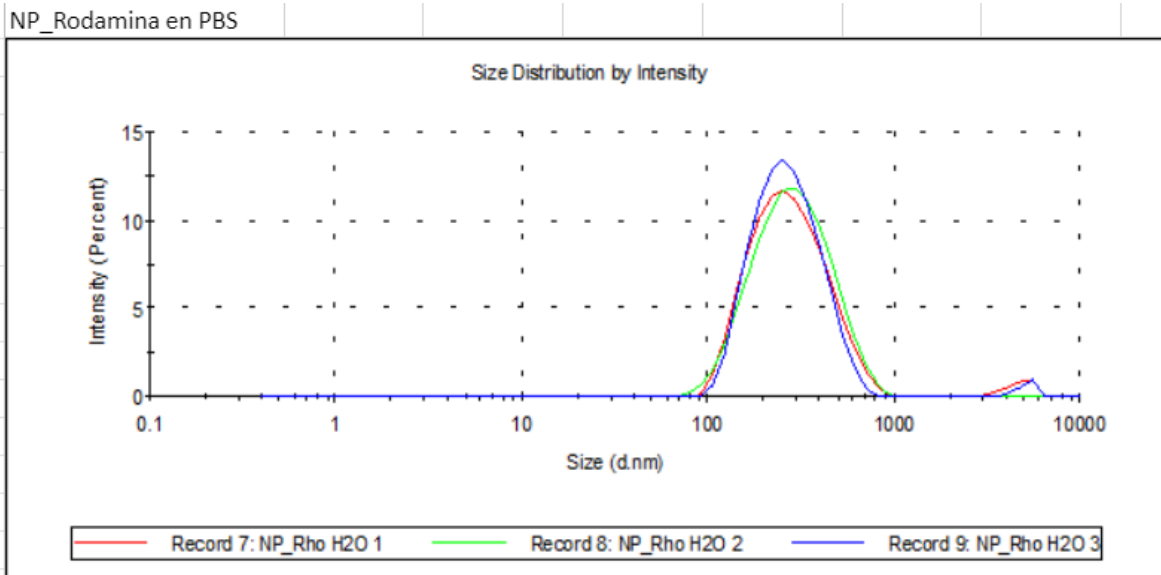


Figura 80: Taula que mostra els resultats de les DLS de les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat suspeses en la dissolució de PBS. Com es pot comprovar, en aquest cas, les nanopartícules també tenen mides aproximadament iguals en les tres repeticions. **Font:** *Estudi propi*

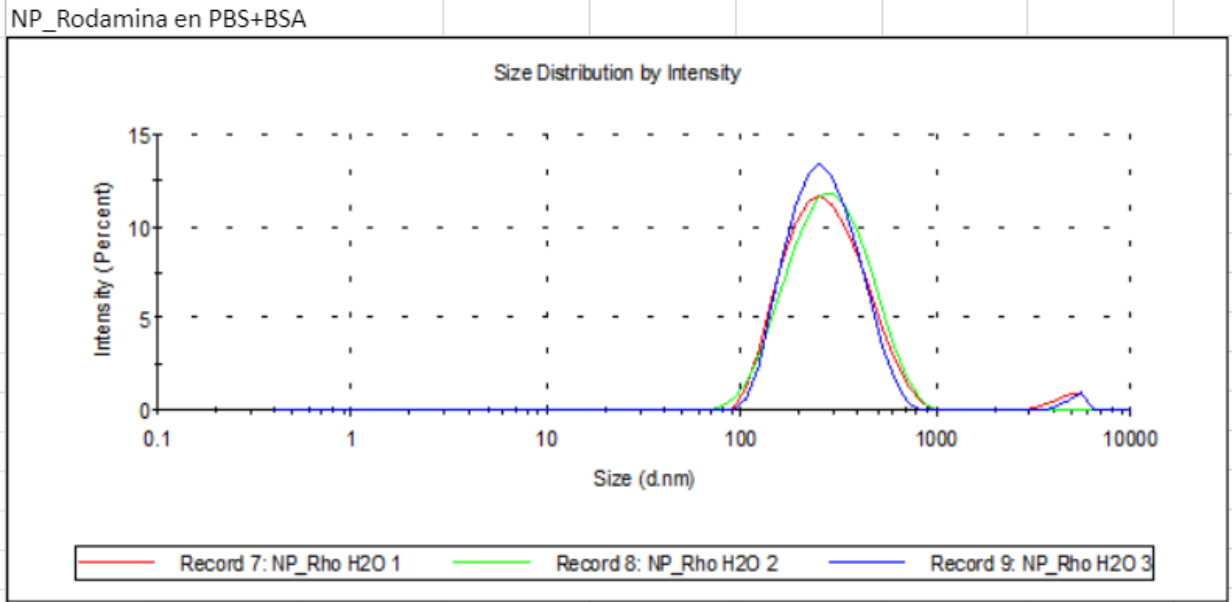


Figura 81: Taula que mostra els resultats de la DLS de les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat suspeses en la dissolució de PBS i BSA. El tamany de les nanopartícules en aquest cas és més irregular, ja que la proteïna BSA s'ha adherit a les nanopartícules (degut que aquestes no tenen una capa PEG que les protegeixi) i això ha provocat que el tamany augmenti. **Font:** *Estudi propi*

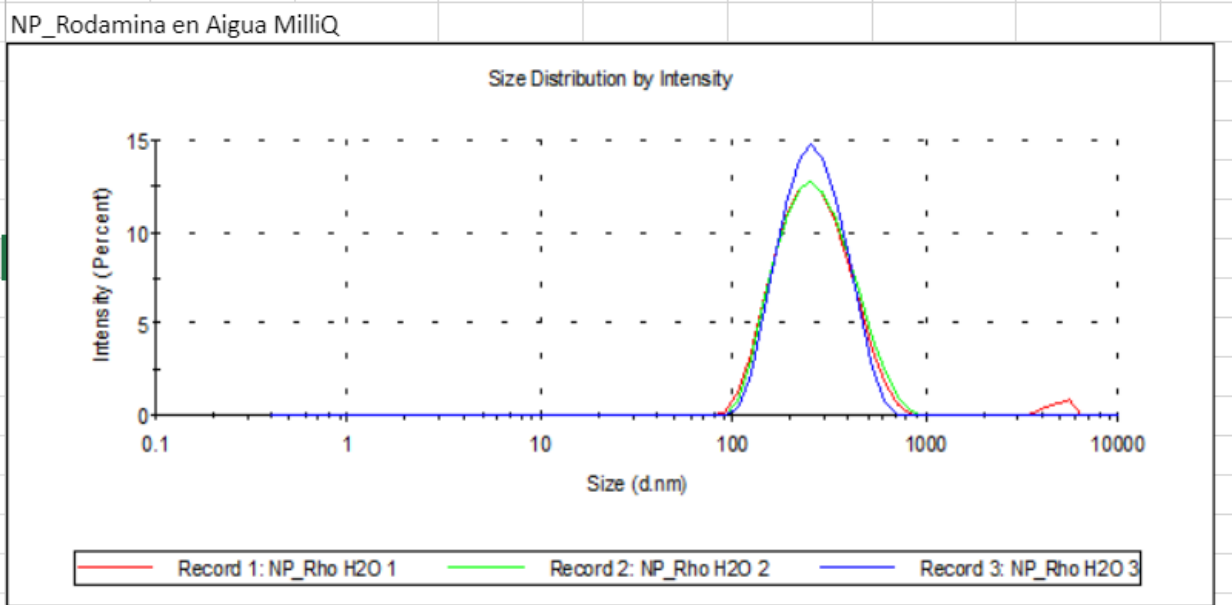


Figura 82: Taula que mostra els resultats de la DLS de les nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat suspeses en aigua. Com es pot comprovar, les nanopartícules tenen tamany semblants en les tres repeticions. **Font:** *Estudi propi*

ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?



Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T °C	Z Ave d.nm	PdI	Mean Count Rate kps	Derived Count Rate kps	Intercept	PK 1 Mean Size d.nm	PK 2 Mean Size d.nm	PK 3 Mean Size d.nm
1	Size	NP_Rho H2O 1	jueves, 05 de julio de 2018 12:13:31	24,9	248,5	0,197	405,2	405,2	0,933	280,7	4866	0
2	Size	NP_Rho H2O 2	jueves, 05 de julio de 2018 12:15:34	25	245,9	0,141	396,1	396,1	0,935	291,1	0	0
3	Size	NP_Rho H2O 3	jueves, 05 de julio de 2018 12:17:37	25,1	243,7	0,155	387,3	387,3	0,935	274,8	0	0
4	Size	NP_H2O H2O 1	jueves, 05 de julio de 2018 12:21:43	25,1	210	0,189	390	1388	0,931	252,4	3359	0
5	Size	NP_H2O H2O 2	jueves, 05 de julio de 2018 12:23:47	25	216,5	0,18	392,6	1397,2	0,932	237	4831	0
6	Size	NP_H2O H2O 3	jueves, 05 de julio de 2018 12:25:50	24,9	212,9	0,166	385,7	1372,5	0,933	225,8	5040	0
7	Size	NP_Rho PBS 1	jueves, 05 de julio de 2018 12:30:53	24,9	257,8	0,217	237,8	237,8	0,954	295,7	4688	0
8	Size	NP_Rho PBS 2	jueves, 05 de julio de 2018 12:33:17	25	257,3	0,191	241,1	241,1	0,955	309,9	0	0
9	Size	NP_Rho PBS 3	jueves, 05 de julio de 2018 12:35:40	25	258,2	0,204	244,4	244,4	0,952	283	5129	0
10	Size	NP_Rho BSA 1	jueves, 05 de julio de 2018 12:39:52	25	288	0,216	241,5	2175,6	0,95	329	4991	0
11	Size	NP_Rho BSA 2	jueves, 05 de julio de 2018 12:42:06	24,9	328,5	0,247	233,1	2100	0,957	368,7	5067	0
12	Size	NP_Rho BSA 3	jueves, 05 de julio de 2018 12:44:19	24,9	353,1	0,202	226,6	2041,3	0,954	435	0	0
Mean 1-12												
				25	260	0,192	315,1	1032,2	0,943	298,6	3164	0
Std Dev												
				0,1	44,07	0,029	81,4	793,9	0,0109	57,99	2382	0
RSD %												
				0,302	16,9	15,1	25,8	76,9	1,15	19,4	75,3	0
Minimum												
				24,9	210	0,141	226,6	237,8	0,931	225,8	0	0
Maximum												
				25,1	353,1	0,247	405,2	2175,6	0,957	435	5129	0

Figura 83: Aquesta taula ens dóna les dades de les condicions de totes les repeticions de cada mostra. Ens indica la temperatura, la mida de les nanopartícules (en nm) per cada repetició, la mida mínima i màxima comparant totes les mostres entre si, etc. Com es pot comprovar, les tres últimes mides que apareixen en la columna "Pk 1 Mean Size" són més grans i amb diferència que les mides de la resta de les mostres. Aquestes tres últimes mides corresponen a les tres repeticions de les nanopartícules amb rodamina isotiocianat suspeses en PBS i BSA, i això és degut a que com que les nanopartícules no tenen una capa PEG que les protegeixi, les proteïnes BSA se'ls hi enganxen, augmentant així el seu tamany. Això demostra el que passa amb molts dels fàrmacs convencionals que ens prenem i és que al adherir-s'hi proteïnes, aquelles molècules de fàrmac ja no poden arribar al lloc d'interès. Gràcies a les DLS hem comprovat que les nostres nanopartícules tenen un tamany aproximat d'uns 250 nm. **Font:** *Estudi propi*


9.4. PRÀCTIQUES DIA 4

-MATERIALS:

- ESTRIS I APARELLS DE LABORATORI:

<u>NOM, DESCRIPCIÓ I UNITATS</u>	<u>IMATGE</u>
<p>Microscopi de fluorescència: El microscopi de fluorescència és una variació del microscopi de llum ultraviolada en el que els objectes són il·luminats per rajos d'una determinada longitud d'ona. La imatge observada és el resultat de la radiació electromagnètica.</p>	
<p>Microscopi electrònic de rastreig: És un tipus de microscopi electrònic que proporciona una imatge de la mostra sobre la qual s'envia un feix d'electrons. Aquests interaccionen amb la superfície de la mostra, llavors es dispersen arreu, es localitzen mitjançant un detector i es projecten en una pantalla que hi ha al costat.</p>	

- COMPOSTOS QUÍMICS:

<u>NOM, DESCRIPCIÓ I UNITATS</u>	<u>IMATGE</u>
<p>Els 3 portaobjectes amb les cèl·lules HeLa (preparats anteriorment)</p>	

-PROCEDIMENT:

- **Observació de les cèl·lules HeLa amb el microscopi de fluorescència:**
 1. Comencem col·locant el portaobjectes per a poder observar la mostra a través del microscopi de fluorescència. El col·loquem de manera que l'objectiu quedi just damunt el cobreobjectes perquè aquest té un gruix d'1 mm, molt important perquè els aparells de microscopia estan preparats per a tractar l'índex de refracció de vidres d'1 mm com a molt. Sinó, no hi hauria prou resolució i no es veuria res.
 2. Utilitzem l'objectiu d'uns 100 augments per a poder veure amb claredat les cèl·lules de càncer de cèrvix, però sobretot per a poder veure amb claredat les nanopartícules.
 3. Anem observant les mostres d'una en una i canviant els filtres per tal de distingir els diferents elements segons el color de la seva fluorescència. Recordem, les mostres eren:
 - Un portaobjectes amb cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat
 - Un portaobjectes amb cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat
 - Un portaobjectes amb cèl·lules HeLa sense nanopartícules

- A continuació, introdueixo els resultats que ens van sortir amb el microscopi de fluorescència:
 - Imatges de la mostra amb cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat:

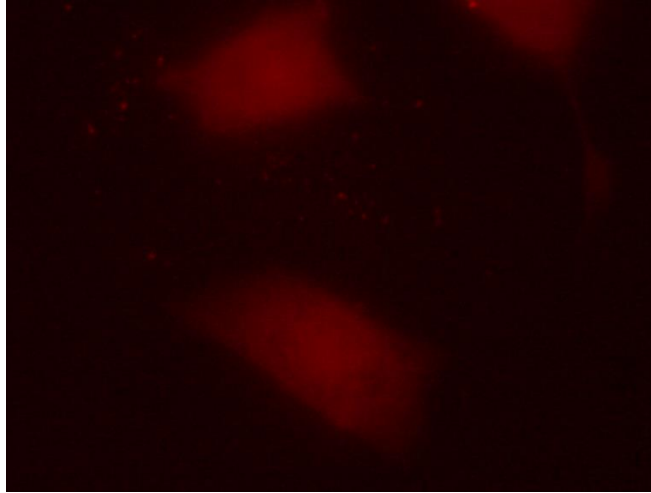


Figura 84: Imatge de la mostra de cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat feta pel microscopi de fluorescència, amb un dels filtres vermells. La part vermella que es distingeix entre la foscor són les nanopartícules amb rodamina isotiocianat. Les taques vermelles grans són les nanopartícules que han entrat a la cèl·lula, en canvi, els punts petits que podem distingir apart són les poques nanopartícules que no hi han aconseguit entrar. **Font:** *Estudi propi*

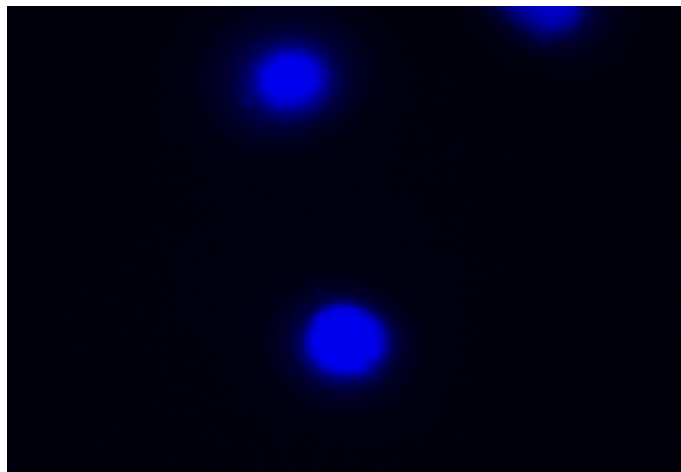


Figura 85: Imatge de la mostra de cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat feta pel microscopi de fluorescència, amb un filtre blau. Les taques blaves que es distingeixen són els nuclis, que tenen aquest color gràcies a que anteriorment els hem tenyit amb DAPI per a distingir-los de la resta de la cèl·lula. **Font:** *Estudi propi*

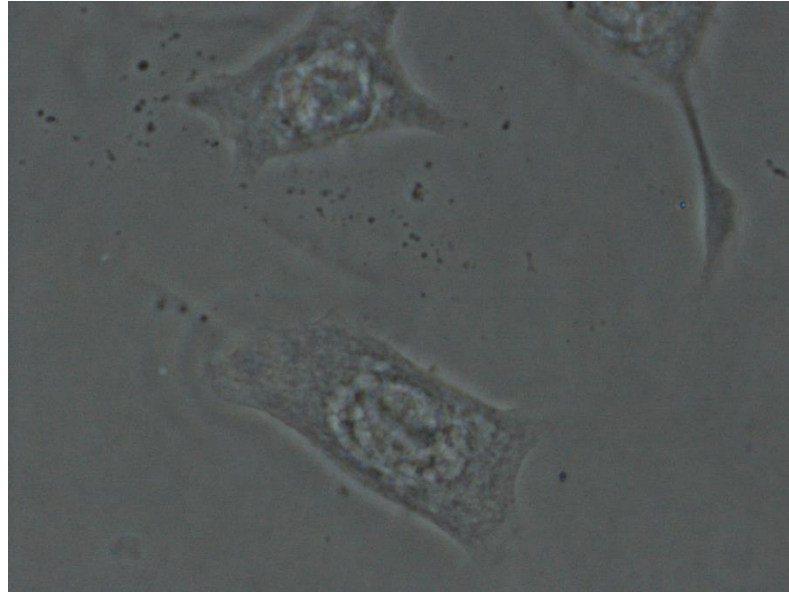


Figura 86: Imatge de la mostra de cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat feta pel microscopi de fluorescència, amb llum normal, és a dir sense filtre. No observem cap color degut a que la llum no ens permet veure la fluorescència. Però, podem diferenciar les cèl·lules, les quals tenen formes irregulars degut a que són cèl·lules de càncer de cèrvix. Es pot distingir un cercle enmig de les cèl·lules, aquest cercle és el nucli i els punts que es veuen a l'exterior de les cèl·lules són les poques nanopartícules amb rodamina que no han pogut entrar a la cèl·lula. **Font:** *Estudi propi*

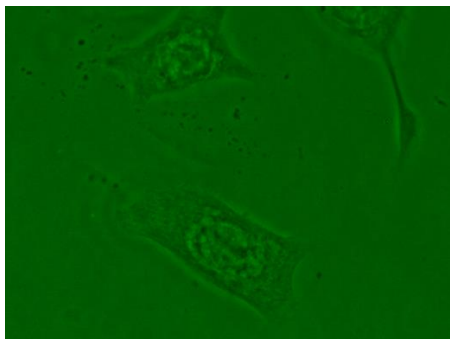


Figura 87: Imatge de les cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat feta pel microscopi de fluorescència amb el filtre de color verd. En la imatge s'hi distingeixen els mateixos elements que a la figura anterior.

Font: *Estudi propi*

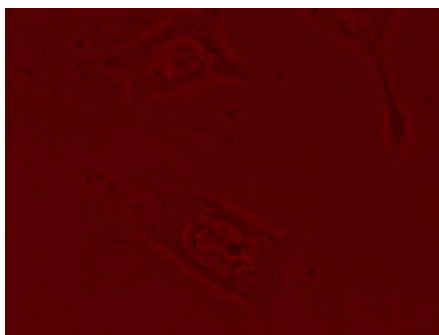


Figura 88: Imatge de les cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat feta pel microscopi de fluorescència amb l'altre filtre de color vermell. **Font:** *Estudi propi*

propi

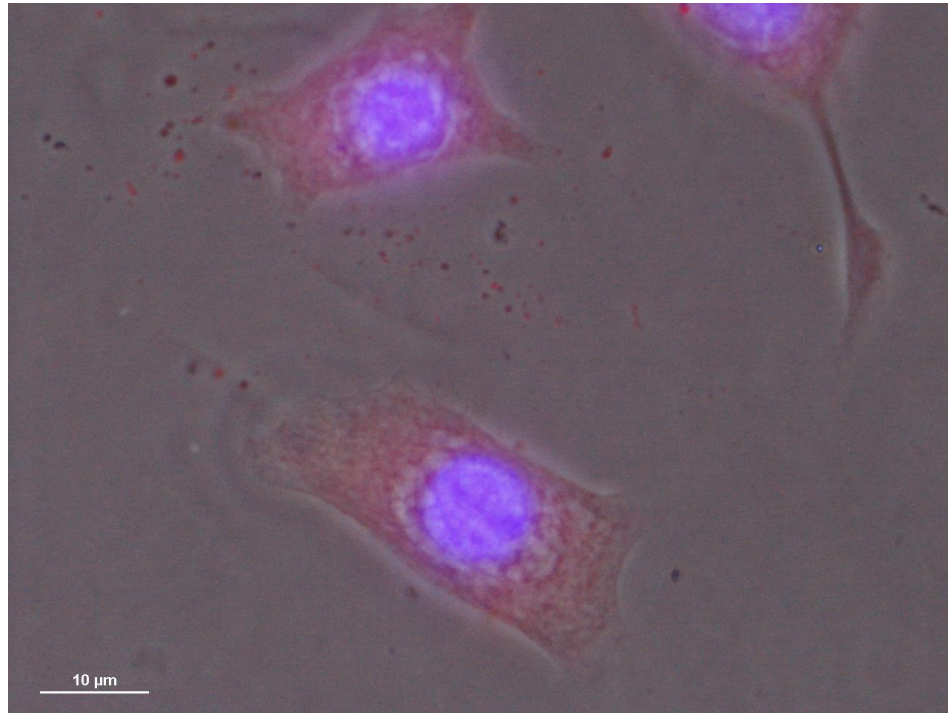


Figura 89: Imatge de les cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA amb rodamina isotiocianat feta pel microscopi de fluorescència. El color blavós que distingim de les cèl·lules és el nucli tenyit amb DAPI i els punts i zones de color vermellós són les nanopartícules amb rodamina isotiocianat.

Font: Estudi propi

- Imatges de la mostra de cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat:

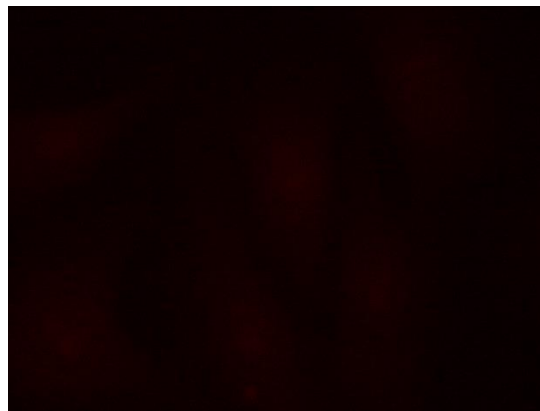


Figura 90: Imatge de la mostra de cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat amb el primer filtre vermell que hem observat a la figura 84. Com podem veure, a diferència de la figura 84, no observem taques vermelles enlloc. Això és degut a que el que provocava les taques vermelles era la presència de rodamina isotiocianat dins les nanopartícules.

Font: Estudi propi

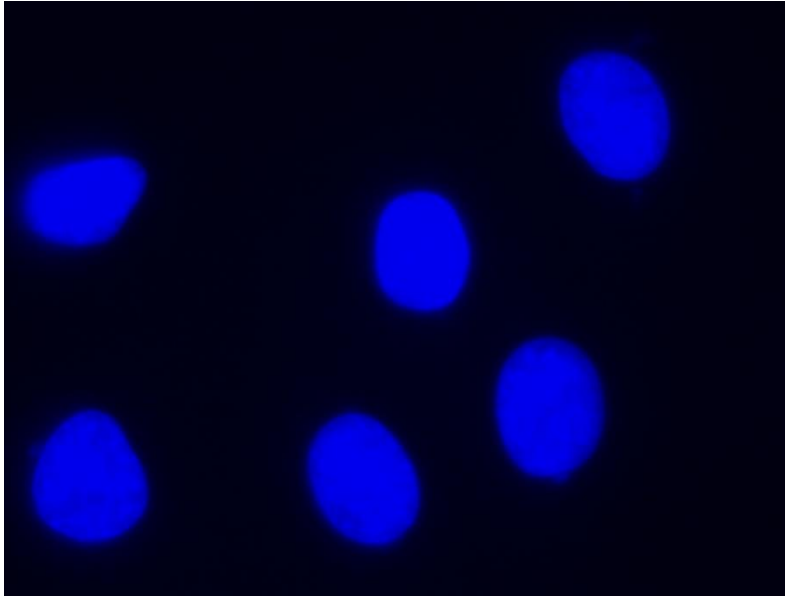


Figura 91: Imatge de cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat observades amb el filtre blau a través del microscopi de fluorescència. Les taques blaves són els nuclis de les cèl·lules tenyits amb DAPI. **Font:** *Estudi propi*

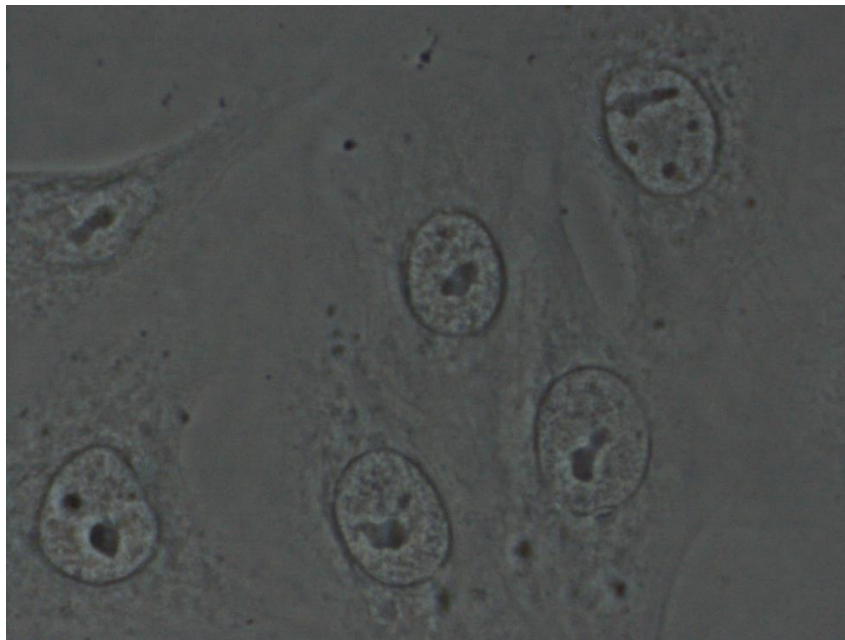


Figura 92: Imatge de cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat a través del microscopi de fluorescència amb llum normal (sense filtre). Com podem veure, tot i no haver observat cap taca vermella en la figura 90, en aquesta imatge sí que podem observar diverses taquetes a l'interior de les cèl·lules i algunes poques a l'exterior. Aquestes taquetes són les nanopartícules de PLGA, les quals no s'observaven a la figura 90 degut a que no contenen rodamina isotiocianat. **Font:** *Estudi propi*

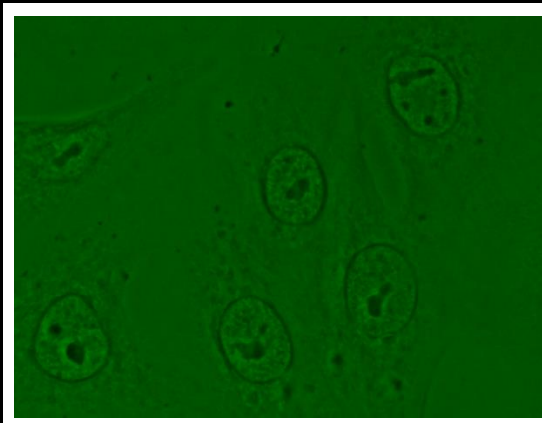


Figura 93: Imatge de les cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat feta pel microscopi de fluorescència amb el filtre de color verd. En la imatge s'hi distingeixen els mateixos elements que a la figura anterior. **Font:** *Estudi propi*

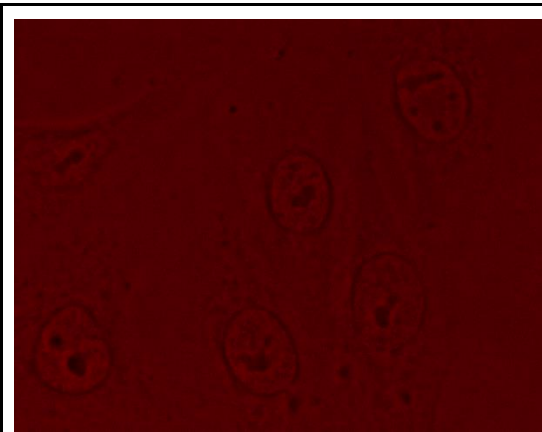


Figura 94: Imatge de les cèl·lules HeLa amb nanopartícules de PLGA sense rodamina isotiocianat feta pel microscopi de fluorescència amb l'altre filtre de color vermell. **Font:** *Estudi propi.*

- Imatges de la mostra de les cèl·lules HeLa sense nanopartícules:

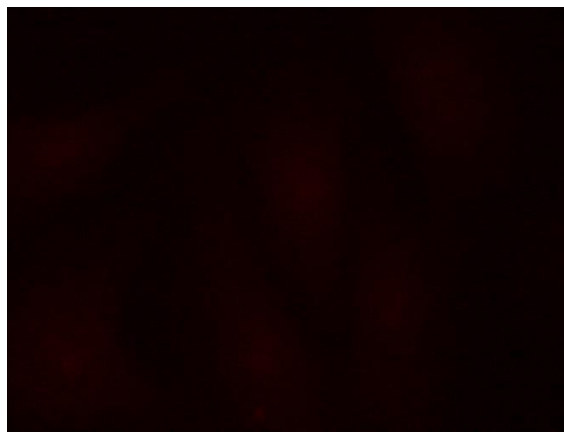


Figura 95: Imatge de la mostra de cèl·lules HeLa sense nanopartícules amb el primer filtre vermell que hem observat a la figura 84. Com podem veure, a diferència de la figura 84, no observem taques vermelles enlloc. Això és degut a que el que provocava les taques vermelles era la presència de rodamina isotiocianat. **Font:** *Estudi propi*

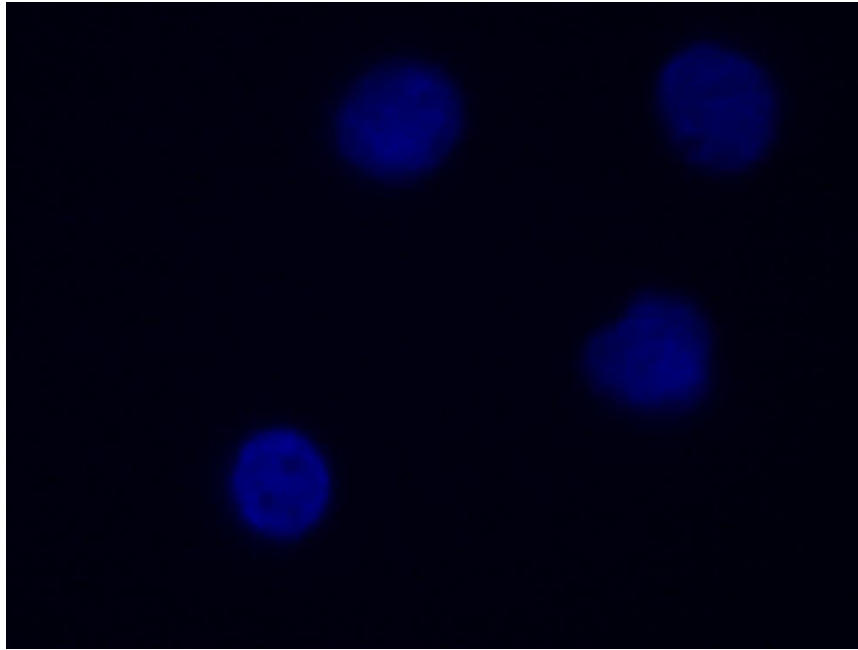


Figura 96: Imatge de cèl·lules HeLa sense nanopartícules observades amb el filtre blau a través del microscopi de fluorescència. Les taques blaves són els nuclis de les cèl·lules tenyits amb DAPI.

Font: Estudi propi

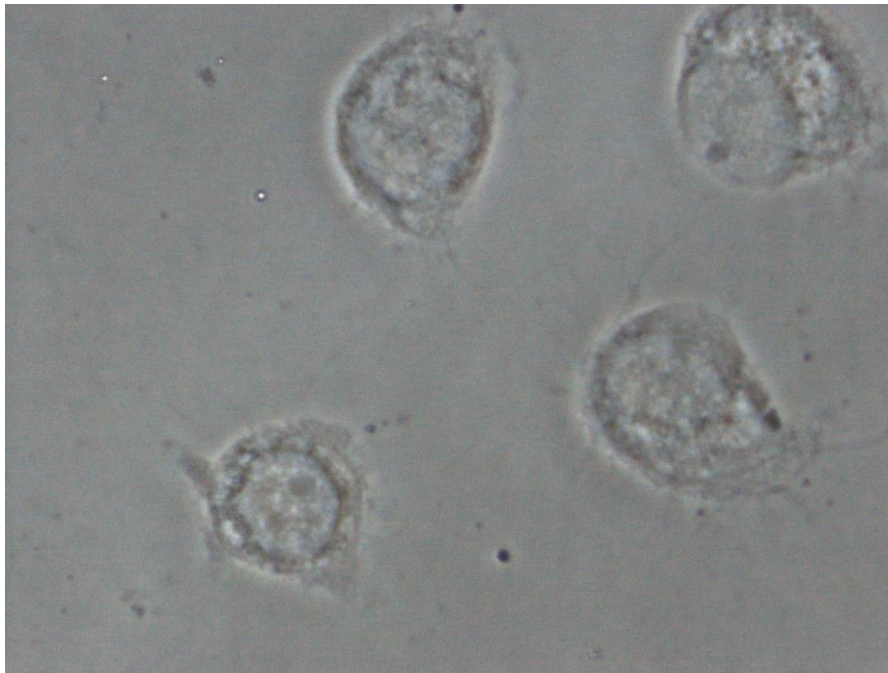


Figura 97: Imatge de la mostra de les cèl·lules HeLa sense nanopartícules, observades sense filtre a través del microscopi de fluorescència. A diferència de les altres imatges de les mostres amb nanopartícules en llum blanca, en aquesta no observem taquetes a l'interior de les cèl·lules ni a l'exterior, això és degut a que aquesta mostra no conté nanopartícules. *Font: Estudi propi*

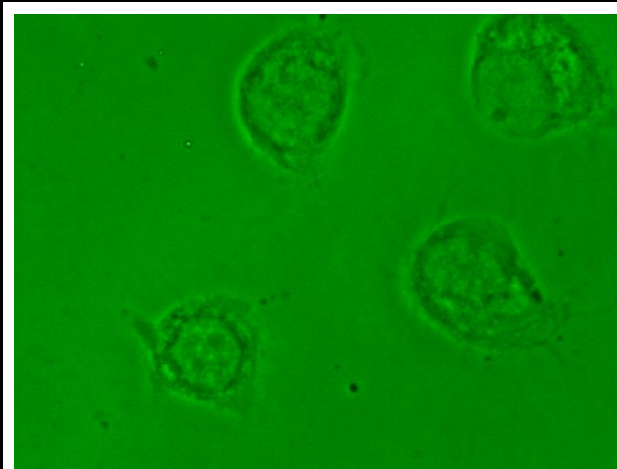


Figura 98: Imatge de les cèl·lules HeLa sense nanopartícules feta pel microscopi de fluorescència amb el filtre de color verd. En la imatge s'hi distingeixen els mateixos elements que a la figura anterior. **Font:** *Estudi propi*

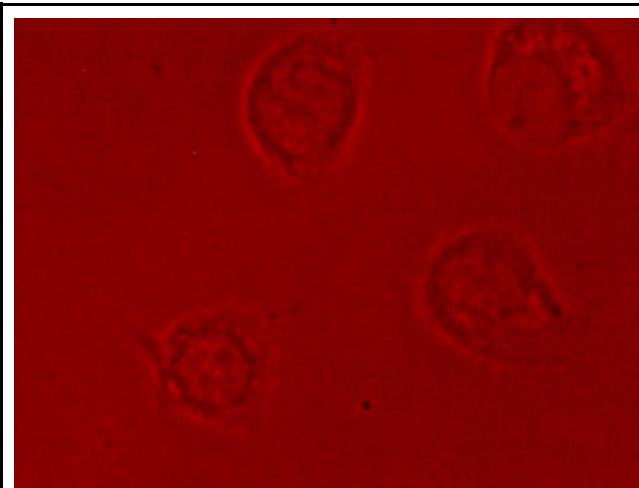


Figura 99: Imatge de les cèl·lules HeLa sense nanopartícules feta pel microscopi de fluorescència amb l'altre filtre de color vermell. **Font:** *Estudi propi*

- **Observació de les cèl·lules HeLa amb el microscopi electrònic de rastreig:**
 4. Simplement anem col·locant i observant les mostres, d'una en una, i en fem fotografies amb la càmera del microscopi.
 5. Per tal de poder diferenciar els tamanyes de les nanopartícules en les imatges, els hi afegim mesures amb el mateix ordinador del microscopi.

- A continuació, introdueixo els resultats que ens van sortir amb el microscopi electrònic de rastreig:

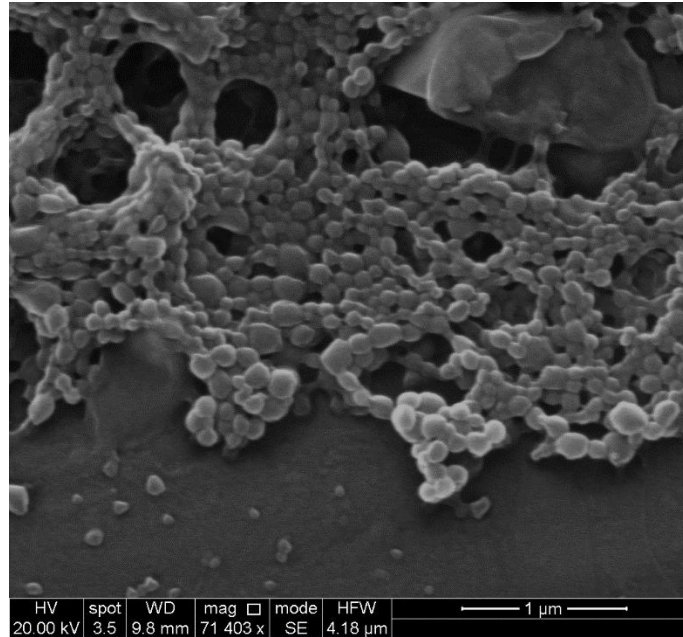


Figura 100: Imatge amb el microscopi electrònic de rastreig de l'interior de la cèl·lula amb nanopartícules. Les nanopartícules són les boles que s'observen a l'imatge. **Font:** *Estudi propi*

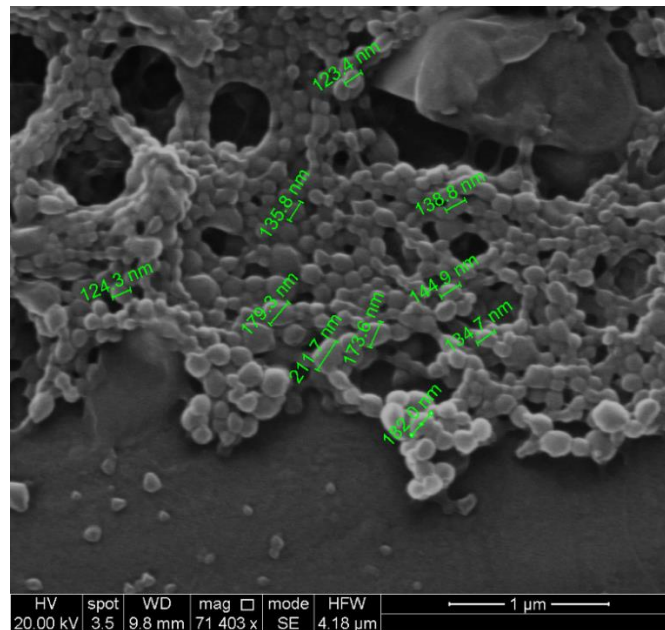


Figura 101: Mateixa imatge que la figura 100 però amb les mesures de les nanopartícules. El tamany de les nanopartícules és més petit que el que sortia en la DLS perquè en la DLS les nanopartícules es trobaven turgents degut a que havien absorbit part del medi en el qual es trobaven. **Font:** *Estudi propi*

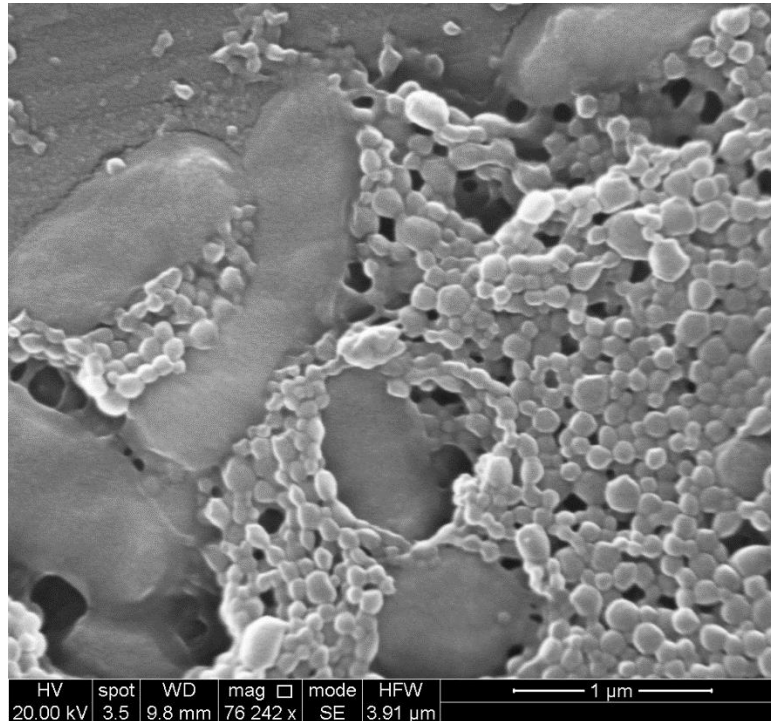


Figura 102: Imatge amb el microscopi electrònic de rastreig de l'interior de la cèl·lula amb nanopartícules. Les nanopartícules són les boles que s'observen a l'imatge. **Font:** *Estudi propi*

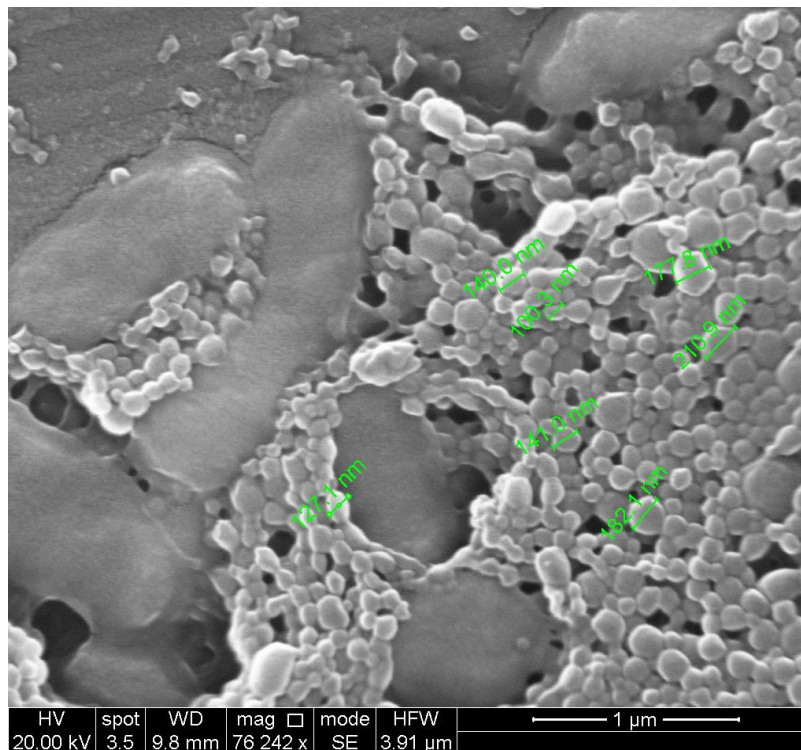


Figura 103: Mateixa imatge que la figura 102 però amb les mesures de les nanopartícules. **Font:** *Estudi propi.*

9.5. COMPARACIÓ DEL DOXIL I DE LA DOXORUBICINA

Per tal de reforçar la meua hipòtesi i veure com els nanofàrmacs influeixen en els efectes adversos, he buscat estudis en els quals es comparen el fàrmac convencional antitumoral i la versió amb nanopartícula d'aquest mateix.

Finalment, he trobat un estudi (l'estudi O'Brien) que comparava la doxorubicina (fàrmac antitumoral convencional) amb el Doxil® o Caelyx® (nanofàrmac que transporta Doxorubicina®).

Segons l'assaig clínic O'Brien es va observar que la diferència entre la Doxorubicina® i el Doxil® aporta molts beneficis en l'àmbit d'efectes secundaris. Un dels efectes adversos més preocupants de la Doxorubicina® és la cardiotoxicitat, o sigui els problemes cardíacs que pot arribar a comportar, però en aquest estudi es determina que la cardiotoxicitat era significativament més alta en els pacients als que administraven Doxorubicina® que als que els administraven Doxil®, ja que aquest reduïa la cardiotoxicitat de forma important.

A continuació, aquesta taula és un resum de com es veuen reduïts els efectes adversos en el doxil, a diferència que amb la Doxorubicina®:

	DL-PEG	D
Toxicitat hematològica		
Neutropènia (Tots els graus)	4%	10%
Neutropènia (grau 3/4)	1,5%	8%
Febre (grau 3/4)	0%	1%
Anèmia (Tots els graus)	5%	7%
Anèmia (grau 3/4)	1%	1,5%
Trombocitopènia (Tots els graus)	1%	1%
Trombocitopènia (grau 3/4)	0%	0,4%
Toxicitat gastrointestinal		
Nàusees/Vòmits (tots els graus)	37%	53%
Nàusees/Vòmits (grau 3/4)	3%	5%
Diarrea (tots els graus)	7%	8%
Diarrea (grau 3/4)	1%	<1%
Altres toxicitats		
Astènia (tots els graus)	10%	13%
Astènia (grau 3/4)	1%	1%
Alopècia (tots els graus)	20%	66%
Alopècia (grau 3/4)	0%	0%

Figura 104: Taula que compara els efectes adversos en el Doxil® (DL-PEG) amb els efectes adversos en la Doxorubicina® (D). **Font:** Estudi O'Brien de l'Institut Català d'Oncologia.

ELS NANOFÀRMACS, UNA MILLORA DEL TRACTAMENT CONTRA EL CÀNCER?

Com es pot comprovar, tots els efectes secundaris es veuen reduïts en el Doxil®, gràcies a la distribució dirigida que ofereixen els nanofàrmacs. Per tant aquesta taula mostra l'efectivitat dels nanofàrmacs.

10. **CONCLUSIONS**

L'objectiu inicial i principal del meu treball de recerca era endinsar-me al món dels nanofàrmacs per tal d'entendre'l i desenvolupar-lo. Com ja he mencionat en la introducció, va ser un tema que em va captivar al primer instant i que només ha fet que augmentar el meu interès i captiveri al llarg del temps. Han estat uns mesos i un estiu intens, ho he d'admetre, però també ha estat un viatge apassionant en el que m'he anat obrint portes a un possible futur, en el que he après moltíssim en relació amb com desenvolupar un bon treball de recerca i sobretot he viscut el món nanomètric. Espero doncs que hagueu gaudit d'aquest viatge pel món de la nanomedicina tant com jo ho he fet. Sense enredar-vos més, doncs, i per acabar amb aquest viatge, fem un petit resum dels resultats del meu treball de recerca:

Com hem vist en els resultats dels experiments de la part pràctica a través del microscopi de fluorescència, les nanopartícules de PLGA s'han introduït per endocitosi amb èxit a les cèl·lules de càncer de cèrvix. A més, tenint en compte el que ja explicàvem en la primera part del meu treball de recerca, sabem que les nanopartícules es desviarien cap a les cèl·lules tumorals gràcies a l'efecte EPR, el qual també hem pogut comprovar amb la comparació de dues imatges de teixit de cèrvix en l'apartat de les cèl·lules HeLa. Amb aquestes dues comprovacions puc concloure que les nanopartícules de PLGA compliran la seva funció de distribuir i dirigir el fàrmac de forma controlada i a la zona específica.

Així mateix, tal i com he explicat en l'apartat dels beneficis dels nanofàrmacs, aquesta distribució específica donaria lloc a una reducció dels efectes secundaris i de la toxicitat del tractament; a una reducció de la degradació i pèrdua del fàrmac; a una reducció de la dosi necessària per a ser efectiu i sobretot també a un augment del temps de circulació en sang, el qual permet que les nanopartícules s'acumulin majoritàriament a les cèl·lules d'interès per l'efecte EPR.

Davant d'aquests resultats, per tant, puc concloure que la meva hipòtesi és correcte. És a dir, les nanopartícules de PLGA poden millorar molt el tractament del càncer de cèrvix disminuint els efectes secundaris i augmentant l'especificitat.

Tot just estem al principi de l'ús de les nanopartícules en teràpia, però pel que he vist i comprovat amb aquesta recerca poden aportar molts beneficis, ja sigui per la seva distribució dirigida per a la reducció dels efectes secundaris, per a la teràpia gènica o bé com a futurs agents de diagnòstic. Però crec que abans caldria fer també un estudi dels costos d'utilització d'aquest tipus de tractament, per tal de que en un futur proper els puguem trobar inclosos dins dels tractaments que ofereix de forma habitual la sanitat pública.

A part de les conclusions més teòriques i pràctiques del treball, aquesta investigació m'ha permès descobrir un camp de la nanomedicina del qual no en sabia res. A més, m'ha donat l'oportunitat de treballar en un laboratori i començar a tenir ja contacte amb el món universitari i professional, els quals m'han proporcionat molts coneixements del món de la investigació i una nova perspectiva d'aquest que abans no tenia. Sempre havia envisionsat el món de la recerca com un camp apassionant, tot i que fins ara no havia estat conscient del treball i la implicació que també requereix. Un clar exemple que ara em ve en ment és quan al laboratori estàvem sembrant el cultiu cel·lular. Havíem d'anar amb molt de compte de no contaminar les cèl·lules, ja que aleshores els resultats no serien vàlids. Vam haver de repetir certs procediments diversos cops per contaminació, però finalment amb molta dedicació vam aconseguir no contaminar les cèl·lules que ens van acabar aportant els resultats finals.

Tota aquesta experiència i projecte m'ha permès prendre consciència de que realment la ciència cada dia avança més i anem molt més avançats del que ens podem imaginar. Però tot i així la recerca científica mai deixarà de ser un viatge en el que ens veiem immersos per poder conèixer millor la realitat que ens envolta, ja

que tal i com deia Karl Raimund Popper, un filòsof científic del segle XX: “La ciència sempre serà una recerca, mai un descobriment real. És un viatge, mai una arribada”. I és que sempre ens queden nous mons per descobrir.

11. GLOSSARI

- **Farmacocinètica:** és la branca de la farmacologia que estudia els processos als que un fàrmac és sotmès a través del seu pas per l'organisme. Estudia el que passa amb un fàrmac des del moment en què és administrat fins a la seva total eliminació del cos.
- **Ionització:** és el procés pel qual un àtom o una molècula adquireix una càrrega negativa o positiva guanyant o perdent electrons, sovint juntament amb altres canvis químics.
- **Macròfags:** Cèl·lula amb capacitat immunològica que es troba al teixit conjuntiu.
- **Antigen:** una toxina o una altra substància que indueix una resposta immune en el cos, especialment la producció d'anticossos.
- **Apoptosi:** Mort cel·lular programada i provocada pel mateix organisme per evitar afectar les cèl·lules que envolten una amb algun tipus d'anomalia.
- **Hidrofobicitat:** Capacitat que té una substància per enllaçar-se amb l'aigua. Les substàncies hidrofíliques tenen tendència a formar-hi enllaços, en canvi les substàncies hidrofòbiques no s'enllacen amb l'aigua.
- **Micel·les:** Molècules de lípids que es disposen en forma d'esfera en una dissolució formant una espècie de bombolla.
- **Fosfolípids:** són un tipus de lípids anfipàtics (hidrofòbics per un costat i hidrofílics per l'altre) compostos per una molècula d'alcohol (glicerol o esfingosina), a la qual s'uneixen dos àcids grassos (1,2-diacilglicerol) i un grup fosfat.
- **Autòlisi:** Destrucció de les cèl·lules mitjançant els seus propis enzims.
- **Lisosomes:** orgànul que es troba al citoplasma de les cèl·lules eucariotes. Els lisosomes contenen enzims degradants tancats en una membrana.
- **Gens antioncogens:** Gens que protegeixen algunes cèl·lules del càncer, per a que no siguin afectades.

- **Oncogens:** Gen que té el potencial per causar càncer a una cèl·lula.
- **Transformació neoplàstica:** Pas d'una cèl·lula sana a una cèl·lula tumoral.
- **Emulsió:** Una emulsió és una mescla estable i heterogènia de dos líquids que tendeixen a separar-se i que sovint no es poden barrejar, és a dir, són immiscibles entre ells.
- **Mostra control:** Mostra placebo d'un experiment que serveix per demostrar que no és un factor causant dels resultats de l'experiment, sinó que no afecta de cap manera els resultats.
- **Trispsinació:** Hidrolització de les proteïnes que enganxen algunes cèl·lules amb una superfície. Es duu a terme a través de la tripsina, un enzim.

12. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

ALONSO, M. *Algunas aplicaciones de puntos cuánticos* [en línia]. Disponible a: <<https://nanotecnologia.fundaciontelefonica.com/2010/03/11/algunas-aplicaciones-de-puntos-cuanticos/>>. [Consultat a: Agost 2018].

ANDERSON, D. TED X. *Drugs, dopamine and drosophilia: A fly model for ADHD?* [enregistrament vídeo]. Disponible a: <<https://www.youtube.com/watch?v=UpfxqM-AwY>>. [Consultat a: Juny 2018].

BARÓ, A. *Administració controlada de fàrmacs* [en línia]: *una possible solució al tractament de la diabetis?*. Disponible a: <http://xtec.cat/crp-santceloni/activitats/forum2011/REGUISSOL/aina_baro_sabe_TR.pdf>. [Consultat a: Juny 2018].

BAWA, R. *European Journal of Nanomedicine. Nanopharmaceuticals* [en línia]. Disponible a: <https://www.researchgate.net/publication/275728256_Nanopharmaceuticals_Nanopharmaceuticals>. [Consultat a: Juliol 2018].

BERUBE, D; CUMMINGS, C; CACCIATORE, M; SCHEUFELE, D; KALIN, J. *Characteristics and classification of nanoparticles: Expert Delphi survey* [en línia]. Disponible a: <<https://scihub.tw/https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/17435390.2010.521633?journalCode=inan20>>. [Consultat a: Juliol 2018].

BETTY, Y.S; KIM, M.D; RUTKA, J; WARREN C.W; CHAN, P. *New England Journal of Medicine. Nanomedicine* [en línia]. Disponible a: <<file:///C:/Users/claud/Downloads/Nanomedicine%20TNEJoM.pdf>>. [Consultat a: Juliol 2018].

BHATIA, S. *Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications* [en línia]. Disponible a: <<file:///C:/Users/claud/Downloads/9783319411286-c1.pdf>>. [Consultat a: Juliol 2018].

BLANCO, E; SHEN, H; FERRARI, M. *Nature (biotechnology). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery* [en línia]. Disponible a: <https://scihub.tw/https://www.nature.com/articles/nbt.3330?WT.ec_id=NBT-

[201509&spMailingID=49500480&spUserID=ODkwMTM2NjI1NQs2&spJobID=761075567&](https://www.cei-rd.gov.do/invest/downloads/Nanotechnology%20Overview%20No.1.pdf)>. [Consultat a: Juliol 2018].

BLOISE, Y. CEI-RD. *Nanotechnology* [en línia]. Disponible a: <<http://www.cei-rd.gov.do/invest/downloads/Nanotechnology%20Overview%20No.1.pdf>>. [Consultat a: Juliol 2018].

BOULAIZ, H; ALVAREZ, P; RAMIREZ, A; MARCHAL, J; PRADOS, J; RODRÍGUEZ-SERRANO, F; PERÁN, M; MELGUIZO, C; ARANEGA, A. NCBI. *Nanomedicine: Application Areas and Development Prospects* [en línia]. Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3116192/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

BURGESS, Rob. *Understanding Nanomedicine* [llibre]: *An introductory textbook*. Singapur: Pan Stanford Publishing, 2012.

Cell press. *Subset of carbon nanotubes poses cancer risk similar to asbestos in mice* [en línia] (2017). Disponible a: <<https://phys.org/news/2017-11-subset-carbon-nanotubes-poses-cancer.html>>. [Consultat a: Juliol 2018].

Cell press. *Subset of carbon nanotubes poses cancer risk similar to asbestos in mice* [imatge] (figura 17) (2017). Disponible a: <<https://phys.org/news/2017-11-subset-carbon-nanotubes-poses-cancer.html>>. [Consultat a: Juliol 2018].

Conexión Médica. *Nanofármacos: La medicina del futuro* [en línia] (2017). Disponible a: <<http://revistaconexionmedica.com/?p=685>>. [Consultat a: Juny 2018].

CORNEJO, L. *Clasificación de los nanomateriales* [en línia]. Disponible a: <<http://nuevatecnologiasymateriales.com/clasificacion-de-los-nano-materiales/>>. [Consultat a: Agost 2018].

COWBURN, R. TED X. *Nanotechnology and creation* [enregistrament vídeo]. Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=UepCFseK_os&t=256s>. [Consultat a: Juny 2018].

Cytodiagnosics. *10nm Iron Oxide Magnetic Nanoparticles (5ml)* [imatge] (figura 12). Disponible a: <<http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/10nm-Iron-Oxide-Magnetic-Nanoparticles-5ml-p1375.htm>>. [Consultat a: Juliol 2018].

DANHIER, F; ANSORENA, E; SILVA, J; COCO, B; BRETONA, A; PRÉATA, V. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications* [en línia]. Disponible a: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912000752#!>>. [Consultat a: Agost 2018].

DANHIER, F; ANSORENA, E; SILVA, J; COCO, B; BRETONA, A; PRÉATA, V. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications* [imatge] (figura 20). Disponible a: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912000752#!>>. [Consultat a: Agost 2018].

DANHIER, F; ANSORENA, E; SILVA, J; COCO, B; BRETONA, A; PRÉATA, V. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications* [imatge] (figura 22). Disponible a: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912000752#!>>. [Consultat a: Agost 2018].

DAVIS, M. TED X. *Nanomedicines: Nanobiotech v. Cancer* [enregistrament vídeo]. Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=HTKZPSvqhCE&t=191s>>. [Consultat a: Juny 2018].

DAVIS, M. *Nanomedicines: Nanobiotech v. Cancer* [imatge] (figura 2). Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=HTKZPSvqhCE&t=191s>>. [Consultat a: Juny 2018].

DAVIS, M. *Nanomedicines: Nanobiotech v. Cancer* [imatge] (figura 3). Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=HTKZPSvqhCE&t=191s>>. [Consultat a: Juny 2018].

EALIAS, A; SARAVANAKUMAR, M. *A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application* [en línia] (2017). Disponible a: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/263/3/032019/pdf>>. [Consultat a: Juliol 2018].

EALIAS, A; SARAVANAKUMAR, M. *A review on the classification, characterisation, synthesis of*

nanoparticles and their application [imatge] (figura 15) (2017). Disponible a: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/263/3/032019/pdf>. [Consultat a: Juliol 2018].

EALIAS, A; SARAVANAKUMAR, M. *A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application* [imatge] (figura 18) (2017). Disponible a: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/263/3/032019/pdf>. [Consultat a: Juliol 2018].

Estudi O'Brien. Institut Català d'Oncologia *Doxorubicina liposomal pegilada* [en línia]. Disponible a: <https://mail.google.com/mail/u/0/#inbox/FMfcgxvzKtXpbPJRpPDmcpclDpnMrVSM?compose=DmwnWtVdLqJBsZrmGJRJRZwbxNxHvhgFnMCPdqRWPRrcSzMkFQnScgwllpbWMnMgQPdmzLqiMXTG&projector=1&messagePartId=0.1>. [Consultat a: Setembre 2018].

Estudi O'Brien. Institut Català d'Oncologia *Doxorubicina liposomal pegilada* [imatge] 3(figura x). Disponible a: <https://mail.google.com/mail/u/0/#inbox/FMfcgxvzKtXpbPJRpPDmcpclDpnMrVSM?compose=DmwnWtVdLqJBsZrmGJRJRZwbxNxHvhgFnMCPdqRWPRrcSzMkFQnScgwllpbWMnMgQPdmzLqiMXTG&projector=1&messagePartId=0.1>. [Consultat a: Setembre 2018].

Facultad de química, laboratorio biofarmacia. *Fármacos y su unión a proteínas plasmáticas* [en línia]. Disponible a: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/farmacos_y_proteinas_4329.pdf. [Consultat a: Juny 2018].

FARAHMAND, L; DARVISHI, B; MAJIDZADEH-A, K. *Suppression of chronic inflammation with engineered nanomaterials delivering nuclear factor κ B transcription factor decoy oligodeoxynucleotides* [en línia] (2017). Disponible a: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10717544.2017.1370511>. [Consultat a: Setembre 2018].

FARAHMAND, L; DARVISHI, B; MAJIDZADEH-A, K. *Suppression of chronic inflammation with engineered nanomaterials delivering nuclear factor κ B transcription factor decoy oligodeoxynucleotides* [imatge] (figura 8) (2017). Disponible a: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10717544.2017.1370511>. [Consultat a: Setembre 2018].

FAROKHZAD, O; LANGER, R. MIT–Harvard Center for Cancer Nanotechnology Excellence. *Impact of nanotechnology on drug delivery* [en línia]. Disponible a: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nn900002m>>. [Consultat a: Juliol 2018].

FAROKHZAD, O; LANGER, R. ACS Publications. *Impact of Nanotechnology on Drug Delivery* [imatge] (figura 4). Disponible a: <<https://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/nn900002m>>. [Consultat a: Juliol 2018].

FAROKHZAD, O; LANGER, R. ACS Publications. *Impact of Nanotechnology on Drug Delivery* [imatge] (figura 7). Disponible a: <<https://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/nn900002m>>. [Consultat a: Juliol 2018].

FAROKZHAD, O. *Welcome to the Era of nanomedicine* [enregistrament vídeo]. Disponible a: <<https://www.youtube.com/watch?v=NvNhK7JRuK0>>. [Consultat a: Juny 2018].

FERRARI, M. *Mauro Ferrari e la nanotecnologjie* [en línia] (2011). Disponible a: <<http://www.lapatriedalfriul.org/?p=5280>>. [Consultat a: Juny 2018].

FLORES, C. *Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida* [en línia]. Disponible a: <<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/34946>>. [Consultat a: Juny 2018].

GARELLO, F; TERRENO, E. PubMed. *Sonosensitive MRI Nanosystems as Cancer Theranostics: A Recent Update* [en línia]. Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29868560>>. [Consultat a: Agost 2018].

Generalitat de Catalunya. *Els efectes secundaris del càncer* [en línia]. Disponible a: <http://cancer.gencat.cat/ca/ciudadans/viure_amb_cancer/els_efectes_secundaris_dels_tractaments/>. [Consultat a: Octubre 2018].

HARFOUCHE, R. *PLGA nanoparticles* [imatge] (figura 14). Disponible a: <https://www.researchgate.net/figure/PLGA-nanoparticles-A-Chemical-conjugation-or-simple-encapsulation-of-chemotherapeutic_fig1_50195221>. [Consultat a: Juliol 2018].

HEINZ, H; PRAMANIK, C; HEINZ, O; DING, Y; MISHRA, R; MARCHON, D; FLATTC, R; ESTRELA-LOPIS, I; LLOP, J; MOYA, S; ZIOLO, R. *Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications* [en línia] (2017). Disponible a: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167572917300018>. [Consultat a: Juliol 2018].

HEINZ, H; PRAMANIK, C; HEINZ, O; DING, Y; MISHRA, R; MARCHON, D; FLATTC, R; ESTRELA-LOPIS, I; LLOP, J; MOYA, S; ZIOLO, R. *Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications* [imatge] (figura). Disponible a: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167572917300018>. [Consultat a: Juliol 2018].

HO, E. TED X. *Nanomedicines: The way of future?* [enregistrament vídeo]. Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=M9OAKXIPsDw&t=304s>. [Consultat a: Juny 2018].

HOLLAND, E; HUSE, J. *Nature. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma* [en línia]. Disponible a: <https://www.nature.com/articles/nrc2818>. [Consultat a: Juliol 2018].

Institut Català de Nanotecnologia. *Nanotechnology for healthcare* [en línia]. Disponible a: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/farmacos_y_proteinas_4329.pdf. [Consultat a: Juny 2018].

Instituto Nacional del Cáncer. *Efectos secundarios del tratamiento del cáncer* [en línia] (2017). Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/efectos-secundarios>. [Consultat a: Octubre 2018].

JHURRY, D. TED X. *Nanomedicine in cancer* [enregistrament vídeo]. Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=UpfxqM-AwY>. [Consultat a: Juny 2018].

KEWAL, K. *Research and Future of Nanomedicine* [en línia] (2017). Disponible a: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4939-6966-1_19. [Consultat a: Juliol 2018].

KIM, J; CHOI, W; KIM, Y; TAE, G. *Brain-targeted delivery of protein using chitosan- and RVG peptide-conjugated, pluronic-based nano-carrier* [en línia]. Disponible a: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212010551>>. [Consultat a: Agost 2018].

LEE VENTOLA, C. *Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs* [en línia] (2017). Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5720487/pdf/ptj4212742.pdf>>. [Consultat a: Juliol 2018].

LEE VENTOLA, C. *The Nanomedicine Revolution Part 1: Emerging Concepts* [en línia]. Disponible a: <https://www.dropbox.com/home/TR%20Nanof%C3%A0rmacs/Articles%20sobre%20nanomedicina?preview=The+Nanomedicine+Revolution+PART+1_Emerging+Concepts.pdf>. [Consultat a: Juliol 2018].

LEE VENTOLA, C. *The Nanomedicine Revolution Part 1: Emerging Concepts* [imatge] (figura 6). Disponible a: <https://www.dropbox.com/home/TR%20Nanof%C3%A0rmacs/Articles%20sobre%20nanomedicina?preview=The+Nanomedicine+Revolution+PART+1_Emerging+Concepts.pdf>. [Consultat a: Juliol 2018].

LIU, H; ZHANG, J; CHEN, X; DU, X; ZHANG, J; LIU, G; ZHANG, W. *Application of iron oxide nanoparticles in glioma imaging and therapy: from bench to bedside* [en línia]. Disponible a: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/nr/c6nr00147e#!divAbstract>>. [Consultat a: Juliol 2018].

LLABOT, J; PALMA, S; ALLEMANDI, D. *Nanopartículas poliméricas sólidas* [en línia]. Disponible a: <https://www.researchgate.net/publication/236679562_Nanoparticulas_polimericas_solidas>. [Consultat a: Juliol 2018].

MABE, T. TED X. *Nanoscience and drug delivery: small particles for big problems* [enregistrament vídeo]. Disponible a: <<https://www.youtube.com/watch?v=0wFwXUHu5c&t=272s>>. [Consultat a: Juny 2018].

MANDAL, A. *Tipos del cáncer de cerebro* [en línia] (2018). Disponible a: <[https://www.news-medical.net/health/Brain-Cancer-Types-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Brain-Cancer-Types-(Spanish).aspx)>. [Consultat a: Juliol 2018].

MASSERINI, M. International Scholarly Research Notices (ISRN). *Nanoparticles for Brain Drug Delivery* [en línia]. Disponible a: <<https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/238428/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

Mediens. *La diferencia entre el medicamento genérico y convencional* [en línia] (2011). Disponible a: <<http://mediens.blogspot.com/2011/10/la-diferencia-entre-el-medicamento.html>>. [Consultat a: Juny 2018].

Mengac, H; Leong, W; W. Leong, K; Chen, C; Zhao, Y. *Walking the line: The fate of nanomaterials at biological barriers* [en línia]. Disponible a: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961218303272?via%3Dihub>>. [Consultat a: Juliol 2018].

MICHAUD, C. *Paracetamol: usos, dosis y efectos secundarios* [en línia] (2016). Disponible a: <<https://www.saludconsultas.com/paracetamol-usos-dosis-y-efectos-secundarios/26870>>. [Consultat a: Juny 2018].

MITJANS, F. Technological center LEiTAT. *Technological convergence in life sciences research: mAbs & nanotechnology* [en línia]. Disponible a: <<http://www.bionanomedcat.org/documentacio/Leitat-Lyker%20-%20Nanotechnology%20for%20Healthcare%20Forum%20-%20Barcelona%20100712.pdf>>. [Consultat a: Juny 2018].

MRINMOY, D; PARTHA, S; ROTELLO, V. *Applications of Nanoparticles in Biology* [en línia]. Disponible a: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.200703183>>. [Consultat a: Juliol 2018].

MÜLLER, L; LANDFESTER, K. Biochemical and Biophysical Research Communications. *Natural liposomes and synthetic polymeric structures for biomedical applications* [en línia]. Disponible a: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X15304782>>. [Consultat a: Agost 2018].

Nanocomposix. *Gold Colloid* [en línia]. Disponible a: <<https://nanocomposix.com/pages/gold-colloid>>. [Consultat a: Juliol 2018].

Nanocomposix. *Gold Colloid* [imatge] (figura 10). Disponible a: <<https://nanocomposix.com/pages/gold-colloid>>. [Consultat a: Juliol 2018].

Nanotechnology in City Environments (NICE); Center for Nanotechnology in Society, Arizona State University. *Abraxane: Nanoparticle Albumin-Bound (NAB) Breast Cancer Drug Delivery Platform* [en línia]. Disponible a: <<https://nice.asu.edu/nano/abraxane-nanoparticle-albumin-bound-nab-breast-cancer-drug-delivery-platform>>. [Consultat a: Juliol 2018].

Nanotechnology in City Environments (NICE); Center for Nanotechnology in Society, Arizona State University. *Abraxane: Nanoparticle Albumin-Bound (NAB) Breast Cancer Drug Delivery Platform* [imatge] (figura 19). Disponible a: <<https://nice.asu.edu/nano/abraxane-nanoparticle-albumin-bound-nab-breast-cancer-drug-delivery-platform>>. [Consultat a: Juliol 2018].

Nanovex biotechnologies. *Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles for drug delivery* [en línia] (2017). Disponible a: <<http://www.nanovexbiotech.com/858-2/>>. [Consultat a: Agost 2018].

Nanovex biotechnologies. *Silver nanoparticles* [en línia]. Disponible a: <<http://www.nanovexbiotech.com/products/nanoparticles/silver-nanoparticles/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

Nanovex biotechnologies. *Silver nanoparticles* [imatge] (figura 11). Disponible a: <<http://www.nanovexbiotech.com/products/nanoparticles/silver-nanoparticles/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

Nanowerk. *Nanotechnology and cancer medicine* [en línia]. Disponible a: <<https://www.nanowerk.com/news2/newsid=33827.php>>. [Consultat a Juny 2018].

Nanowerk. *Nanotechnology and cancer medicine* [imatge] (figura 1). Disponible a: <<https://www.nanowerk.com/news2/newsid=33827.php>>. [Consultat a Juny 2018].

NASSIRI, N; ABDOLLAHI, M. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. *Opportunities and obstacles to the development of nanopharmaceuticals for human use* [en línia] (2016). Disponible a: <<https://darujps.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40199-016-0163-8>>. [Consultat a: Juny 2018].

National Cancer Institute. *Cancer Biology Research* [en línia] (2016). Disponible a: <<https://www.cancer.gov/research/areas/biology>>. [Consultat a: Juliol 2018].

PAZDUR, R; WAGMAN, L; CAMPHAUSEN, K; HOSKINS, W. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach* [en línia]. Disponible a: <<http://www.cancernetwork.com/cancer-management-11>>. [Consultat a: Juliol 2018].

PORRAS, A. *Targeting pasivo* [en línia]. Disponible a: <https://books.google.es/books?id=pmjl6putQMYC&pg=PA137&lpg=PA137&dq=targeting+pasivo+-c%C3%A1ncer&source=bl&ots=kizJ5K-vql&sig=UCwQQ-dOLU9mMJwXWH-ISY1y_3A&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwiBspW83pLcAhUsBcAKHU80AWQQ6AEIMzAB#v=onepage&q=targeting%20pasivo%20-c%C3%A1ncer&f=false>. [Consultat a: Juliol 2018].

RABELLO, E. *Liposome nanoparticles* [imatge] (figura 16). Disponible a: <https://www.researchgate.net/figure/Liposome-drug-delivery-system_fig1_269652974>. [Consultat a: Juliol 2018].

RAKESH, K. Clinical Cancer Research. *Understanding Barriers to Drug Delivery: High Resolution in Vivo Imaging Is Key* [en línia]. Disponible a: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/5/7/1605.short>>. [Consultat a: Juliol 2018].

RIGGIO, C; PAGNI, E; RAFFA, V; CUSCHIERI, A. Journal of Nanomaterials. *Nano-Oncology: Clinical Application for Cancer Therapy and Future Perspectives* [en línia]. Disponible a: <<https://www.hindawi.com/journals/jnm/2011/164506/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

RODRÍGUEZ, P. *Yo, nanorobot* [en línia]. Disponible a: <<http://divulga.ibecbarcelona.eu/yo-nanorobot/#more-1794>>. [Consultat a: Juny 2018].

ROMERO, I. *Medicaments intel·ligents* [en línia] (2014). Disponible a: <<https://prezi.com/df6aih0k-qz/medicaments-intelligents/>>. [Consultat a: Juny 2018].

SALATA, O; University of Oxford. *Applications of nanoparticles in biology and medicine* [en línia]. Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC419715/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

SALMASO, S; CALICETI, P. *Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers* [en línia]. Disponible a: <<https://www.hindawi.com/journals/jdd/2013/374252/>>. [Consultat a: Agost 2018].

SAMARASINGHE, R; KANWAR, J; KANWAR, R. *The Role of Nanomedicine in Cell Based Therapeutics in Cancer and Inflammation* [en línia]. Disponible a: <https://www.researchgate.net/publication/260255146_The_Role_of_Nanomedicine_in_Cell_Based_Therapeutics_in_Cancer_and_Inflammation>. [Consultat a: Juliol 2018].

SAMITIER, J. *Nanobiotecnologia i nanomedicina* [en línia]. Disponible a: <<https://publicacions.iec.cat/repository/pdf/00000202/00000030.pdf>>. [Consulta: Juny 2018].

SCHNEIDER, A. Institute for cytology and dysplasia. *Secondary prevention of cervical cancer* [en línia]. Disponible a: <https://www.karlstorz.com/doc/interactivebrochure/3500106/content/c0_p001_maintitle.html>. [Consultat a: Agost 2018].

SCHNEIDER, A. Institute for cytology and dysplasia. *Secondary prevention of cervical cancer* [imatge] (figura 25). Disponible a: <https://www.karlstorz.com/doc/interactivebrochure/3500106/content/c0_p001_maintitle.html>. [Consultat a: Agost 2018].

SHADBOLT, P. *Why quantum dots are taking over your TV* [imatge] (figura 13). Disponible a: <<https://edition.cnn.com/2015/04/02/tech/quantum-dots-mci/index.html>>. [Consultat a: Juliol 2018].

SHARMA, S; PARMAR, A; KORI, S; SANDHIR, R. *PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications* [en línia] (2017). Disponible a: <https://www.researchgate.net/publication/287968938_PLGA-based_nanoparticles_A_new_paradigm_in_biomedical_applications#pf>. [Consultat a: Setembre 2018].

SHARMA, S; PARMAR, A; KORI, S; SANDHIR, R. *PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications* [imatge] (figura 22) (2017). Disponible a: <https://www.researchgate.net/publication/287968938_PLGA-based_nanoparticles_A_new_paradigm_in_biomedical_applications#pf>. [Consultat a: Septembre 2018].

SHIPMAN, M. NC State University. *New nanoparticles can deliver multiple anti-cancer drugs* [en línia]. Disponible a: <https://www.advancedsciencenews.com/new-nanoparticles-can-deliver-multiple-anti-cancer-drugs/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

SINGH R, LILLARD JR JW. *Nanoparticle-based targeted drug delivery* [en línia]: *Experimental and Molecular Pathology*. Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249419/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

SMITH, J. Nanosmart pharmaceuticals. *Focus on Nanopharmaceuticals* [en línia]. Disponible a: <<https://www.rdmag.com/article/2012/08/focus-nanopharmaceuticals>>. [Consultat a: Juny 2018].

TETKO IV, BRUNEAU P, MEWES HW, ROHRER DC, PODA GI. *Can we estimate the accuracy of ADME-Tox predictions?* [en línia]. Disponible a: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644606002303?via%3Dihub>>. [Consulta a : Juny 2018].

THOMAS, D; CHIKKAGOUDAR, S; CHAPPELL, A; BAKER N. International conference on bioinformatics and biomedicine. *Annotating the structure and components of a nanoparticle formulation using computable string expressions* [en línia]. Disponible a: <<https://scihub.tw/https://ieeexplore.ieee.org/document/6470259/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

TIANMENG SUN, DR. YU SHRIKE ZHANG BO PANG, DR. DONG CHOON HYUN MIAOXIN YANG. *Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy* [en línia]. Disponible a: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/anie.201403036>>. [Consultat a: Juliol 2018].

TIANMENG SUN, DR. YU SHRIKE ZHANG BO PANG, DR. DONG CHOON HYUN MIAOXIN YANG. *Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy* [imatge] (figura 8). Disponible a: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/anie.201403036>>. [Consultat a: Juliol 2018].

TORCHILIN, V. *Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example* [en línia]. Disponible a: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-00477-3_1>. [Consultat a: Juliol 2018].

TRAN, S; DEGIOVANNI, P; PIEL, P; RAI, P. *Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery* [en línia] (2017). Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725398/>>. [Consultat a: Setembre 2018].

TRAN, S; DEGIOVANNI, P; PIEL, P; RAI, P. *Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery* [imatge] (figura 26) (2017). Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725398/>>. [Consultat a: Setembre 2018].

TRAN, S; DEGIOVANNI, P; PIEL, P; RAI, P. *Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery* [imatge] (figura 27) (2017). Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725398/>>. [Consultat a: Setembre 2018].

T, Pradeep. *NANO The Essentials* [llibre]: *Understanding nanoscience and nanotechnology*. Nova Delhi: McGraw Hill, 2008.

Universitat de Barcelona. *Senescència* [en línia]: *Nanotecnologia*. Disponible a: <<http://www.ub.edu/senesciencia/noticia/nanotecnologia/>>. [Consulta a: Juny 2018].

VANDERESE, R. *Types of nanodrugs* [en línia]. Disponible a: <https://www.researchgate.net/figure/fig1-1-Main-nanodrugs-used-for-cancer-treatment-and-diagnosis-Biodegradable_fig1_51980801>. [Consultat a: Juliol 2018].

VILLAFUENTES, L. *Nanotecnología farmacéutica* [en línia]. Disponible a: <<http://www.razonypalabra.org.mx/N/n68/9Villafuerte.pdf>>. [Consultat a: Juny 2018].

WANG, E; WANG, A. *Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology* [en línia]. Disponible a:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3865110/>>. [Consultat a: Agost 2018].

WEISSIG, V; GUZMAN-VILLANUEVA, D. *Nanopharmaceuticals (part 2): products in the pipeline* [en línia] (2015). Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4334342/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

WEISSIG, V; PETTINGER, T; MURDOCK, N. *Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market* [en línia] (2014). Disponible a: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4172146/>>. [Consultat a: Juliol 2018].

WINTER, J. TED X. *Nanotechnology in cancer research* [enregistrament vídeo]. Disponible a: <<https://www.youtube.com/watch?v=IU4A4h1ACJs&t=4s>>. [Consultat a: Juny 2018].

Wikipèdia. *Nanomedicina* [imatge] (figura 5). Disponible a: <<https://es.wikipedia.org/wiki/Nanomedicina>>. [Consultat a: Juny 2018].