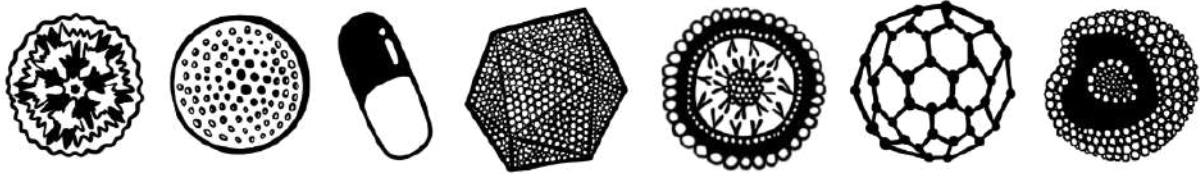


A GRANS PROBLEMES, PETITES SOLUCIONS

És la nanomedicina la medicina del futur?



Treball de Recerca 2n de batxillerat
2022

Muxuak

ABSTRACT

Actualment el càncer és una de les principals causes de mort al món, per aquest motiu són moltes les investigacions que busquen noves maneres de tractar-lo. És en aquesta recerca de noves teràpies on la nanomedicina guanya protagonisme, amb ella es volen aplicar els avantatges que ofereixen les nanopartícules en la millora o creació de nous tractaments contra el càncer.

En aquest treball s'explica el funcionament dels nanofàrmacs en comparació amb el dels fàrmacs convencionals. Alhora es presenten alguns dels tractaments actuals per combatre el càncer i algunes de les seves alternatives amb nanofàrmacs.

Dins del marc pràctic, amb l'objectiu d'acceptar o rebutjar les hipòtesis que donen resposta al problema proposat després de fer l'estudi teòric: "*Es poden utilitzar els nanofàrmacs per crear nous tractaments més eficaços contra el càncer?*", es planteja un experiment seguint el mètode científic. En ell es sintetitzen nanopartícules de PLGA amb Rodamina encapsulada, s'apliquen a cultius de cèl·lules tumorals i s'observa la seva internalització a través d'un microscopi de fluorescència. Finalment, després de tota la recerca tant teòrica com pràctica, s'arriba a la conclusió que els nanofàrmacs ens permeten augmentar l'eficiència dels tractaments convencionals contra el càncer.

Nowadays, cancer is one of the main causes of death worldwide, for this reason there is a lot of research looking for new ways to treat it. It is in this research of new therapies where nanomedicine gains importance, with it the advantages that nanoparticles offer can be applied to the improvement or creation of new cancer treatments.

In this project, the operating of nanomedicines in comparison with the operating of conventional medicines are explained. At the same time, some of the current cancer treatments and their alternatives with nanomedicines are presented.

Within the practical framework, in order to accept or deny the hypotheses that answer the question "*Can nanomedicines be used to create new cancer treatments with more effectiveness?*" –which was asked after doing the theoretical study– an experiment following the scientific method is proposed. In it PLGA nanoparticles with encapsulated Rhodamine are synthesized, applied to tumour cell cultures and their internalization is observed through a fluorescence microscope. Finally, after both theoretical and practical research, the conclusion is reached that nanomedicines can increase the efficiency of current cancer treatments.

AGRAÏMENTS

Tot aquest treball no hauria estat possible sense l'ajuda de moltes persones, és per aquest motiu que m'agradaria donar les gràcies a:

La meva tutora, per confiar tant en mi, ajudar-me i donar-me suport des del primer dia fent-ho tot molt fàcil.

El programa Argó per oferir-me l'oportunitat de realitzar una part del treball als laboratoris de la UAB amb eines a les quals sense ells possiblement no hauria pogut accedir.

Conseqüentment, a la J. L. per tutoritzar també el meu treball des de la UAB i transmetre'm el seu interès i coneixements sobre la nanomedicina.

De la mateixa manera, al David Montpeyó i al Pau Sarlé per tot el seu acompanyament en el desenvolupament de la part pràctica al laboratori, sense ells possiblement m'hauria perdut entre tants procediments.

Ahora a l'Aitor, la Maura, la Clàudia i el Martí per compartir amb mi les pràctiques fent-les molt més amenes i entretingudes.

El meu iaio, per ajudar-me a triar el tema del treball i per compartir amb mi i transmetre'm la passió de conèixer i aprendre cada dia coses noves.

La Paula Maria Arnau, l'amiga i l'artista en qui he confiat per fer la il·lustració de la portada, no la podria haver demanat a ningú millor.

Els meus pares, la meva família, i amigues, que són qui més m'ha hagut d'aguantar parlant sobre el tema durant pràcticament un any, i qui, tot i així, més suport m'ha donat.

I finalment, al Pau Vallvé per ser, amb la seva música, la banda sonora de totes les hores dedicades al treball.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	6
2. MARC TEÒRIC	8
2.1. Fàrmacs tradicionals	8
2.1.1. Farmacocinètica	9
2.2. Nanomedicina	12
2.3. Nanofàrmacs	12
2.3.1. Característiques	13
2.4. Càncer	19
2.4.1. Tractaments contra el càncer tradicionals	21
2.4.2. Tractaments contra el càncer amb nanofàrmacs	23
3. MARC PRÀCTIC	26
3.1. Introducció al marc pràctic	26
3.2. Materials	28
3.3. Mesures preventives	34
3.4. Procediment	35
3.4.1. Síntesi de nanopartícules de PLGA	35
3.4.2. Aplicació de les nanopartícules de PLGA en cultius de cèl·lules tumorals	43
3.4.3. Càlcul de l'eficiència d'encapsulació de la Rodamina	48
3.5. Resultats i anàlisi dels resultats	50
3.5.1. Síntesi de nanopartícules de PLGA	50
3.5.2. Internalització de les nanopartícules de PLGA	52
3.5.3. Eficiència d'encapsulació de la Rodamina	54
4. CONCLUSIONS	56
5. FONTS D'INFORMACIÓ	59
5.1. Bibliografia	59
5.2. Webgrafia	59

1. INTRODUCCIÓ

Des de ben petita que he tingut la necessitat d'observar amb curiositat les coses del meu entorn, fer-me preguntes sobre elles i, tot seguit, intentar resoldre-les; buscant així impacientment respostes. Suposo que aquest és el motiu pel que les ciències sempre m'han cridat tant l'atenció; ens permeten estudiar, conèixer i intentar entendre millor el que ens envolta, a nosaltres mateixos i als altres.

Així doncs, quan vaig haver de decidir el tema del meu treball de recerca, només tenia clar que volia fer-lo amb el departament de biologia i sobre algun tema relacionat amb la medicina, un àmbit al que m'agradaria dedicar-me en un futur.

Per agafar inspiració, vaig mirar els temes que proposaven des del programa Argó de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) d'assessoraments a treballs de recerca, un programa que posteriorment em va ajudar en la realització de tot el meu treball. Finalment, havent-ho rumiat bastant, vaig decidir que la nanomedicina era un tema perfecte sobre el qual fer-lo.

Malgrat no tenir gaire coneixement sobre el tema, els nanofàrmacs em van cridar ràpidament l'atenció. Dins del meu cap la nanomedicina era una medicina futurista, m'atreuria a dir que de ciència ficció i tot. La meva sorpresa va ser quan, després de fer una primera recerca per internet sobre el tema, vaig veure que no anava pas tan equivocada, i que en molts articles es parla d'ella com a "la medicina del futur".

L'objectiu inicial del meu treball és endinsar-me al món de la nanomedicina, dels nanofàrmacs i conèixer els avantatges que aquests ens poden oferir. Em vaig informar sobre algunes de les aplicacions pràctiques de les nanopartícules en el camp de la biomedicina i vaig veure que poden tenir usos molt diversos: tractaments contra el COVID-19, contra l'anèmia, de prevenció de problemes cardíacs... D'entre tots ells, vaig decidir centrar-me en una malaltia que, per desgràcia, tots hem viscut d'aprop; el càncer.

Actualment, tot i existir una gran varietat de teràpies contra ell, el càncer segueix sent una de les principals causes de mort al món. És per aquest motiu que amb la nanomedicina es busca una manera de crear nous tractaments per combatre'l o de millorar els que ja avui en dia existeixen.

Després de fer una recerca teòrica, vaig preguntar-me si realment es podrien utilitzar els nanofàrmacs per crear nous tractaments més eficaços contra el càncer i vaig formular tres possibles respostes en forma d'hipòtesi. Amb la finalitat de comprovar-les, vaig sintetitzar nanopartícules de PLGA amb Rodamina encapsulada, les vaig aplicar a cultius de cèl·lules tumorals i en vaig observar la seva internalització als laboratoris de l'Institut de Recerca de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) de la UAB, on vaig poder accedir gràcies al programa Argó organitzat per la mateixa universitat.

Les fotografies o imatges que apareixen en aquest treball són majoritàriament meves, en cas contrari indicaré la font al peu de foto.

2. MARC TEÒRIC

2.1. Fàrmacs tradicionals

Sovint es tendeix a confondre entre fàrmacs i medicaments però hem d'evitar pensar que són el mateix. Els fàrmacs són els principis actius dels medicaments, dit d'una altra manera, són els responsables de que al prendre un medicament, aquest tingui un efecte sobre nosaltres i el nostre cos. Considerem fàrmacs totes les substàncies químiques que puguin tenir un impacte sobre els processos fisiològics dels éssers vius.

L'ús de fàrmacs està molt estès en el nostre dia a dia, ens faciliten la vida quotidiana i depenem bastant d'ells. Quan tenim mal de cap, mal de gola, mal de panxa o febre, entre altres, quasi tots tendim a prendre's un ibuprofè o un paracetamol, així aconseguim que el dolor que sentim disminueixi o fins i tot, arribi a desaparèixer.

Tant l'ibuprofè com el paracetamol, dos dels analgèsics¹ més utilitzats en adults, formen part del grup de fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals (AINE)². Els fàrmacs AINE es distribueixen per tot el cos, en el cas de l'ibuprofè i el paracetamol mitjançant la via oral, i un cop ja repartits, el seu funcionament consisteix en el bloqueig d'unes proteïnes per evitar la producció de prostaglandines³.

Les prostaglandines són uns lípids amb un paper força important en la producció del dolor i les inflamacions, per tant, al eliminar-les o reduir-les, també eliminem o reduïm el dolor i les inflamacions. Tanmateix, les prostaglandines també tenen altres funcions com la protecció contra l'àcid de l'estómac o l'arribada de sang al ronyó. L'alteració d'aquestes altres funcions explica molts dels efectes secundaris dels AINE.

La distribució del fàrmac pel cos es fa a través del sistema de circulació de manera sistèmica, provocant el bloqueig de les prostaglandines en pràcticament tot el cos. Per tant, el fàrmac no anirà només cap a l'origen del dolor i les inflamacions, sinó que es trobarà repartit per tot el cos afectant també negativament a altres òrgans que ja estan sans i funcionen correctament.

¹ Medicaments que suprimeixen el dolor, baixen la temperatura corporal i solen tenir un efecte antiinflamatori.

² A l'inversa dels antiinflamatoris corticoesteroidals, el seu principi actiu no és la cortisona ni els seus derivats. Poden tenir una funció analgèsica (alleugen el dolor), antiinflamatòria i antipirètica (disminueixen la febre).

³ Substàncies derivades de l'àcid prostanoic. Es sintetitzen en quantitats molt baixes i sempre actuen localment.

Un altre inconvenient d'aquests fàrmacs és la manera en la que es dosifiquen les dosis. El cos rep el fàrmac de manera puntual i amb molta quantitat, la qual pateix una ràpida degradació. Això provoca que la concentració del fàrmac en el cos disminueixi molt ràpidament i per tant, tingui un efecte de curta durada. Per aquest motiu sovint ens els hem de prendre cada poques hores.

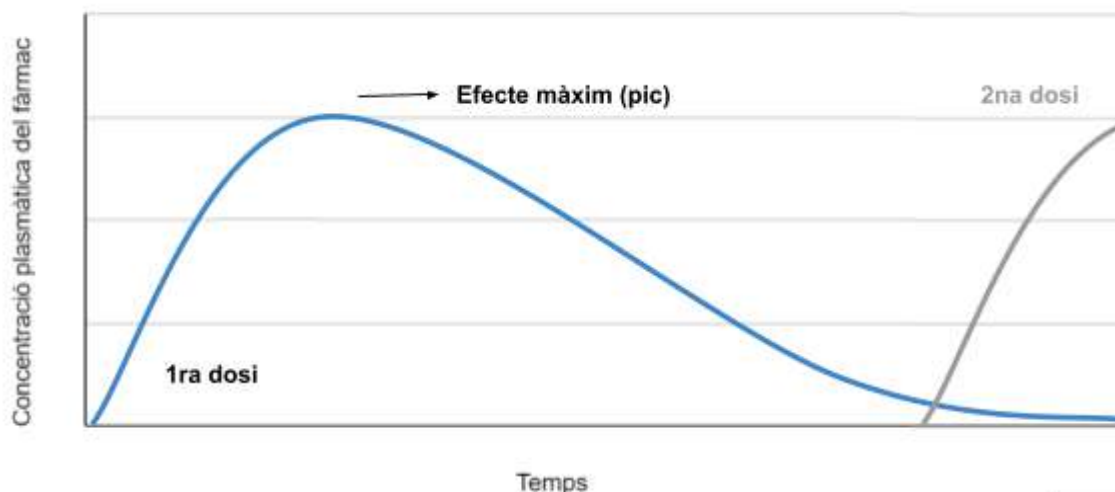


Figura 1. En aquesta gràfica podem observar com varia la concentració d'un fàrmac en el cos amb el temps, després d'aplicar una dosi d'un fàrmac tradicional com podria ser l'ibuprofè. Tal i com hem explicat, l'efecte màxim del fàrmac serà puntual i per tant, serà necessari aplicar una dosi nova per tornar a aconseguir-lo.

2.1.1. Farmacocinètica

La farmacocinètica varia en funció dels components químics de cada fàrmac i les condicions o factors relacionats amb cada pacient. És una branca de la farmacologia que estudia tots els processos pels que passa un fàrmac dins del cos, des que s'ingereix fins que s'expulsa completament. Podem diferenciar aquests processos entre quatre etapes:

Absorció

En primer lloc, quan prenem un medicament el nostre cos ha d'absorbir el fàrmac perquè aquest pugui fer efecte. L'absorció és tot el recorregut que fa un fàrmac entre el lloc on s'ha administrat i la circulació sistèmica⁴ de l'individu. Al llarg d'aquest trajecte el fàrmac va travessant les membranes cel·lulars i es troba amb diversos entrebancs que dificulten la seva absorció o n'acceleren la degradació.

⁴ Circulació de sang entre el cor i la resta del cos.

Aquests entrebancs depenen de factors com la liposolubilitat⁵, el grau d'ionització⁶ o, en el cas d'administració per via digestiva, els propis fenòmens d'eliminació presistèmica⁷ que té el nostre cos, com per exemple el primer pas hepàtic, on sovint una part del fàrmac es destrueix al passar pel fetge.

L'absorció té un paper molt important en el funcionament dels fàrmacs ja que determina amb quina rapidesa farà efecte el medicament. Hi ha moltes vies per les que es poden administrar els fàrmacs (oral, subcutània, intravenosa, rectal, epidural, per inhalació...) i cadascuna té una eficiència d'absorció diferent.

Parlem de biodisponibilitat per referir-nos al percentatge del fàrmac administrat que arriba a circular per l'organisme. Per exemple, en l'administració feta per via intravenosa la biodisponibilitat és del 100% ja que el fàrmac entra directament a la circulació sistèmica i evita l'absorció. Ara bé, la biodisponibilitat del paracetamol és d'aproximadament el 75% i la de l'ibuprofeno del 80%.

Distribució

Un cop el fàrmac ja es troba dins del torrent sanguini passa a la fase de distribució, on és transportat per tot l'organisme.

La distribució va majoritàriament determinada per la sang que rep cada teixit, com més sang reben els teixits més fàcil és obtenir-hi una alta concentració del fàrmac. Per tant, pel fàrmac serà molt més fàcil accedir al cervell o als ronyons, òrgans amb un alt flux sanguini, que a altres òrgans amb un flux sanguini molt més baix com per exemple serien la pell o el teixit adipós⁸.

Una altra clara mostra del funcionament de la distribució seria el cas de les persones embarassades, on molta de la seva sang va dirigida al fetus i per tant és allà on s'obté la màxima concentració del fàrmac. Durant l'embaràs es recomana eliminar l'ús de fàrmacs per aquest mateix motiu, ja que l'acumulació de fàrmacs pot ser perjudicial pel correcte desenvolupament del fetus.

⁵ Capacitat de dissoldre's en greixos, olis i altres solvents orgànics apolars.

⁶ Quantitat de solut que s'ionitza al barrejar-se amb un solvent i dissoldre's.

⁷ Processos a través dels quals s'eliminen certes substàncies abans d'arribar a la circulació sistèmica.

⁸ Teixit que es troba en l'organisme dels animals invertebrats, la seva funció és protegir l'organisme, fer de reserva energètica i de suport estructural.

Metabolisme

Durant el metabolisme el sistema enzimàtic hepàtic, situat al fetge, detecta el fàrmac com a un agent extern i possiblement perjudicial a qui ha d'inactivar i eliminar del cos.

Per facilitar-ne l'eliminació, el fàrmac passa per un procés de transformació química. En aquest procés es converteixen els components químics en components hidrosolubles⁹ i més polars¹⁰ a base d'oxidació¹¹, hidròlisi¹², reducció¹³, condensació, hidratació o isomerització¹⁴. Com més hidrosolubilitat i més polaritat tinguin les substàncies, més fàcil en serà la seva excreció.

Quan el nostre cos inactiva un fàrmac, aquest perd el seu efecte. Per tant, serà necessari prendre-se'n una dosi nova per tornar a sentir-ne l'efecte.

Majoritàriament els processos de metabolisme es duen a terme al fetge. Tot i així, en casos puntuals també hi poden interferir els pulmons, els ronyons, la pell o les cèl·lules del tracte intestinal.

Excreció

Després d'inactivar i metabolitzar els fàrmacs només faltará expulsar-los del cos.

De l'excreció normalment se n'encarreguen els ronyons per via renal. No obstant, en casos de fàrmacs amb una alta volatilitat, el sistema respiratori ens funcionarà com a via d'eliminació. La suor, la saliva o les llàgrimes també excreten però en quantitats menors.

Com podem observar, durant aquestes quatre etapes es perd una alta quantitat del fàrmac que ingerim inicialment. De manera que, de la dosi que ens prenem, només una quantitat força petita ens produeix realment l'efecte.

Això provoca un augment en les dosis. Com més altes són les dosis, més triguen a poder ser expulsades del cos en el procés d'excreció i consegüentment, el fàrmac s'està més estona en contacte amb l'organisme, provocant així també un augment en els efectes secundaris.

⁹ Solubles en aigua.

¹⁰ Molècules amb un extrem carregat positivament i l'altre negativament.

¹¹ Reacció química en la que es perden electrons.

¹² Reacció química en la que una molècula d'aigua trenca enllaços químics.

¹³ Reacció química en la que es guanyen electrons.

¹⁴ Transformació d'una molècula per obtenir un isòmer (compost químic amb la mateixa fórmula molecular però propietats físiques i químiques diferents).

2.2. Nanomedicina

En els últims anys, són molts els avenços que hi ha hagut i està havent-hi en tots els àmbits relacionats amb la biotecnologia. Aquesta busca la modificació, creació, ús i coneixement de tècniques o eines per satisfer les necessitats humanes.

La nanotecnologia és una branca de la tecnologia de la qual es va parlar per primer cop al 1959, des de llavors la seva evolució ha anat en constant creixement. La base d'aquesta consisteix en la manipulació de matèria a escala nanomètrica¹⁵ és a dir, en nivells tan petits com els àtoms i les molècules. Quan s'aplica la nanotecnologia per diagnosticar, tractar o prevenir malalties, parlem de nanomedicina.

La nanomedicina, gràcies al ràpid desenvolupament de diversos nanomaterials i en consegüent, als ràpids avenços en la creació de nanofàrmacs, té uns avantatges únics que li aporten un rol cada cop més important en la medicina actual.

2.3. Nanofàrmacs

Considerem nanofàrmacs tots els nanomaterials utilitzats per diagnosticar, tractar o prevenir malalties en el món de la medicina.

A vegades també se'ls anomena nanovehícles perquè fan la funció de portar fàrmacs al seu interior i transportar-los. Així doncs, en els nanofàrmacs, els fàrmacs van encapsulats dins d'un nanomaterial amb unes propietats concretes en funció de les quals podem aconseguir transportar, alliberar o aplicar els fàrmacs de formes molt més diverses i efectives que les convencionals modificant-ne la farmacocinètica. Més endavant en veurem alguns exemples.

Aquesta diversitat d'opcions per aplicar els fàrmacs depèn dels nanomaterials que utilitzem i ens aporta una de les característiques clau dels nanofàrmacs: la capacitat d'anar de manera dirigida només al lloc on s'ha produït una inflamació o hi ha alguna anomalia causant d'una malaltia, per tant, d'anar on realment es necessita el fàrmac.

Gràcies a això, amb els nanofàrmacs es vol crear una medicina més personalitzada i individual on les dosis i la manera d'administrar-les variïn segons les necessitats de cada individu, aconseguint així molts menys efectes secundaris.

¹⁵ 1nm = 1×10⁻⁷cm.

Podem utilitzar els nanofàrmacs per millorar els fàrmacs tradicionals eliminant o reduint alguns dels seus inconvenients. Si per exemple fem un nanofàrmac amb un nanomaterial que es vagi dissolent progressivament un cop aplicat dins de l'individu, aconseguirem que l'impacte del fàrmac amb el cos en lloc de ser de manera puntual i en altes quantitats sigui dosificat i en quantitats constants. Alhora, d'aquesta manera aconseguim mantenir la concentració del fàrmac al cos, un efecte de més llarga durada i, en consegüent, més temps entre dosis.

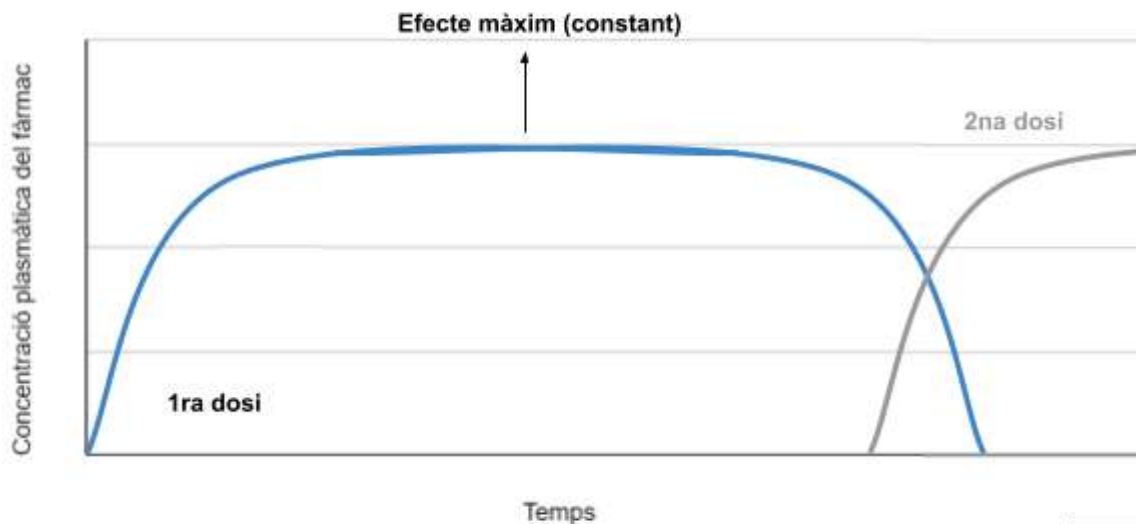


Figura 2. En aquesta gràfica podem observar com varia la concentració d'un fàrmac en el cos amb el temps, després d'aplicar una dosi d'un nanofàrmac. Tal i com hem explicat, l'efecte màxim del fàrmac serà constant i de llarga durada.

2.3.1. Característiques

Podem sintetitzar nanofàrmacs amb moltes mides, formes, superfícies o materials diferents. En funció d'aquests, obtindrem una gran diversitat de propietats que ens permetran alterar la farmacocinètica dels fàrmacs i en conseqüència, les seves funcions i aplicacions.

Mida

Si volem aconseguir una bona distribució del fàrmac pel cos, la mida de les nanopartícules ha de ser prou petita com per evitar que puguin ser capturades al passar pel sistema endotelial¹⁶ (< 200nm), però prou gran com per evitar la filtració directa pels ronyons (> 5nm). Així doncs la mida òptima dels nanofàrmacs es troba entre aquests dos paràmetres, sent x les nanopartícules: $5\text{nm} < x < 200\text{nm}$.

¹⁶ Teixit que forma les parets internes dels vasos sanguinis i limfàtics. Regula el flux de sang per aquests a través de canvis en el diàmetre.

Més endavant, quan parlem de l'ús de nanofàrmacs en tractaments contra el càncer, a l'apartat 2.4., veurem el fenomen de permeabilitat i retenció augmentada (efecte EPR¹⁷) i com d'important i fonamental és la grandària de les nanopartícules per la seva eficàcia.

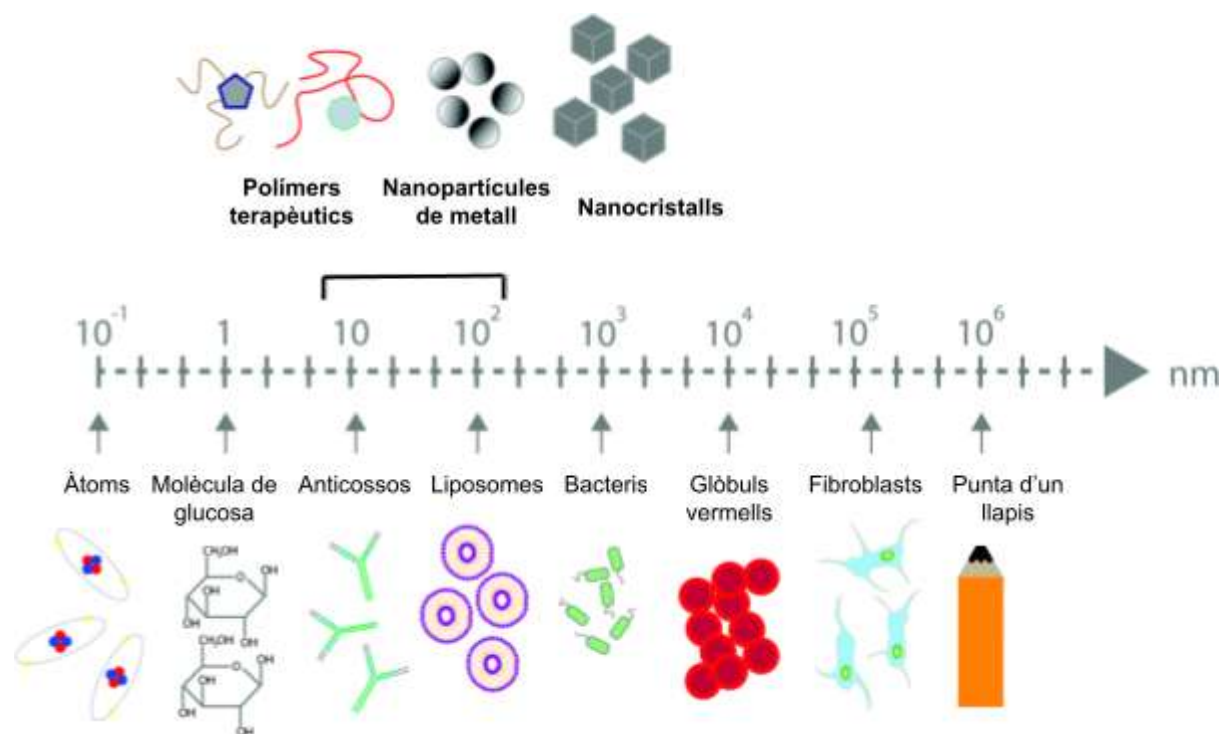


Figura 3. Escala on es compara la mida d'alguns nanomaterials amb la d'altres elements.
 (Font: FOULKES, Rachel; HOSKINS, Clare; JOY, Abigail; MAN Ernest; THIND, Jasmine; YEUNG, Suet.
 The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: current and future perspectives.)

Forma

Podem sintetitzar nanopartícules en una abundant varietat de formes. De la mateixa manera que l'aparença física d'un virus o bacteri els permet evitar l'atac del sistema immunològic, la forma també té un paper força important en la distribució dels nanofàrmacs.

La interacció entre les membranes cel·lulars i les nanopartícules va determinada per la forma d'aquestes. Està demostrat que les filomicel·les¹⁸ poden arribar a romandre a la sang fins a 10 vegades més temps que les micel·les esfèriques, tenint així una eficiència molt més alta.

En un estudi fet per Lu Zhang, Huilan Su, Haolu Wang, Qian Li, Xiao Li, Chuanqing Zhou, Jia Xu, Yimin Chai, Xiaowen Liang, Liqin Xiong i Chunfu Zhang el 2019¹⁹, es va evidenciar

¹⁷ Provenint de la traducció a l'anglès: *Enhanced Permeability and Retention effect*.

¹⁸ Micel·les amb una forma allargada.

¹⁹ *Tumor chemo-radiotherapy with rod-shaped and spherical gold nano probes: Shape and active targeting both matter*.

com, en el líquid intersticial²⁰ dels tumors, les nanopartícules cilíndriques d'or es distribueixen més ràpidament que les esfèriques. De la mateixa manera, en un altre estudi del 2011²¹, Arnida, M.M. Janát-Amsbury, A. Ray, C.M. Peterson i H. Ghandehari van observar que les nanopartícules cilíndriques es distribueixen entre els tumors, mentre que les nanopartícules esfèriques o amb forma de disc només es distribueixen per la superfície dels tumors.

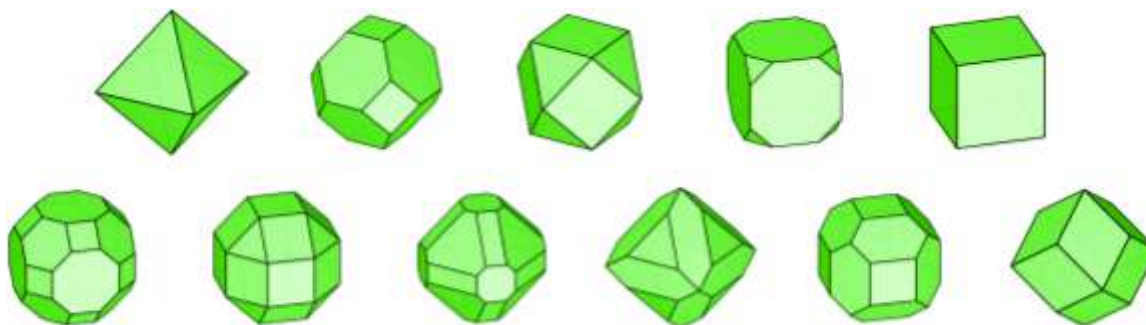


Figura 4. Dibuix esquemàtic on es poden observar algunes de les formes en les que es poden crear nanopartícules. (Font: BARNARD, Amanda; SUN, Baichuan. Impact of speciation on the electron charge transfer properties of nanodiamond drug carriers.)

Superfície

La superfície de les nanopartícules pot estar carregada positivament, negativament, o pot ser neutra.

Les nanopartícules amb una superfície amb càrrega negativa són eliminades al passar pel fetge. Per altra banda, les que tenen una superfície amb càrrega positiva són eliminades a través de ionitzacions²².

Això explica perquè les nanopartícules amb una superfície neutra, al no ser ni positives ni negatives, es mantenen més estona en circulació pel nostre cos que les que tenen càrrega. En funció de les propietats del lloc que es vol tractar, i del tractament que s'hi vol fer, variarà la càrrega de la superfície dels nanofàrmacs.

Una altra característica a considerar al parlar de la superfície dels nanofàrmacs, n'és la seva hidrofilitat. Els materials poden ser hidrofòbics o, en cas contrari, hidrofílics. Les superfícies hidròfobes repel·leixen l'aigua, i les hidrofíliques són solubles en ella.

²⁰ Líquid que es troba entre les cèl·lules, en aquest cas tumorals.

²¹ *Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages.*

²² Procés físic a través del qual els àtoms es converteixen en ions després d'haver guanyat o perdut electrons.

Sovint, els macròfags²³ del sistema reticuloendotelial²⁴ eliminen les nanopartícules amb superfície hidròfoba. És per aquest motiu que normalment per cobrir la superfície dels nanofàrmacs s'escullen materials molt hidrofílics que minimitzen l'opsonització, procés en el que es marquen els agents patògens perquè els fagòcits²⁵ puguin ingerir-los. Alguns exemples d'aquests materials en són el PLGA (Àcid Poli Làctic-co-Glicòlic) o el PEG (Polietilè Glicol), polímers biocompatibles i biodegradables.

Finalment, també es poden enllaçar alguns lligands o components químics amb la superfície dels nanofàrmacs. A través d'aquests lligands podem aconseguir més funcions i potencials. En el cas del càncer, per exemple, si enllacem a les nanopartícules àcids nucleics o proteïnes que s'enganxin als receptors de les cèl·lules tumorals aconseguirem una major concentració del nanofàrmac en la zona tumoral. També podem enllaçar-hi lligands que ens permetin una senyalització fluorescent del fàrmac o que detectin teixits concrets on es vol aplicar el fàrmac.

La superfície té un paper molt important ja que forma la capa exterior de les nanopartícules, la qual protegeix els fàrmacs i en disminueix la seva degradació al viatjar pel cos. Conseqüentment, al disminuir les quantitats de fàrmac repartides pel cos també disminueix els efectes secundaris i augmenta la quantitat final del fàrmac al lloc afectat.

Material

Un factor important a tenir en compte al dissenyar nanopartícules n'és el material. Segons els nanomaterials amb els que estan formats els nanofàrmacs, podem distingir entre múltiples varietats de nanopartícules:

Liposomes

Els liposomes consten d'una bicapa lipídica amb forma esfèrica que envolta un interior aquós amb el fàrmac en qüestió. La superfície dels liposomes és hidròfila.

Per transportar les substàncies, els liposomes fusionen la seva bicapa lipídica amb la membrana plasmàtica de les cèl·lules, la qual també és una bicapa lipídica. D'aquesta manera el fàrmac és lliurat de manera directa dins del citoplasma.



Figura 5. Il·lustració d'un liposoma. (Font: BARTEN, Dennis.)

²³ Tipus de leucòcits (glòbuls blancs) amb la funció d'eliminar per fagocitosis (envoltant-los i destruint-los) els cossos estranys, microorganismes o cèl·lules mortes.

²⁴ Sistema que participa activament en la defensa del cos contra infeccions i en l'eliminació d'alguns productes resultants de la degradació cel·lular.

²⁵ Cèl·lules immunitàries que poden rodejar i destruir microorganismes, ingerir material estrany i eliminar cèl·lules mortes. Els macròfags, els monòcits i els neutròfils en són alguns exemples.

Nanopartícules polimèriques

Com bé ens diu el seu nom, les nanopartícules polimèriques són totes aquelles que estan fetes amb materials polimèrics. Els materials polimèrics o polímers són generalment orgànics i s'obtenen a través del tractament o la transformació química de substàncies naturals. Acostumen a tenir un alt pes molecular amb una estructura repetitiva, característiques que els fan ser més fàcilment modificables per la temperatura o la pressió i, alhora, els permeten dividir-se en diferents monòmers facilitant-ne la seva eliminació del cos a través dels processos metabòlics.

El PLGA (Àcid Poli Làctic-co-Glicòlic) o el PEG (Polietilè Glicol), ja esmentats a l'apartat anterior sobre la superfície dels nanofàrmacs, són alguns dels polímers més utilitzats en nanofàrmacs.

Podem trobar les nanopartícules polimèriques en diverses formes:

Dendrímers

Els dendrímers són macromolècules simètriques amb moltes branques. Tenen un exterior molt dens i un interior poc dens, on normalment es col·loca el fàrmac.

Les seves múltiples branques i ramificacions ens permeten enganxar-hi més d'una molècula de fàrmac alhora.

Micel·les

L'estructura de les micel·les consta d'una capa lipídica amb l'exterior hidròfil i l'interior hidrofòbic, contrari al dels liposomes. Aquest interior hidrofòbic facilita el transport i la solubilitat de fàrmacs hidrofòbics o poc solubles en aigua.

Nanopartícules de proteïnes

En la creació de nanopartícules es poden utilitzar tant proteïnes animals com virals o vegetals com serien l'albumina, el col·lagen o la ferritina. S'aprofita la capacitat de certes proteïnes d'enganxar-se a les cèl·lules tumorals per augmentar l'eficiència del tractament en aquella zona.

Quan ajuntem proteïnes o pèptids amb una o més molècules de polietilè glicòlic, parlem de nanopartícules pegilades.

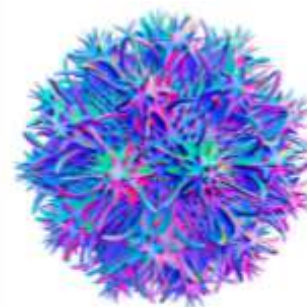


Figura 6. Il·lustració d'un dendrímer. (Font: PASIEKA, Alfred.)

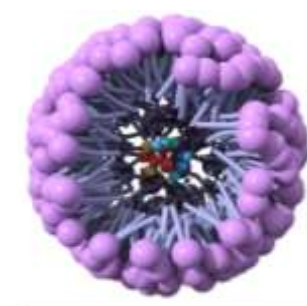


Figura 7. Il·lustració d'una micel·la. (Font: HUA, Xilan.)

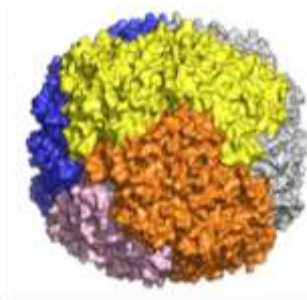


Figura 8. Il·lustració d'una nanopartícula de proteïnes. (Font: CHUNKAI, Gu.)

Nanopartícules inorgàniques

Deixant de banda els materials orgànics, hi ha molts materials inorgànics que també poden ser utilitzats en la síntesi de nanofàrmacs. Alguns dels més comuns són:

Nanopartícules de silicó

Les nanopartícules de silicó es poden fer de moltes maneres i formes diverses: sòlides, poroses, buides...

Unes de les nanopartícules de silicó més conegudes són les mesoporoses²⁶ gràcies a la possibilitat que ofereixen de poder adaptar tant la quantitat com la mida del diàmetre dels porus a la necessitada.

En funció de la mida dels porus variarà la mida dels fàrmacs aplicats i la resposta biològica de l'individu cap a aquests.

Nanopartícules de carboni

El carboni és molt lleuger i té una alta conductivitat elèctrica i tèrmica. Es pot trobar en varies formes, les més utilitzades en la creació de nanofàrmacs són el full·lerè, el grafit i els nanotubs de carboni²⁷ (CNTs).

Està demostrat que la forma allargada dels CNTs augmenta el temps que romanen les nanopartícules en el cos en comparació amb les nanopartícules esfèriques. Per aconseguir una major protecció dels tubs i les substàncies que porten a l'interior, els CNTs poden tenir més d'una paret.

Nanopartícules de metall

Les nanopartícules de metall són molt versàtils pel que fa a la mida, la morfologia i la càrrega química. S'utilitzen sobretot com a agents traçadors o de contrast en la diagnòsi de malalties.

Nanopartícules d'or

Les nanopartícules d'or ofereixen molta flexibilitat en quant a les funcions que poden fer. S'està estudiant utilitzar-les com a transportadores de fàrmacs però també com a agents de contrast, o com a tractament contra les cèl·lules tumorals.

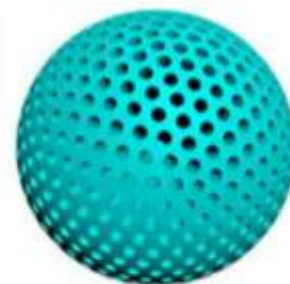


Figura 9. Il·lustració d'una nanopartícula de silicó.
(Font: American Chemical Society.)



Figura 10. Il·lustració d'un nanotub de carboni de 3 parets.
(Font: HIRSCHMANN, T.)

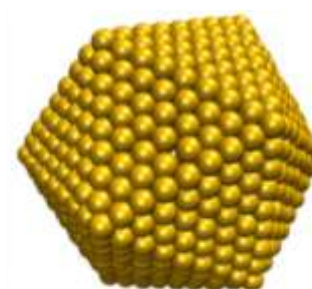


Figura 11. Il·lustració d'una nanopartícula d'or.
(Font: GEZELTER, Dan.)

²⁶ Nanopartícules amb porus d'entre 2 i 50 nm.

²⁷ Tubos de carboni amb forats amb diàmetres nanomètrics.

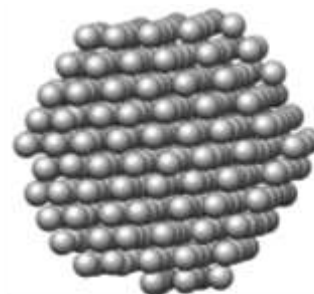
La teràpia d'hipertèrnia és un dels tractaments directes que s'investiga amb les nanopartícules d'or. Consisteix en la injecció de les nanopartícules dins de les cèl·lules tumorals per, posteriorment, escalfar l'or amb rajos X aconseguint així alhora escalfar les cèl·lules tumorals i provocar-ne la seva mort.

Nanopartícules de plata

Les nanopartícules de plata, tot i no ser tan conegudes com les d'or, poden tenir diferents usos mèdics.

En les quantitats adequades, la plata iònica (Ag^+) s'utilitza en forma d'antibiòtic tòpic per tractar ferides i prevenir-ne la seva infecció, funció que les nanopartícules de plata també poden fer.

Per altra banda, s'ha demostrat que les nanopartícules de plata d'entre 1 i 10 nm s'enganxen a les glicoproteïnes del Virus d'Immunodeficiència Humana (VIH-1), factor que podria ser clau en el disseny de futurs tractaments contra el VIH-1.



*Figura 12. Il·lustració d'una nanopartícula de plata.
(Font: Institute for Basic Science.)*

Nanopartícules magnètiques

Les nanopartícules magnètiques estan fetes majoritàriament a partir d'òxid fèrric (Fe_2O_3), un compost inorgànic molt paramagnètic²⁸, biocompatible i que es pot arribar a trobar en mides molt petites.

Dins dels seus usos, gràcies a la capacitat del ferro d'escalfar-se, hi trobem la teràpia d'hipertèrnia. A més a més, les nanopartícules magnètiques també són excel·lents com a agents de contrast en ressonàncies magnètiques.



*Figura 13. Il·lustració d'una nanopartícula magnètica.
(Font: KNOPKE, Christian.)*

2.4. Càncer

Normalment, les cèl·lules del nostre cos es divideixen a base de mitosis i meiosis contínuament, passant també alhora per un procés de senescència, el qual comprèn totes les etapes d'envelliment biològic de les cèl·lules fins que deixen de poder-se dividir.

Quan una cèl·lula normal és innecessària o desenvolupa una mutació negativa que no pot arreglar activa l'apoptosi, una forma de mort cel·lular programada a base d'esdeveniments bioquímics.

²⁸ Amb molta susceptibilitat magnètica positiva, pot ser atret fàcilment per un imant.

Al contrari de les cèl·lules normals, les cèl·lules tumorals o cancerígenes tenen l'apoptosi bloquejada i, tot i tenir alteracions, es reproduïxen de manera pràcticament il·limitada.

En conseqüència d'aquesta multiplicació descontrolada de les cèl·lules en el cos d'un individu, es creen les masses que anomenem tumors. Com més gran sigui l'expansió dels tumors, més possibilitats hi haurà d'afectar els teixits normals i sans del voltant, arribant en alguns casos a la seva substitució o, fins i tot, destrucció.

Com que no es poden morir, les cèl·lules tumorals són sovint considerades immortals. Aquesta immortalitat en comparació amb la vida de les cèl·lules normals, la qual és limitada, suposa un gran avantatge i moltes facilitats a l'hora de fer experiments.

Dins dels càncers hi englobem totes aquelles malalties caracteritzades pel desenvolupament de cèl·lules anormals amb una alta proliferació²⁹ que es reparteixen de manera descontrolada i desordenada en qualsevol part del cos podent formar o no tumors malignes. Aquestes cèl·lules anormals són les mateixes que coneixem com a cèl·lules tumorals o cancerígenes.

En funció del teixit d'origen dels tumors distingim els càncers entre:

- Carcinomes, originats en les cèl·lules epitelials³⁰. Representen més del 80% dels càncers i inclouen alguns dels més freqüents: càncer de mama, de pulmó, de còlon, de pròstata o d'estómac.
- Sarcomes, originats al teixit connectiu o conjuntiu, a partir del que deriven els músculs, els ossos, els cartílags i el teixit adipós. El més comuns són els sarcomes ossis.
- Leucèmies, originades a la medul·la òssia, encarregada de la producció de leucòcits³¹, eritròcits³² i trombòcits³³. Generalment no acostumen a formar tumors sòlids.
- Limfomes, originats al teixit limfàtic, en ganglis o òrgans limfàtics com la melsa o l'apèndix.

També existeixen els tumors benignes causats per una neoplàsia³⁴ sense capacitat de metàstasi, és a dir que no es poden estendre a altres òrgans o parts del cos. Aquests són pràcticament inofensius per la salut humana menys en els casos on la massa del tumor comprimeix òrgans vitals. Les berrugues són un exemple de tumor benigne inofensiu.

²⁹ Creixement i multiplicació o reproducció ràpida.

³⁰ Cèl·lules que recobreixen superfícies d'òrgans, glàndules o estructures corporals.

³¹ Glòbuls blancs, responsables de la resposta immunitària de l'organisme.

³² Glòbuls vermells, transportadors d'oxigen a la sang.

³³ Plaquetes, fonamentals en la coagulació de la sang.

³⁴ Creixement anormal de teixit.

Segons un article publicat el desembre del 2020 per l'Organització Mundial de la Salut (OMS)³⁵ el càncer és la sisena causa principal de mort al món. Per aquest mateix motiu són moltes les investigacions que es duen a terme diàriament en laboratoris de tot el món amb l'objectiu comú de trobar noves maneres de curar-lo.

Tot i així, en els últims anys la medicina ha avançat molt en l'àmbit de l'oncologia³⁶ i ja avui en dia existeixen i s'utilitzen una gran varietat de tractaments contra el càncer.

2.4.1. Tractaments contra el càncer tradicionals

Per obtenir més bons resultats, en funció de les característiques de cada cas de càncer s'aplica un tractament personalitzat diferent. Sovint en aquests tractaments es combina més d'una tècnica alhora amb l'objectiu de que es complementin entre elles.

Cirurgia

La cirurgia consisteix en l'operació de forma manual o amb l'ajuda d'instruments quirúrgics de l'organisme intern a través d'incisions i sutures en la pell i teixits.

En funció del tipus de càncer i de com d'avançat estigui, la cirurgia pot tenir diferents funcions en el seu tractament.

L'objectiu principal és fer una extirpació total del tumor. Però, en cas d'haver-hi la possibilitat de danyar en el procediment a altres òrgans o teixits sans del pacient, s'extirpa el tumor parcialment, aconseguint així reduir-ne la mida i conseqüentment, la quantitat de cèl·lules cancerígenes en el cos.

Amb aquestes operacions s'aconsegueix disminuir o alleujar els símptomes del càncer eliminant, per exemple, la compressió exercida per la massa tumoral sobre alguns òrgans.

La cirurgia s'acostuma a utilitzar en casos de tumors sòlids continguts en un part concreta del cos, és per aquest motiu que no és un tractament viable en casos de metàstasi o de leucèmia.

El temps de recuperació i rehabilitació posterior a la intervenció quirúrgica juntament amb la possibilitat d'infecció de l'àrea tractada són dos dels seus màxims inconvenients.

Quimioteràpia

La quimioteràpia és un tractament que es basa en l'ús de fàrmacs químics per destruir les cèl·lules tumorals reduint o alentint el seu creixement.

³⁵ *The top 10 causes of death.*

³⁶ Branca de la medicina especialitzada en la diagnosi i tractament del càncer.

Aquesta desacceleració en la reproducció de les cèl·lules es pot aconseguir de diverses maneres i amb una gran varietat d'agents químics:

- Agents alquilans, modifiquen el DNA de les cèl·lules.
- Antimetabòlits, interfereixen en el DNA i el RNA impedit que el DNA es pugui copiar.
- Antibiótics antitumorals o antraciclins, es lliguen al voltant del DNA de les cèl·lules impedit-ne la seva reproducció. La Doxorubicina n'és un exemple.
- Inhibidors de la topoisomerasa, interfereixen en les topoisomerases de les cèl·lules, encarregades de separar les dues cadenes del DNA per permetre la seva duplicació.
- Inhibidors de la mitosi, eviten que els enzims sintetitzin les proteïnes necessàries per la replicació de les cèl·lules.
- Corticoesteroides, hormones que redueixen les funcions de les cèl·lules.

L'administració dels fàrmacs es fa normalment per via intravenosa però també es pot fer per via oral o tòpica³⁷.

Els efectes secundaris són el problema principal de la quimioteràpia. Alguns dels més greus i importants són causats per les toxicitats no selectives tant cardiològiques com pulmonars, que tenen conseqüències difícilment invertibles. Les substàncies que anteriorment hem nombrat afecten tant a les cèl·lules cancerígenes com a les de la resta del cos provocant nàusees, caiguda del cabell o sensació de fatiga. Fins i tot, en alguns casos a la llarga poden provocar l'aparició de leucèmia.

Radioteràpia

En la radioteràpia s'utilitzen dosis altes de radiació per reduir els tumors destruint les cèl·lules cancerígenes en una zona delimitada.

La radiació modifica el DNA de les cèl·lules de manera negativa i irreparable, quan el DNA està prou danyat les cèl·lules deixen de reproduir-se i es moren. Un cop mortes, el cos les descompon i expulsa.

En funció de com s'aplica la radiació, podem distingir entre:

- Radioteràpia externa, s'aplica la radiació a la zona a tractar des de l'exterior del cos amb un accelerador lineal. L'accelerador lineal és una màquina que personalitza els rajos X d'alta energia (radiació) perquè s'ajustin a la forma del tumor i en destrueixin les cèl·lules canceroses sense afectar el teixit sa del voltant.

³⁷ A través de la pell o mucoses.

- Radioteràpia interna o braquiteràpia, es posen materials radioactius dins o aprop del tumor per aplicar-hi la radiació necessitada de manera més directa. Aquests materials poden ser sòlids (llavors) o líquids (fonts).

Tot i anar dirigida cap a les cèl·lules tumorals, una part de la radiació també pot afectar a la resta de cèl·lules sanes, provocant així diversos efectes secundaris. Alguns dels més comuns són la fatiga, el cansament i la pèrdua de cabell.

2.4.2. Tractaments contra el càncer amb nanofàrmacs

Malgrat ser la nanomedicina un àmbit sobre el qual fa relativament poc que s'investiga, són molts els nanofàrmacs que estan esperant ser aprovats per poder sortir al mercat i ser aplicats en tractaments amb humans. No obstant, avui en dia en podem trobar alguns ja aprovats i que s'utilitzen amb certa freqüència en tractaments contra diverses varietats de càncer, Doxil®, Caelyx® i Abraxane® en són exemples.

L'ús de les nanopartícules en l'oncologia es basa principalment en el fenomen de permeabilitat i retenció augmentada (efecte EPR) que es produeix en les àrees més properes al tumor. Quan es forma un tumor sòlid, amb ell també es formen múltiples vasos sanguinis per poder nodrir l'àrea tumoral. Aquesta àrea és caracteritzada per tenir un endoteli³⁸ poc cohesionat i amb obertures o "forats" que permeten el pas de nanopartícules directament als teixits, on queden "encallades" per la seva mida. A més a més, les zones tumorals es caracteritzen per no tenir un bon drenatge limfàtic³⁹ que provoca que triguin més a poder eliminar de la zona les nanopartícules aplicades, allargant així el temps d'efecte dels nanofàrmacs en el teixit tumoral. Aquesta acumulació pasiva de nanopartícules en les cèl·lules cancerígenes causada per l'efecte EPR és coneguda com a vehiculació passiva de fàrmacs.

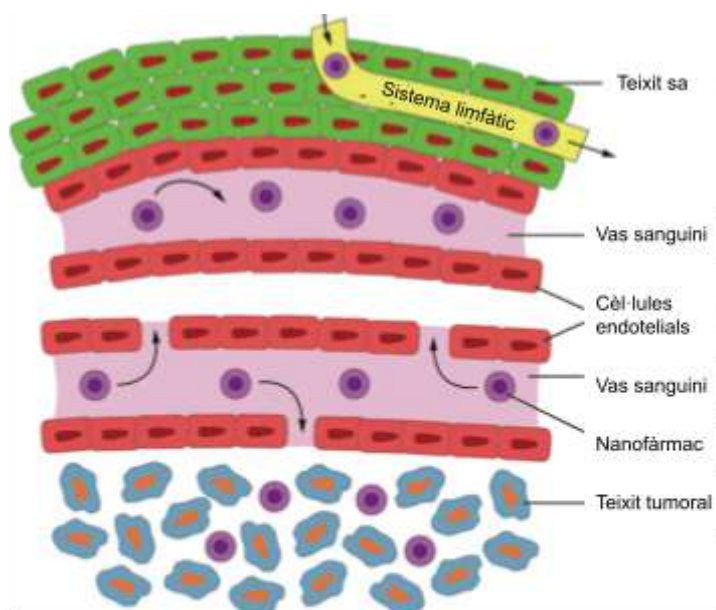


Figura 14. Dibuix esquemàtic de l'efecte EPR i la seva conseqüent vehiculació passiva de fàrmacs.

(Font: Chemical & Engineering News.)

³⁸ Capa que separa els teixits de la sang.

³⁹ Treure i evacuar les substàncies acumulades en l'espai intercel·lular dels teixits.

Existeixen molts tractaments diferents per l'ús de nanofàrmacs contra el càncer, en tots ells es treu benefici a les característiques concretes que les nanopartícules poden aportar.

Teràpia dirigida

Per utilitzar la teràpia dirigida s'han d'investigar els canvis cel·lulars que provoquen el càncer del pacient i, posteriorment, s'han de buscar maneres d'aturar-los o bloquejar-ne els efectes. Normalment a través d'una biòpsia s'extreu una part del tumor per poder estudiar-lo amb més facilitats.

Així doncs, s'utilitzen nanopartícules que, gràcies a la seva mida petita, poden fàcilment entrar a l'interior de les cèl·lules i actuar sobre l'objectiu o blanc. En altres casos també s'utilitzen proteïnes de laboratori (anticossos monoclonals) dissenyades expressament perquè s'adhereixin a zones específiques de les cèl·lules tumorals. Quan s'hi adhereixen, hi deixen anar el fàrmac, les marquen per facilitar-ne al sistema la seva detecció o directament n'aturen el seu creixement.

Totes elles veuen beneficiada la seva acumulació en la zona tumoral per l'efecte EPR.

La teràpia dirigida es pot utilitzar de moltes maneres diferents per aturar el càncer:

- Ajudant al sistema immunitari a destruir les cèl·lules cancerígenes, sigui marcant-les o enfortint el sistema.
- Aturant el creixement de les cèl·lules cancerígenes interferint amb les proteïnes de la seva superfície.
- Aturant les senyals que promouen l'angiogenesis, la formació de nous vasos sanguinis per nodrir el tumor augmentant-ne el seu creixement.
- Portant els fàrmacs que s'utilitzen en altres tractaments com la quimioteràpia fins al teixit tumoral.
- Avançant la mort en les cèl·lules cancerígenes.
- Inhibint les hormones que el tumor necessita per créixer. Alguns càncers com el de mama o el de pròstata necessiten uns hormones concretes pel seu creixement. Amb el tractament s'intenta o bé aturar la producció d'aquestes hormones, o bé que puguin arribar al tumor.

Alguns dels desavantatges de la teràpia dirigida són la resistència que les cèl·lules poden acabar desenvolupant contra els medicaments i la dificultat que suposa trobar un blanc i la manera de tractar-lo en cada pacient.

Els efectes secundaris són força semblants als d'altres tractaments. També s'hi inclouen la diarrea, problemes al fetge o de coagulació de la sang.

Teràpia d'hipertèrmia

Tal i com ens indica el seu nom, la teràpia d'hipertèrmia funciona aplicant calor de fins a 45°C al teixit tumoral per destruir-ne les seves cèl·lules sense afectar o afectant mínimament als teixits sans circumdants.

La calor es pot aplicar de diverses maneres: mitjançant microones produïdes per una sonda, per radiofreqüència⁴⁰, per ecografies, per làsers o per perfusions⁴¹. El paper de les nanopartícules de metall és sovint clau en la hipertèrmia. Introduint-les dins de les cèl·lules cancerígenes aconseguim que, al aplicar rajos X al teixit tractat, les nanopartícules s'escalfin i consegüentment, danyin les cèl·lules.

No s'acostuma a utilitzar la teràpia d'hipertèrmia com a tractament únic, normalment es fa com a tractament complementari a la radioteràpia o a la quimioteràpia per millorar-ne els seus resultats.

Com a efectes secundaris, la teràpia d'hipertèrmia pot produir cremades, llagues o malestar. Concretament en les tècniques de perfusió també es poden produir coàguls de sang, inflamació o sagnats en l'àrea tractada. Cal destacar que la majoria d'aquests efectes no són permanents i, normalment, desapareixen al finalitzar el tractament.

Nanosistemes sensibles al pH

En zones àcides o amb un pH baix s'altera l'expressió genètica de les cèl·lules cancerígenes fent-les més agressives. D'aquesta manera, podem dir que el càncer es torna invasiu i s'estén com a causa de l'acidesa del seu entorn. Mentre que a les zones tumorals el pH és d'entre 5,5 i 6,5, a la resta de l'organisme gira entorn al 7,4.

És per aquest motiu que amb els nanosistemes sensibles al pH es busca l'alliberació del fàrmac específicament a l'entorn àcid del tumor. Per aconseguir-ho, com a membrana de les nanopartícules s'utilitzen materials biodegradables sensibles al canvi de pH. Quan aquests materials detecten l'estímul del pH àcid, es dissolen i alliberen el fàrmac antitumoral.

Els liposomes fets amb lípids lleugerament àcids com l'àcid oleic o el PEG (Polietilè Glicol) carboxilat són exemples d'aquests nanosistemes. A pH neutre (7) els seus materials mantenen l'estructura de bicapa lipídica però, quan el pH baixa, es protonitzen formant cations, es desestabilitzen i consegüentment trenquen l'estructura de bicapa lipídica.

⁴⁰ Aplicant un corrent elèctric controlat a través d'una agulla situada al teixit a tractar. El corrent elèctric provoca un augment de la temperatura que destrueix els nervis.

⁴¹ Calentant la sang o medicaments de quimioteràpia i posteriorment introduint-los al cos.

3. MARC PRÀCTIC

3.1. Introducció al marc pràctic

Vaig realitzar la part pràctica del meu treball als laboratoris de l'Institut de Recerca de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) de l'Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), als quals vaig poder accedir gràcies al programa d'assessoraments a treballs de recerca Argó. Per fer les pràctiques vaig anar-hi durant el juliol del 2022.

Mentre preparava el marc teòric del treball em van sorgir moltes preguntes que poc a poc, vaig poder anar resolent. Així vaig aprendre moltíssimes coses sobre un àmbit que, sent sincera, mesos abans desconeixia totalment. Un cop adquirits tots aquests nous coneixements, ja vaig tenir la capacitat de buscar un problema a investigar a partir del qual poder treballar i fer la part pràctica.

El problema que vaig plantejar va ser el següent:

**Es poden utilitzar els nanofàrmacs per crear nous tractaments més eficaços
contra el càncer?**

Per donar una resposta al problema i comprovar així si realment és possible crear nanopartícules eficients, vaig formular en forma d'hipòtesi tres possibles respostes:

- **Hipòtesi 1:** Potser podem crear nanopartícules que transportin un fàrmac al seu interior (nanofàrmacs).
- **Hipòtesi 2:** Potser podem crear nanofàrmacs que es puguin internalitzar dins de les cèl·lules tumorals.
- **Hipòtesi 3:** Potser els efectes adversos dels nanofàrmacs són menors que els dels fàrmacs convencionals.

Alhora, amb l'objectiu de comprovar la validesa d'aquestes hipòtesis, vaig dissenyar un experiment seguint el mètode científic. Aquest consistiria en la síntesi de nanopartícules de PLGA amb Rodamina per posteriorment, poder-les aplicar en cultius de cèl·lules tumorals i a través de la seva fluorescència, observar-ne la eficiència al entrar o no a les cèl·lules per endocitosi.

Degut a la seva gran biocompatibilitat, el PLGA (Àcid Poli Làctic-co-Glicòlic) va ser el nanomaterial que vaig escollir per fer l'encapsulació.

Com que la Doxorubicina, un fàrmac antitumoral àmpliament utilitzat en la quimioteràpia, és molt perillosa per la seva alta toxicitat; vaig utilitzar la Rodamina com a simulador del fàrmac, un compost químic innocu que sovint s'utilitza com a colorant de seguiment gràcies a la seva fluorescència.

La Rodamina a més a més, té moltes semblances fisiològiques amb la Doxorubicina i, la seva ja esmentada capacitat de fluorescència, facilita completament l'observació dels resultats, els quals ens permetran acceptar o no la hipòtesi 1 com a vàlida.

Per acabar, vaig decidir aplicar les nanopartícules en cèl·lules tumorals pels avantatges i facilitats que la seva immortalitat ens aporta a l'hora de treballar amb elles.

Per tant, crearia dos tipus diferents de nanopartícules de PLGA, unes encapsulant la Rodamina (simulant el fàrmac) i les altres encapsulant aigua (grup control). Això ens permetria saber si tota la fluorescència provenia de la Rodamina o si, en cas contrari, el PLGA també tenia certa fluorescència. Les nanopartícules amb o sense Rodamina serien la variable independent.

Per saber l'eficiència d'encapsulació de la Rodamina dins les nanopartícules, amb l'ajuda d'un fluorímetre calcularia quin percentatge de la Rodamina utilitzada en la primera fase de l'encapsulació seguiria present en les nanopartícules finals.

Un cop sintetitzades les dues variants de nanopartícules de PLGA, les aplicaria als cultius cel·lulars. Tindria preparats tres cultius cel·lulars en exactament les mateixes condicions. El primer cultiu seria tractat amb les nanopartícules de PLGA amb Rodamina, el segon amb les nanopartícules de PLGA amb aigua, i el tercer em faria de grup control (sense tractar). La funció del grup control en aquest cas seria descartar qualsevol fluorescència provinent de les pròpies cèl·lules tumorals.

Passades unes hores en les que els nanofàrmacs ja haurien hagut d'entrar a les cèl·lules per endocitosi, netejaria els cultius cel·lulars eliminant les restes i obtenint solament les cèl·lules amb les nanopartícules internalitzades.

Finalment, per observar si hi hauria hagut una bona internalització de les nanopartícules amb Rodamina i poder rebutjar o acceptar la hipòtesi 2, agafaria una mostra de cada cultiu i l'observaria amb un microscopi de fluorescència amb rajos UV. Les cèl·lules amb o sense presència de fluorescència serien la variable dependent.

3.2. Materials

Substàncies



Aigua destil·lada.

Aigua pràcticament sense impureses netejada a base de destil·lacions.



Cèl·lules tumorals en medi de cultiu.

Cèl·lules amb una alta taxa de proliferació conservades en un líquid que les alimenta i protegeix. Es guarden en un flascó per cultiu cel·lular.



DCM (Diclorometà).

Compost orgànic CH_2Cl_2 sovint utilitzat com a dissolvent.



Etanol.

Alcohol etílic $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. Utilitzat per esterilitzar.



Gel.

Aigua en estat sòlid. Congelada per sota dels 0°C .



Medi de cultiu.

Líquid dissenyat per afavorir el creixement i la reproducció de microorganismes, cèl·lules o plantes petites.



Metanol conservat a -20°C .

Alcohol metílic CH_3OH (CH_4O).



NaCl (Sal comuna).

Compost químic.



PLGA (Àcid Poli Làctic-co-Glicòlic).

Polímer biodegradable i biocompatible.



PVA (Alcohol de Polivinil) 4%.

Polímer sintètic soluble en aigua. També fa la funció de surfactant.



Rodamina en concentració d' 1mg / mL (RHO).

Compost químic fluorescent sovint utilitzat com a substància de seguiment en líquids.



Solució PBS.

Solució tampó de clorur de sodi i fosfat de sodi. Sovint utilitzada per transportar, netejar o diluir cèl·lules.



Span 80.

Surfactant, baixa la tensió superficial de les solucions provocant que les emulsions durin més estona.



Tripsina.

Proteasa de serina. Degrada certes proteïnes.

Estris de laboratori



3 Cobreobjectes.

Plaques de vidre molt primes rectangulars. Utilitzades per cobrir les preparacions evitant embrutar els objectius del microscopi i les mostres a observar.



Flascó liofilitzador.

Envàs en el que el liofilitzador fa la liofilització.



Flascó per cultiu cel·lular.

Envàs adequat pel creixement de cèl·lules en la seva superfície.



2 Mosques magnètiques.

Barres magnètiques petites que es posen dins de les solucions sobre l'agitador per barrejar-les.



Paper d'alumini.

Fulles primes d'alumini utilitzades per cobrir objectes.



Parafilm.

Làmines d'un material semi transparent, flexible i resistent a l'aigua. Utilitzat per cobrir objectes.



Pinces.

Eina que serveix per agafar i moure objectes amb exactitud i facilitat.



Pintaungles.

Esmalt per pintar les ungles que utilitzarem per segellar els cobreobjectes a sobre dels portaobjectes.



Pipetes Pasteur.

Tubs de vidre llargs, prims i cònics. Tenen la mateixa funció que el pipetejador elèctric però s'utilitzen manualment i amb substàncies més grans.



3 Plaques de Petri.

Envasos rodons de vidre amb tapa. Utilitzats per cultivar-hi cèl·lules.



3 Portaobjectes.

Plaques de vidre rectangulars més grans que els cobreobjectes. S'hi dipositen les mostres o preparacions a observar.



Puntes pel pipetejador elèctric.

Puntes que es col·loquen al pipetejador per poder-lo utilitzar. És important utilitzar una punta nova i neta cada vegada que es canvia de substància.



Retolador permanent.

Instrument d'escriptura utilitzat per marcar les mostres de forma permanent.



2 Tubs de centrifuga.

Tubs de plàstic sovint utilitzats per emmagatzemar o centrifugar substàncies.



2 Tubs Eppendorf.

Petits tubs de plàstic amb una tapa enganxada al cos. Utilitzats per guardar o centrifugar les substàncies.



Vas de precipitats.

Contenedor de vidre utilitzat per mantenir líquids.



4 Vials.

Flascons petits de vidre utilitzats per emmagatzemar substàncies.

Aparells



Agitador magnètic.

Aparell que fa girar la mosca magnètica generant un camp gravitatori.



Agitador Vórtex.

Aparell utilitzat per mesclar solucions agitant-les.



Bàscula analítica.

Bàscula de laboratori dissenyada per pesar masses menors a 1g.



Bomba de buit.

Aparell que fa el buit. S'utilitza per xuclar substàncies.



Cabina de bioseguretat.

Espai amb una barrera de contenció feta amb un flux d'aire filtrat que permet treballar amb mostres en una zona esterilitzada sense contaminar-les.



Centrifugadora.

Aparell que posa les mostres en rotació per separar-ne amb la força centrífuga els seus components en funció de la seva densitat.



Congelador.

Aparell que manté substàncies congelades a temperatures per sota dels 0°C.



Encenedor.

Aparell que serveix per encendre a través d'una flama.



Fluorímetre.

Aparell que mesura la fluorescència generada per una mostra.



Incubadora.

Aparell utilitzat per crear un ambient amb unes característiques d'humitat i temperatura determinades.



Liofilitzador.

Aparell que fa la liofilització: deshidrata una mostra congelant-la i sublimant-la al buit.



Microscopi de fluorescència.

Microscopi òptic que utilitza la fluorescència per generar una imatge.



Pipetejador elèctric.

Aparell utilitzat per agafar i deixar anar substàncies en mides molt petites i exactes.



Sonicador amb la punta microtip.

Aparell que barreja les substàncies a través de la sonicació, aplicant ultrasons amb una agulla.

3.3. Mesures preventives

Durant tot el procediment utilitzarem una bata de laboratori i guants de silicona com a mesura de seguretat. Aquesta mesura serà molt important sobretot al tractar amb els cultius cel·lulars per evitar contaminar-los.

També amb l'objectiu d'evitar contaminacions, tots els procediments en els que s'utilitzin cultius cel·lulars els farem en una cabina de bioseguretat. Dins de les cabines de bioseguretat l'aire és estèril i les bates que utilitzarem seran blaves per diferenciar-les de les bates del laboratori.



Figura 15. Cabina de bioseguretat preparada amb les pipetes, les pinces i el pipetejador esterilitzats.

3.4. Procediment

3.4.1. Síntesi de nanopartícules de PLGA

Preparació de les 3 fases

Per sintetitzar les nanopartícules utilitzarem la tècnica “*Water in Oil in Water*”⁴² (W/O/W), la qual es basa en una doble emulsió i l’evaporació del solvent. En aquesta tècnica prepararem tres fases o solucions immiscibles⁴³.

- Fase interna aquosa (W1), amb el producte a encapsular (Rodamina).
- Fase intermitja oliosa (O1), amb el polímer (PLGA) en forma de solució (amb diclorometà (DCM) com a dissolvent) i el surfactant⁴⁴ intern (Span 80).
- Fase externa aquosa (W2), amb el surfactant extern (Alcohol de polivinil (PVA))

Fase interna aquosa (W1)

1. A partir de la solució Stock de Rodamina amb una concentració de 10mg / mL, preparem 100µL de Rodamina amb una concentració d’ 1mg / mL.

Per tant, amb un pipetejador posem 90µL d’aigua destil·lada i 10µL de Rodamina en un tub Eppendorf.

Diluir la Rodamina per disminuir els senyals de fluorescència que donarà i així, poder-los mesurar amb el fluorímetre.

2. Per facilitar la dissolució de la Rodamina en l’aigua, agitem la solució manualment fins aconseguir una consistència homogènia.
3. Finalment preparem la fase interna del grup control, la qual només constarà d’aigua destil·lada. Amb l’ajuda del pipetejador posem 100µL d’aigua destil·lada en un tub Eppendorf.

Fase intermitja oliosa (O1)

1. Pesem 25mg de PLGA amb una bàscula analítica i els col·loquem en un vial.
2. Amb un pipetejador afegim 750µL de DCM dins del vial amb el PLGA .
Quan el DCM s’evapori, el PLGA acabarà sent la capa exterior de les nostres nanopartícules.

⁴² Aquest nom és degut a que la tècnica consisteix en posar una solució aquosa dins d’una solució oliosa que alhora, es troba dins d’una solució aquosa.

⁴³ Sense capacitat de barrejar-se o mesclar-se.

⁴⁴ Substància que permet aconseguir o mantenir una emulsió durant més temps del que seria normal baixant la tensió superficial.

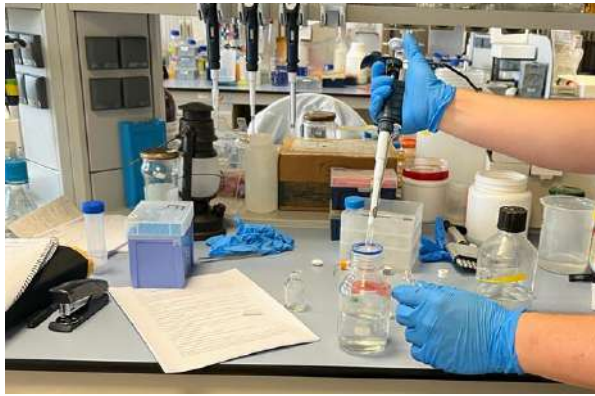


Figura 16. Agafant amb el pipetejador 750µL de diclorometà.

3. També amb un pipetejador, afegim 30µL de Span 80 a la solució.
El Span 80 allargarà la durada de l'emulsió, facilitant la creació de les nanopartícules.
4. Per aconseguir la dissolució completa del PLGA i el Span 80 en el diclorometà, afegim una mosca magnètica dins del vial i el mantenim en agitació suau durant 1 minut.
5. Repetim el procés per fer la fase intermitja del grup control.



Figura 17. Els dos vials amb les solucions de la fase intermitja en agitació amb les mosques magnètiques.

Fase externa aquosa (W2)

1. Hem de preparar una solució amb 9,4mL de PVA 2% i 9,4mL de NaCl (sal comuna) 1M. Les solucions Stock són de PVA 4% i NaCl 2M, per tant amb el pipetejador n'agafem la meitat (4,7mL de PVA 4% i 4,7mL de NaCl 2M) i les introduïrem en un vial.
El PVA també és un surfactant i la seva funció serà la mateixa que la del Span 80, allargar la durada de l'emulsió. El NaCl serveix per augmentar l'eficàcia d'encapsulació al fer les nanopartícules.
2. Repetim el procés per fer la fase externa del grup control.



Figura 18. Agafant amb el pipetejador 4,7mL de PVA.



Figura 19. Agafant amb el pipetejador 4,7 mL de NaCl.

Doble emulsió per sonicació

Un cop fetes les tres fases, les barrejarem en una doble emulsió per sonicació, aplicant ultrasons per agitar les partícules.

Després de la primera emulsió, degut a les diferents hidrofilitats⁴⁵ de les fases, es formen unes partícules nanomètriques de forma esfèrica amb la fase W1 dins.

En la segona emulsió, feta també per sonicació, es tornen a formar unes partícules nanomètriques de forma esfèrica amb les partícules resultants de la primera emulsió dins.

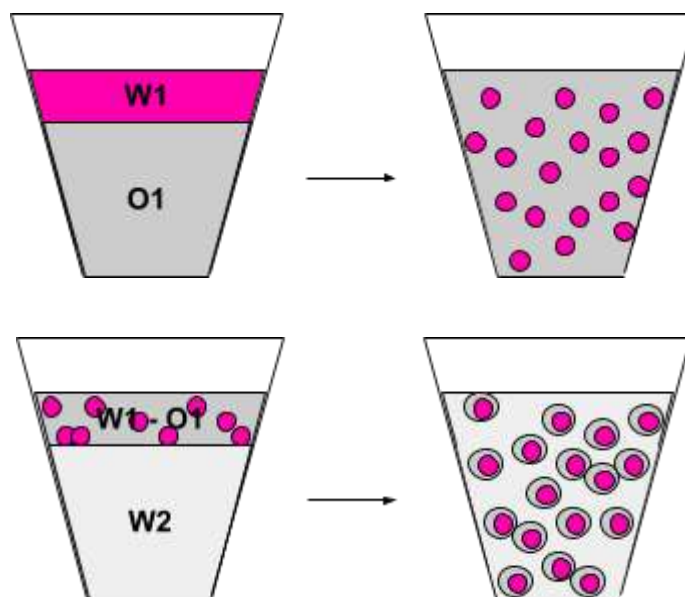


Figura 20. Dibuix esquemàtic de la primera i segona emulsió.

⁴⁵ Capacitat d'absorbir o repel·lir l'aigua.

Obtindrem unes nanopartícules amb la fase interna (W1) dins (Rodamina o aigua en el cas del grup control) i PLGA amb DCM com a capa externa. El PVA, el NaCl i el Span 80 quedaran en el medi.

Hem de tenir en compte que la sonicació provoca un ràpid augment de la temperatura capaç de desnaturalitzar certes proteïnes que pot distorsionar la formació de les nanopartícules. Per aquest motiu durant les sonicacions mantindrem les emulsions en un vas de precipitats amb gel.



Figura 21. Les tres fases en gel preparades per anar cap al sonicador.

Primera emulsió (W1 - O1)

1. Barregem 75 μ L de les solucions W1 a les solucions O1. Guardem els sobrants de la fase W1 per posteriorment poder calcular l'encapsulació de la Rodamina.
2. Amb la punta "microtip" mesclarem per sonicació durant 90 segons a un 25% d'amplitud. Com més amplitud i menys longitud tinguin els ultrasons que apliquem més alta serà la força que produiran.
3. Repetim el procés amb el grup control.



Figura 22. Sonicador amb la punta "microtip" col·locada.



Figura 23. Vas de precipitats amb gel i les fases W1 i O1 de la mostra amb Rodamina en un vial a punt per ser sonicades.



Figura 24. Fases W1 i O1 del grup control dins del sonicador.

Segona emulsió (W1 - O1 - W2)

1. Aboquem la solució homogeneïtzada resultant de la primera emulsió en la solució W2.
2. Amb la punta "microtip" tornem a mesclar per sonicació durant 90 segons a un 25% d'amplitud.
3. Repetim el procés amb el grup control.



Figura 25. Vial amb les nanopartícules amb Rodamina just després de la segona emulsió.



Figura 26. Vial amb les nanopartícules del grup control just després de la segona emulsió.

Evaporació del solvent

Per aconseguir la polimerització⁴⁶ del PLGA en forma esfèrica amb la W1 dins, necessitarem que el DCM (dissolvent orgànic del PLGA) s'evapori. Gràcies a l'alta volatilitat del DCM la seva evaporació és molt senzilla:

1. Emboliquem els vials amb paper d'alumini per evitar el desgast de la fluorescència de la Rodamina amb el contacte amb la llum. El vial amb el grup control també el taparem per mantenir-los tots dos amb les mateixes condicions.
2. Fem forats a les parts superiors del paper d'alumini per deixar evaporar el DCM.
3. Afegim una mosca magnètica a les solucions obtingudes en la segona emulsió i mantenim en agitació suau durant un mínim de 4 hores.



Figura 27. Vials amb les nanopartícules sobre l'agitador abans de posar-hi el paper d'alumini.



Figura 28. Vials amb les nanopartícules sobre l'agitador embolicats amb paper d'alumini.

Rentat de les nanopartícules

Feta l'evaporació del DCM ja tindrem les nanopartícules fetes, només faltaria fer uns quants rentats amb la centrífuga per netejar el medi en el que es troben.

1. Transferim les nanopartícules dels vials a dos tubs de centrífuga.
2. Amb la centrifugadora fem una primera centrifugació a 30.000 G (30.000 vegades la gravetat de la Terra) durant 45 minuts a 4°C. Per fer les centrifugacions s'ha de repartir el pes de manera equitativa dins la centrifugadora.
3. Després de la centrifugació les nanopartícules queden precipitades sota el sobrenedant. Extraïem 1mL del sobrenedant dels dos tipus de nanopartícules i els guardem per posteriorment, juntament amb les sobres de la fase W1, poder calcular el percentatge d'encapsulació de la Rodamina. El sobrenedant, entre altres coses, conté tota la Rodamina que no s'ha encapsulat correctament.

⁴⁶ Procés químic a través del que els reactius (monòmers amb un baix pes molecular) s'agrupen entre si químicament formant un polímer (molècula de gran pes).



Figura 29. Centrifugadora amb les nanopartícules dins dels dos tubs a punt per ser centrifugades.

4. Manualment buidem la resta de sobrenedant dels tubs de centrifuga i hi afegim 9mL d'aigua destil·lada en cadascun.
5. Amb l'ajuda d'un agitador Vórtex resuspenem les nanopartícules dins dels tubs.
6. Centrifuguem les mostres un altre cop amb la centrifugadora durant 60 minuts a 30.000 G a 4°C.



Figura 30. Paràmetres aplicats a la centrifugadora, com podem observar: una força de 30.000 G, durant 60 minuts i a 4°C.

7. Repetim 3 vegades el procés de buidar el sobrenedant, afegir 9mL d'aigua destil·lada, resuspendre les nanopartícules i centrifugar.
8. Finalment, ajustem el volum de les nanopartícules a 1mL amb aigua destil·lada. Per conservar-les, les guardem a 4°C.

Quantificació de les nanopartícules

Per quantificar les nanopartícules haurem de buscar en quina concentració es troben. Per fer-ho, n'agafarem una mostra i la liofilitzarem⁴⁷.

⁴⁷ Procés en el que es congela una mostra per posteriorment deshidratar-la per sublimació fent-hi el buit.

1. Amb una bàscula analítica pesem dos tubs Eppendorf buits per separat i apuntem el seu pes amb la màxima exactitud possible (els anomenarem Tub Eppendorf RHO i Tub Eppendorf Ø)



Figura 31. Bàscula analítica pesant un tub Eppendorf buit.

2. Amb un pipetejador afegim 100µL de les solucions amb les nanopartícules als tubs Eppendorf. En un tub hi posem el grup control i en l'altre les nanopartícules amb Rodamina.
3. Tapem els tubs amb parafilm, foradem el parafilm per deixar evaporar l'aigua i els col·loquem en un flascó liofilitzador.
4. Congelem el flascó amb els tubs a -80°C.
5. Liofilitzem les dues mostres fins que tota l'aigua s'hagi evaporat, una nit serà suficient.
6. Tornem a pesar els tubs Eppendorf amb les nanopartícules liofilitzades dins (els anomenarem Tub Eppendorf np RHO liofilitzades i Tub Eppendorf np Ø liofilitzades).
7. Per calcular la concentració seguim la següent fórmula:

$$\text{Concentració de les nanopartícules} = \frac{\text{Pes de la mostra liofilitzada} - \text{Pes inicial del tub Eppendorf}}{\text{Volum de la mostra}}$$



Figura 32. Liofilitzador liofilitzant els tubs Eppendorf.



Figura 33. Tubs Eppendorf amb les nanopartícules liofilitzades. A l'esquerra les del grup control i a la dreta les que contenen Rodamina.

3.4.2. Aplicació de les nanopartícules de PLGA en cultius de cèl·lules tumorals

Preparació dels cultius cel·lulars

Abans d'aplicar-hi les nanopartícules, haurem de preparar els cultius de les cèl·lules que volem tractar. Prepararem 3 cultius que mantindrem en les mateixes condicions de temperatura, llum, pressió... Així evitarem que aquestes influeixin en els resultats del nostre experiment.

1. Agafem les cèl·lules tumorals, les quals es troben en un flascó amb medi de cultiu conservat vora els 36°C en una incubadora.



Figura 34. Observant a través d'un microscopi òptic el cultiu cel·lular amb les cèl·lules tumorals de càncer de colon abans de ser tractades.

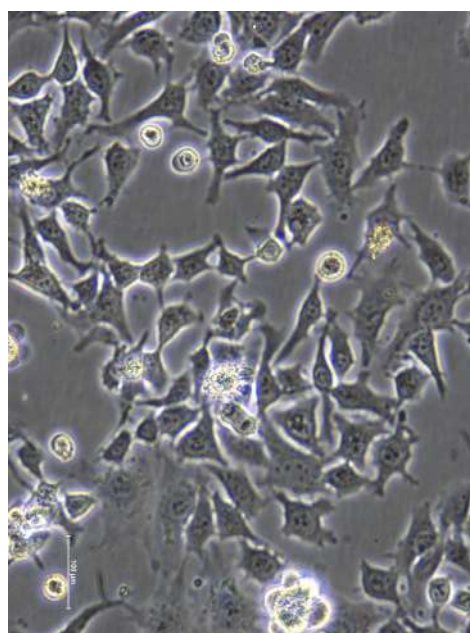


Figura 35. Cèl·lules tumorals de càncer de colon abans de ser tractades. Observades amb un microscopi òptic. Augment x400.

2. Com que treballarem amb organismes que no ens interessa contaminar, seguirem el procés en una cabina de bioseguretat.
3. Per posteriorment poder tractar les cèl·lules amb tripsina, hem de treure'ls-hi el medi de cultiu. La funció del medi de cultiu és alimentar i protegir les cèl·lules; per aquest motiu conté, entre altres, un inhibidor de tripsina.

Per extreure el medi del flascó utilitzem una pipeta pasteur esterilitzada i connectada a una bomba de buit. Amb la pipeta xuclarem el medi de cultiu.



Figura 36. Dins de la cabina de bioseguretat extraient el medi de cultiu del flascó amb les cèl·lules tumorals.

4. Ràpidament, per evitar que les cèl·lules sense medi s'assequin o danyin, i per acabar de netejar-les, posem 10mL de solució PBS⁴⁸ al flascó amb l'ajuda d'un pipetejador esterilitzat.
5. Un altre cop, utilitzem una pipeta esterilitzada connectada a una bomba de buit per xuclar la solució PBS.



Figura 37. Dins de la cabina de bioseguretat acabant d'extreure la solució PBS.

6. Les cèl·lules estan adherides a la superfície del flascó. Per trencar aquest ancoratge, amb un pipetejador esterilitzat hi afegim 3mL tripsina. La tripsina és una proteïna que degrada les proteïnes que enganxen les cèl·lules a la superfície del flascó, provocant que aquestes es desprenguin.
7. Deixem actuar la tripsina 5 minuts amb les cèl·lules. Per deixar-la actuar tornem a guardar el flascó dins la incubadora a 37°C. Si deixem la tripsina amb les cèl·lules més estona de la ja esmentada, haurà acabat de degradar les proteïnes que volíem

⁴⁸ Solució tampó que conté clorur de sodi i fosfat de sodi. Té una funció isotònica respecte a les cèl·lules i ajuda a mantenir-les en un pH constant i no tòxic. S'utilitza sovint per transportar, netejar o diluir cèl·lules.

degradar i començarà a degradar-ne d'altres que poden danyar les cèl·lules fins al punt de trencar les seves membranes; per aquest motiu caldrà vigilar bé el temps.



Figura 38. Flascó amb les cèl·lules en tripsina dins de la incubadora programada a 37°C.

8. Amb un pipetejador esterilitzat, passats els 5 minuts introduïm al flascó 7mL de medi de cultiu per inhibir i neutralitzar la tripsina.
9. Dels 10 mL que tenim de medi de cultiu amb cèl·lules només n'utilitzarem el 70%. Per tant, en guardem 3mL en un flascó on hi afegim 10mL de medi de cultiu perquè puguin seguir alimentant-se, creixent i reproduint-se. Aquest flascó el guardem a la incubadora a uns 36°C.
10. Diluim els 7mL de medi amb cèl·lules restants en una dissolució 1:10 amb aigua destil·lada. Així fem disminuir la concentració de cèl·lules en el medi i en facilitem la seva observació amb el microscopi.
11. Esterilitzem tres cobreobjectes de vidre flamejant-los amb alcohol etílic. Per flamejar-los els mullem en alcohol i posteriorment els cremem.



Figura 39. Esterilitzant un cobreobjectes.

12. Col·loquem amb unes pinces esterilitzades cada cobreobjectes en una placa de Petri de cultiu diferent.
13. Amb un pipetejador elèctric esterilitzat posem 1,5mL del medi de cultiu amb cèl·lules en cadascuna de les tres plaques de Petri on hem deixat els cobreobjectes.



Figura 40. Plaques de Petri, tres d'elles preparades amb un cobreobjectes esterilitzat dins.

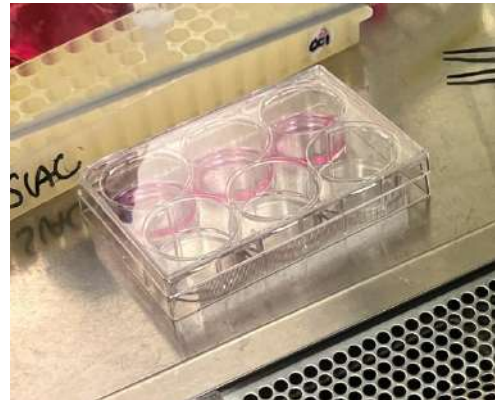


Figura 41. Plaques de Petri, tres d'elles amb el cobreobjectes i 1,5mL del medi de cultiu amb cèl·lules tumorals.

14. Finalment, deixem les plaques a la incubadora tota una nit perquè les cèl·lules puguin seguir creixent en una temperatura aproximada de 36°C i estiguin preparades per treballar amb elles a l'endemà.

Aplicació de les nanopartícules de PLGA als cultius cel·lulars

Un cop preparats els cultius ja els podem tractar amb les nanopartícules que hem sintetitzat. Tenim tres cultius dels quals només en tractarem dos, un amb les nanopartícules de PLGA amb Rodamina encapsulada i un amb les nanopartícules de PLGA amb aigua destil·lada encapsulada com a grup control. No tractem el tercer cultiu perquè també ens servirà de grup control.

1. Traiem les tres plaques de Petri amb els cultius cel·lulars de la incubadora i els tubs amb les nanopartícules de la nevera. Ho portem tot a la cabina de bioseguretat, on seguirem amb el procés.
2. Amb l'ajuda d'un pipetejador esterilitzat extraiem l'aigua destil·lada de cada tub amb nanopartícules i hi afegim 1mL de medi de cultiu.



Figura 42. Agafant 1mL del medi de cultiu amb el pipetejador dins de la cabina de bioseguretat.

3. Agitem el tubs per resuspendre les nanopartícules dins del medi de cultiu.
4. Extraiem amb el pipetejador el medi de cultiu de dues de les tres plaques de Petri.
5. També amb el pipetejador, afegim 1mL de medi de cultiu amb les nanopartícules de PLGA amb Rodamina a la primera placa de Petri. A la segona placa de Petri hi afegim 1mL del medi de cultiu amb les nanopartícules de PLGA amb aigua destil·lada.
6. Tornem a guardar les tres plaques de Petri a la incubadora vora els 36°C i les deixem reposar tota la nit perquè les cèl·lules puguin internalitzar les nanopartícules a través d'endocitosis.



Figura 43. Incubadora amb les plaques de Petri i les nanopartícules a punt per a reposar tota la nit.

Preparació dels portaobjectes

Després de deixar actuar les cèl·lules amb les nanopartícules durant una nit ja podem observar els resultats del nostre experiment. Per mirar els resultats amb el microscopi, abans haurem de preparar els portaobjectes posant-hi els cobreobjectes amb les cèl·lules prèviament netejats i fixats.

1. Traiem les plaques de Petri amb els cultius cel·lulars de la incubadora i els portem a la cabina de bioseguretat, on seguirem amb el procés.
2. Amb l'ajuda d'un pipetejador extraiem el medi sobrant de les tres plaques de Petri. Dos d'aquestes en el medi sobrant contindran restes de les nanopartícules que no s'han internalitzat correctament.



Figura 44. Plaques de Petri just abans d'extreure'ls-hi el medi sobrant.

3. També amb el pipetejador afegim 1mL de solució PBS en cada placa de Petri per acabar-les de netejar.
4. Deixem reposar la solució PBS 3 minuts i amb un pipetejador l'extraiem.
5. Afegim dues gotes de metanol conservat a -20°C en cada placa de Petri per fixar-ne les cèl·lules. No tirarem les gotes directament sobre els cobreobjectes perquè la força i el fred sobtat podrien moure o danyar les cèl·lules. Posarem les gotes a la vora de les plaques de Petri i escamparem el metanol movent-les manualment.
6. Tornem a afegir amb el pipetejador 1mL de solució PBS en cada placa de Petri, movent-la la repartim bé per tota la superfície i l'extraiem.



Figura 45. Afegint 1mL de solució PBS amb el pipetejador a les plaques de Petri.

7. Amb unes pinces traiem amb molta cura els cobreobjectes fora de les plaques de Petri. A la superfície dels cobreobjectes hi haurà fixades les cèl·lules.
8. Preparem 3 portaobjectes sobre la taula de treball.
9. Sobre cada portaobjectes hi col·loquem un cobreobjectes girant-lo de manera que la superfície del cobreobjectes on hi ha les cèl·lules quedi en contacte amb el portaobjectes.
10. Amb un pintaungles pintem el voltant dels cobreobjectes per segellar-los sobre els portaobjectes. Els deixem assecar i ja estaran llestos per mirar-los amb el microscopi de fluorescència.

Comentaré l'observació a l'apartat 3.5.2 de Resultats i anàlisi dels resultats.

3.4.3. Càlcul de l'eficiència d'encapsulació de la Rodamina

Per calcular l'eficiència d'encapsulació de la Rodamina en les nanopartícules que hem sintetitzat utilitzarem un fluorímetre. Amb el fluorímetre mesurarem la fluorescència de la fase interna W1 amb Rodamina i del sobrenedant del primer rentat de les nanopartícules amb Rodamina, que contindrà les nanopartícules que no s'han encapsulat.

Per assegurar-nos que tota la fluorescència que mesurem és provocada per la Rodamina, també mesurarem com a blanc la fluorescència de la fase interna W1 amb aigua i la del sobrenedant del primer rentat de les nanopartícules amb aigua. Així veurem i podrem restar la part de la fluorescència que és pròpia de les substàncies sense haver-hi Rodamina.

1. Diluïm les quatre mostres (W1 amb Rodamina, W1 amb aigua, sobrenedant Rodamina i sobrenedant aigua) a 1:1000 en aigua destil·lada per baixar la fluorescència de la Rodamina fins que es trobi en uns paràmetres que el fluorímetre pugui calcular.



Figura 46. Agafant aigua destil·lada amb el pipetejador per diluir les mostres.

2. Posem 1mL de les fases diluïdes W1 amb Rodamina i W1 amb aigua al fluorímetre i apuntem la intensitat de fluorescència que el fluorímetre ens proporciona per cadascuna d'elles (les anomenarem W1 RHO i W1 Ø).
3. Posem 1mL dels sobrenedants amb i sense Rodamina diluïts al fluorímetre i apuntem la intensitat de fluorescència que el fluorímetre ens proporciona per cadascun d'ells (els anomenarem sobrenedant RHO i sobrenedant Ø).
4. Seguim les següents fórmules per trobar la fluorescència real provocada per la Rodamina en la W1 i en el sobrenedant.

$$\text{Fluorescència real W1} = (W1 \text{ RHO} - W1 \text{ Ø}) \times 1.000 \times 0,075$$

$$\text{Fluorescència real sobrenedant} = (\text{sn. RHO} - \text{sn. Ø}) \times 1.000 \times 9$$

Primer restem la fluorescència de les nanopartícules sense Rodamina de les de Rodamina. Després ho multipliquem per 1.000 per compensar la dilució i ho multipliquem pel volum (en mL) en el que es trobava al sintetitzar les nanopartícules.

5. Finalment per trobar el percentatge d'eficiència d'encapsulació seguim la fórmula següent:

$$\text{Eficiència d'encapsulació} = \frac{(\text{Fluorescència W1} - \text{Fluorescència sobrenedant})}{\text{Fluorescència W1}} \times 100$$

3.5. Resultats i anàlisi dels resultats

3.5.1. Síntesi de nanopartícules de PLGA

Seguint el procediment vaig poder crear dos tipus de nanopartícules de PLGA, unes internalitzant Rodamina i les altres internalitzant aigua destil·lada. Es poden diferenciar entre elles pel característic color rosa de la Rodamina.



Figura 47. Tubs Eppendorf amb les nanopartícules liofilitzades. A l'esquerra les del grup control i a la dreta les que contenen Rodamina.

Quantificació

Per poder quantificar les nanopartícules creades, vaig liofilitzar-les i en vaig calcular la concentració seguint la fórmula ja explicada en el procediment:

$$\text{Concentració de les nanopartícules} = \frac{\text{Pes de la mostra liofilitzada} - \text{Pes inicial del tub Eppendorf}}{\text{Volum de la mostra}}$$

Les quantitats que vaig mesurar són les següents:

- Pes inicial del tub Eppendorf RHO: 477,890mg
- Pes del tub Eppendorf np RHO liofilitzades: 479,370mg
- Pes inicial del tub Eppendorf Ø: 488,980mg
- Pes del tub Eppendorf np Ø liofilitzades: 491,100mg
- Volum de cada mostra: 100µL = 0,1mL

Per tant,

$$\text{Concentració de les np RHO} = \frac{479,370\text{mg} - 477,890\text{mg}}{0,1\text{mL}} = 14,8 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Concentració de les np Ø} = \frac{491,100\text{mg} - 488,980\text{mg}}{0,1\text{mL}} = 21,2 \text{ mg/mL}$$

Tot i sintetitzar-les en les mateixes quantitats, en les nanopartícules amb Rodamina la concentració ha estat menor que en les nanopartícules amb aigua destil·lada. Així doncs, en el mateix volum de mostra hi haurà més nanopartícules amb aigua destil·lada que

nanopartícules amb Rodamina. Aquesta diferència probablement és causada per les diferències fisiològiques entre l'aigua destil·lada i la Rodamina.

En els tractaments de quimioteràpia aprovats on s'utilitzen nanopartícules de Caelyx® liposomal pegilada amb Doxorubicina encapsulada, la concentració d'aquestes és de 2 mg/mL. La dosi de Doxorubicina empleada depèn de la mida i l'estat de cada individu, es recomana aplicar dosis d'entre 20 i 50 mg/m² cada 3 o 4 setmanes. Per injectar les dosis al pacient, abans es dilueixen en sèrum fisiològic.

És important quantificar les nanopartícules per poder-ne saber la concentració i en consegüent, poder calcular bé les quantitats que s'han d'aplicar a cada pacient de forma individual i personalitzada.

Mida

Els nanofàrmacs, com bé ens diu el seu nom, es particularitzen per les seves dimensions nanomètriques. Per saber la mida de les nanopartícules sintetitzades necessitem l'ajuda d'un microscopi electrònic de rastreig, al qual és molt difícil obtenir accés.

Tot i així, des de l'Institut de Recerca de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) de la UAB em van poder proporcionar imatges fetes amb un microscopi electrònic de rastreig d'unes nanopartícules de PLGA sintetitzades seguint i utilitzant el mateix procediment i substàncies que vaig fer servir jo. Per tant, tot i no ser les meves pròpies nanopartícules les fotografiades, el resultat hauria de ser pràcticament el mateix.

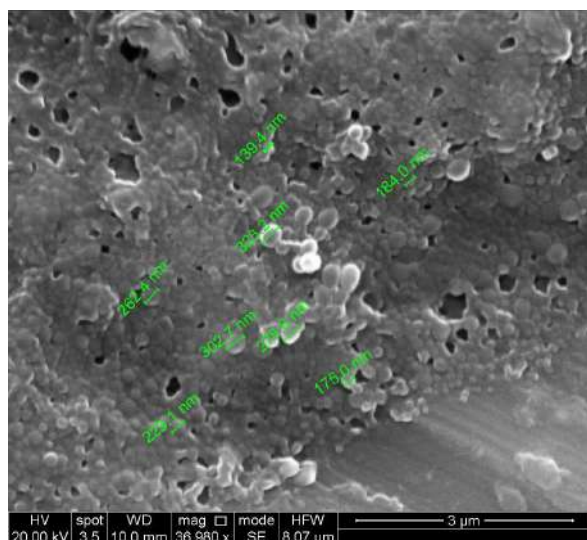


Figura 48. Nanopartícules de PLGA amb Rodamina. Fotografiades amb un microscopi electrònic de rastreig. Augment x36.980. (Font: IBB UAB)

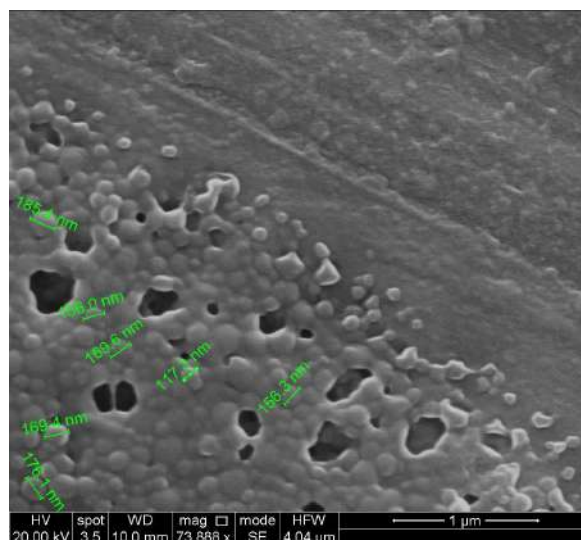


Figura 49. Nanopartícules de PLGA amb Rodamina. Fotografiades amb un microscopi electrònic de rastreig. Augment x73.888. (Font: IBB UAB)

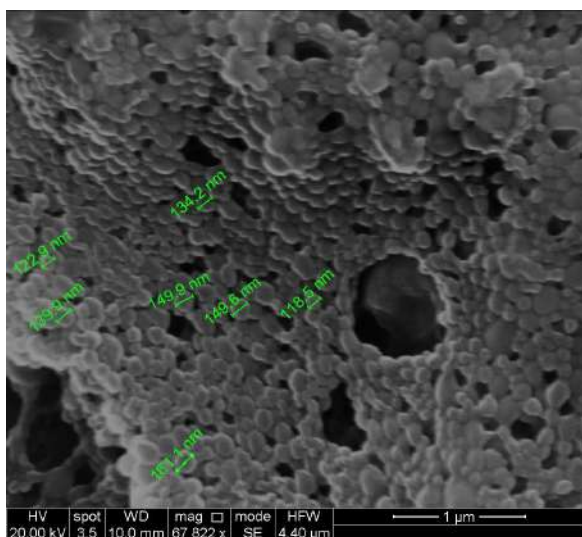


Figura 50. Nanopartícules de PLGA amb aigua destil·lada. Fotografiades amb un microscopi electrònic de rastreig. Augment x67.822. (Font: IBB UAB)

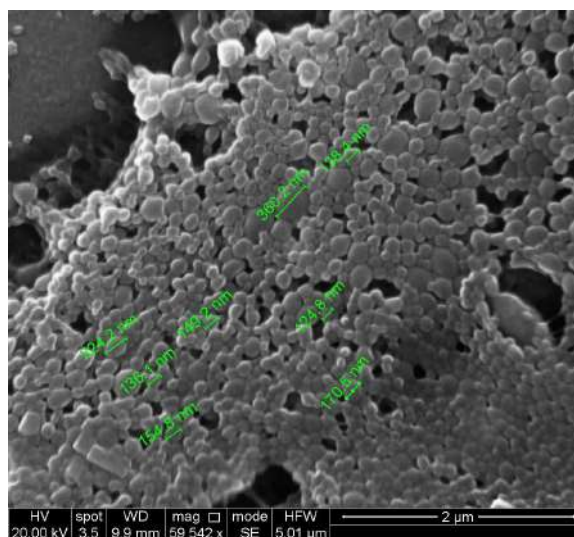


Figura 51. Nanopartícules de PLGA amb aigua destil·lada. Fotografiades amb un microscopi electrònic de rastreig. Augment x59.542. (Font: IBB UAB)

En les imatges, al ser en blanc i negre, no es pot diferenciar entre les nanopartícules amb Rodamina i les nanopartícules amb aigua destil·lada. Les primeres dues són amb Rodamina i les altres dues amb aigua destil·lada.

Com podem observar escrit en verd sobre les nanopartícules, la seva mida oscil·la entre els 100 i 200 nm, fins i tot arribant als 300 nm en alguns casos puntuals. Així doncs, podem estimar que les nostres nanopartícules també faran entre 100 i 200 nm.

Tal i com ja vam veure dins del marc teòric, a l'apartat 2.3.1. sobre les característiques dels nanofàrmacs, la mida ideal per les nanopartícules es troba entre els 5 i els 200 nm, per tant la grandària de les nanopartícules que hem sintetitzat ens seria perfecta per aplicar-les en humans i obtenir-ne una bona distribució.

3.5.2. Internalització de les nanopartícules de PLGA

Un cop tenim els 3 portaobjectes preparats amb les cèl·lules, ja els podem observar amb el microscopi de fluorescència.

Per fer l'observació només serà necessari col·locar les mostres sota l'objectiu, ajustar els augments per poder veure-les amb claredat i anar-les observant una a una amb els diferents filtres que el microscopi ens proporciona. Quan utilitzem els filtres, serà necessari apagar la llum per obtenir millors imatges i resultats.

Amb el filtre vermell podem observar la fluorescència de la Rodamina. En aquest cas, el filtre blau i el verd no ens serviran. I amb la llum natural, sense cap filtre, podem observar les cèl·lules tumorals com si les observéssim amb un microscopi òptic.

Un cop fetes les observacions, per poder analitzar els resultats amb més claredat, superposarem les diferents imatges i n'obtidrem una de sola per cada mostra.

A continuació, adjunto les imatges obtingudes.

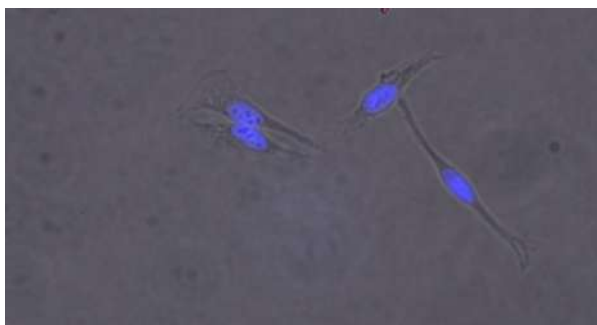


Figura 52. Cèl·lules tumorals de càncer de colon sense tractar. Observades amb un microscopi de fluorescència. Imatge feta superposant la imatge amb el filtre vermell i la imatge amb llum natural. En blau he marcat els nuclis de les cèl·lules. Augment x400.

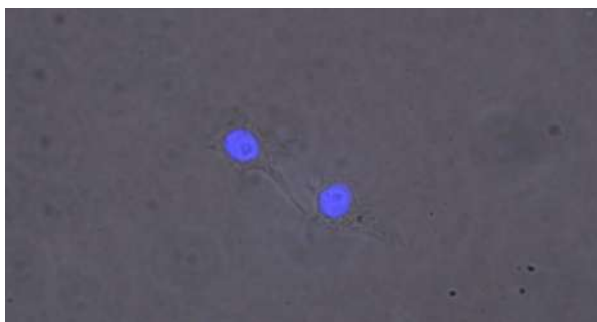


Figura 53. Cèl·lules tumorals de càncer de colon tractades amb les nanopartícules de PLGA amb aigua destil·lada. Observades amb un microscopi de fluorescència. Imatge feta superposant la imatge amb el filtre vermell i la imatge amb llum natural. En blau he marcat els nuclis de les cèl·lules. Augment x400.

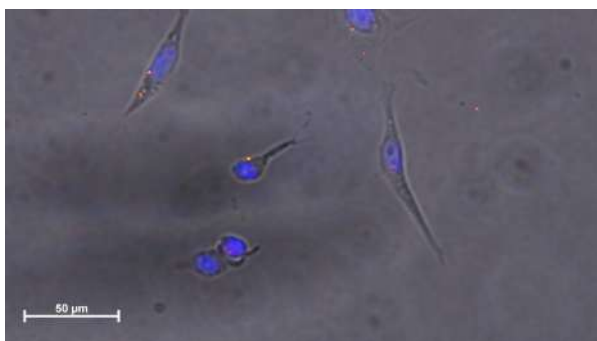


Figura 54. Cèl·lules tumorals de càncer de colon tractades amb les nanopartícules de PLGA amb Rodamina. Observades amb un microscopi de fluorescència. Imatge feta superposant la imatge amb el filtre vermell i la imatge amb llum natural. En taronja es pot observar la fluorescència de la Rodamina de les nanopartícules internalitzades a les cèl·lules. En blau he marcat els nuclis de les cèl·lules. Augment x400.

Tal i com es pot apreciar, tant en les cèl·lules no tractades com en les cèl·lules tractades amb les nanopartícules de PLGA amb aigua destil·lada no hi trobem presència de fluorescència taronja. Això ens indica que la fluorescència taronja observada només prové de les nanopartícules de PLGA amb Rodamina. Alhora, ens permet descartar que les cèl·lules tumorals o el PLGA de les nanopartícules també tinguin fluorescència.

Per tant, podem afirmar que les nanopartícules que vam sintetitzar amb Rodamina s'han internalitzat correctament dins de les cèl·lules. Segurament aquesta internalització s'ha fet seguint el mateix procés d'endocitosi que utilitzen les cèl·lules al nodrir-se. Al alimentar-se amb el medi de cultiu, la cèl·lula també ha consumit les nanopartícules que anteriorment havíem diluït en ell.

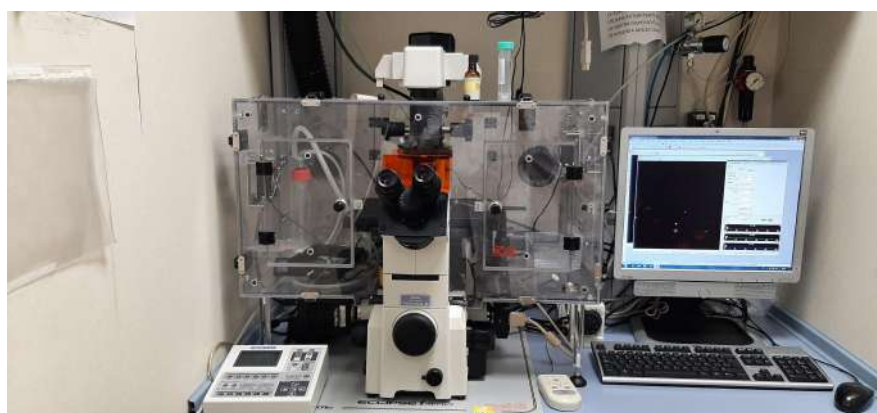


Figura 55. Microscopi de fluorescència abans d'utilitzar-lo per observar les mostres.

3.5.3. Eficiència d'encapsulació de la Rodamina

Com ja he explicat al procediment, per calcular l'eficiència d'encapsulació de la Rodamina vaig aprofitar la seva capacitat de fluorescència. Amb un fluorímetre vaig mesurar la fluorescència d'1mL de les sobres de la fase interna W1 amb Rodamina i la fluorescència present en 1mL del sobrenedant del primer rentat de les nanopartícules amb Rodamina.

La fase interna W1 contindrà tota la Rodamina que es podria haver encapsulat dins de les nanopartícules, en canvi, el sobrenedant contindrà tota la Rodamina que no es va poder encapsular.

Com a blanc, també vaig mesurar la fluorescència de la fase W1 i del sobrenedant de les nanopartícules amb aigua destil·lada. Aquest blanc servirà per saber quanta fluorescència prové realment de la Rodamina i no d'altres elements o materials de les nanopartícules.

Així doncs, en primer lloc vaig calcular la fluorescència real de la Rodamina en la fase W1 i en el sobrenedant, i a partir dels resultats el percentatge d'eficiència d'encapsulació.

Els resultats de fluorescència calculada pel fluorímetre van ser els següents:

- Fluorescència W1 RHO: 511,84
- Fluorescència sobrenedant (sn.) RHO: 82,62
- Fluorescència W1 Ø: 8,11
- Fluorescència sobrenedant (sn.) Ø: 45,62

A partir d'aquestes fluorescències podem trobar la fluorescència real seguint les fórmules ja explicades al procediment:

$$\begin{aligned} \text{Fluorescència real W1} &= (W1 \text{ RHO} - W1 \text{ Ø}) \times 1.000 \times 0,075 \\ \text{Fluorescència real sobrenedant} &= (\text{sn. RHO} - \text{sn. Ø}) \times 1.000 \times 9 \end{aligned}$$

Per tant,

$$\begin{aligned} \text{Fluorescència real W1} &= (511,84 - 8,11) \times 1.000 \times 0,075 = 37780 \\ \text{Fluorescència real sobrenedant} &= (82,62 - 45,62) \times 1.000 \times 9 = 33300 \end{aligned}$$

Finalment, ja podem calcular el percentatge d'eficiència d'encapsulació de la Rodamina en les nostres nanopartícules.

$$\text{Eficiència d'encapsulació} = \frac{(\text{Fluorescència W1} - \text{Fluorescència sobrenedant})}{\text{Fluorescència W1}} \times 100$$

Per tant,

$$\text{Eficiència d'encapsulació} = \frac{(37780 - 33300)}{37780} \times 100 = 11,86\%$$

Com més baixa és l'eficiència d'encapsulació, més alta és la quantitat de Rodamina o del fàrmac a encapsular que es perd en la síntesi de les nanopartícules. És per aquest motiu que ens interessa obtenir sempre la màxima eficiència d'encapsulació.

Tot i així, hem de tenir en compte que aconseguir una eficiència del 100% és pràcticament impossible ja que són molts els moments del procés de creació de les nanopartícules en que es pot fàcilment perdre una part del fàrmac a encapsular.

Parlant amb el David Montpeyó i el Pau Sarlé, investigadors a l'IBB de la UAB que em van ajudar i assessorar durant els procediments del meu marc pràctic, em van explicar que altres vegades que havien sintetitzat nanopartícules seguint el mateix procediment que jo havien obtingut percentatges d'eficiència d'encapsulació d'entre el 20 i el 25%.

Si comparem els seus resultats amb els meus podem veure que jo vaig tenir una eficiència d'encapsulació menor a la seva, probablement causada per la meva poca experiència treballant en laboratoris i per petits errors durant el procés. No obstant, considerant que el percentatge obtingut no s'allunya gaire del seu, aquesta diferència no ens suposa cap problema.

4. CONCLUSIONS

Un cop feta tota la part d'investigació tant teòrica com pràctica del treball, ja podem valorar la validesa de les tres hipòtesis formulades com a resposta al problema plantejat inicialment:

Es poden utilitzar els nanofàrmacs per crear nous tractaments més eficaços contra el càncer?

Hipòtesi 1: Potser podem crear nanopartícules que transportin un fàrmac al seu interior (nanofàrmacs).

Després de sintetitzar al laboratori unes nanopartícules de PLGA amb Rodamina encapsulada, vam poder demostrar com realment existeix la possibilitat de dissenyar i crear nanopartícules que continguin i transportin un fàrmac al seu interior, acceptant així la hipòtesi 1 com a vàlida.

Cal tenir en compte que com a simulació del fàrmac a encapsular, vam utilitzar Rodamina per la seva semblança amb la Doxorubicina. La Rodamina és molt menys perillosa per la nostra salut i té pràcticament les mateixes característiques estructurals que la Doxorubicina.

Hipòtesi 2: Potser podem crear nanofàrmacs que es puguin internalitzar dins de les cèl·lules tumorals.

Un cop sintetitzats els nanofàrmacs, vam comprovar si podien ser internalitzats sense dificultats dins de cèl·lules tumorals.

Per fer-ho, vam aplicar les nanopartícules a unes cèl·lules tumorals. Posteriorment, amb un microscopi de fluorescència, vam observar com la Rodamina havia entrat a l'interior de les cèl·lules i per tant, com les nanopartícules s'havien internalitzat correctament dins d'elles, donant també la hipòtesi 2 com a vàlida.

Aquesta internalització possiblement va produir-se durant l'alimentació de les cèl·lules per endocitosi. Al alimentar-se del medi de cultiu, les cèl·lules també van consumir les nanopartícules que anteriorment havíem diluït en ell.

Gràcies a l'encapsulació de la Rodamina dins de les nanopartícules, vam aconseguir que aquesta pogués accedir a l'interior de les cèl·lules.

Hipòtesi 3: Potser els efectes adversos dels nanofàrmacs són menors que els dels fàrmacs convencionals.

Per poder valorar la hipòtesi 3 compararem, en l'àmbit de l'oncologia, els tractaments que trobem avui en dia amb els que les nanopartícules ens poden oferir.

Al marc teòric vam poder observar els efectes adversos d'alguns dels tractaments més utilitzats en la medicina actual contra el càncer. Entre els més recurrents hi trobem una alta toxicitat cardiològica, toxicitat pulmonar, la fatiga o cansament, el malestar general, les nàusees i la caiguda del cabell. La majoria d'ells són causats per la distribució descontrolada dels fàrmacs per tot el cos en la quimioteràpia, la qual promou l'alliberació del fàrmac en òrgans o teixits sans tractant-los de la mateixa manera que als afectats, causant així els efectes secundaris ja esmentats.

Pel que fa als efectes adversos de la radioteràpia, són semblants als de la quimioteràpia però més focalitzats. Aquests estan causats per l'impacte de les radiacions del tractament a les zones amb cèl·lules sanes circumdants a les tumorals.

Així doncs, arribem a la conclusió que per millorar aquests tractaments, i evitar-ne o reduir-ne els efectes adversos, serà necessari buscar una manera d'aplicar els fàrmacs únicament als òrgans i teixits desitjats. Aconseguint així una medicina molt més dirigida i selectiva amb els teixits a tractar en el cas concret de cada pacient.

La nanomedicina és l'eina perfecta per fer-ho, gràcies a la gran varietat de característiques que podem modificar en les nanopartícules, ens ofereix la possibilitat de conduir l'alliberació dels fàrmacs cap a les zones convenients. Aquesta alliberació dirigida, tal i com vam veure al marc teòric, es fa aprofitant les pròpies característiques del nostre organisme i els fenòmens que hi passen. Alguns exemples en serien l'efecte de permeabilitat i retenció augmentada (EPR) o el canvi de pH en les zones tumorals respecte a la resta del cos.

Per poder acabar d'aprovar aquesta hipòtesi, he buscat estudis on es comparen els efectes adversos de les antraciclins convencionals, com seria la Doxorubicina, amb el Doxil®, la versió liposomal pegilada de la Doxorubicina:

L'abril del 2012, Shamudheen M Rafiyath, Mohammad Rasul, Byung Lee, Guoqing Wei, Gurpreet Lamba i Delong Liu demostraven en un estudi⁴⁹ que tant l'alopecia com les nàusees i vòmits es veien reduïts en els tractaments fets amb la Doxorubicina liposomal pegilada (Doxil®). Aquest estudi es va fer amb pacients d'edat avançada, amb risc de

⁴⁹ *Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis.*

malalties cardiovasculars o que prèviament ja havien passat per un tractament de càncer amb antraciclins convencionals; pacients amb una pitjor tolerància envers els efectes adversos de la Doxorubicina convencional.

El 2017 en un altre estudi⁵⁰, Akiho Fukuda, Kohei Tahara i Mitsuhiro Nakamura arribaven a les mateixes conclusions sumant-hi la disminució de la cardiotoxicitat en els tractaments fets amb la Doxorubicina liposomal pegilada.

En un estudi⁵¹ fet per l'Institut Català d'Oncologia el 2016 on es comparaven les toxicitats no cardiològiques de la Doxorubicina liposomal pegilada amb els de la Doxorubicina convencional, es va obtenir com a resultat que amb l'ús de les nanopartícules el percentatge de pacients amb nàusees o vòmits es reduïa del 53% al 37%, i el de pacients amb alopecia del 66% al 20%. Aquest estudi es va complementar amb dades tretes d'altres assaigs clínics realitzats el 2003 i el 2006.

Per tant, després d'observar en aquests tres estudis la disminució de certs efectes secundaris i l'increment dels efectes terapèutics amb l'ús de la versió liposomal pegilada de la Doxorubicina, podem també confirmar que la hipòtesi 3 és vàlida.

Es poden utilitzar els nanofàrmacs per crear nous tractaments més eficaços contra el càncer?

Després d'haver respost les tres hipòtesis podem destacar l'avantatge que els nanofàrmacs ens ofereixen envers a altres condicions dels fàrmacs, en les quals no haurien pogut entrar a la cèl·lula i s'haurien quedat enganxats a la seva membrana o teixits propers. Amb l'encapsulació aconseguim tant reduir la toxicitat dels fàrmacs com reduir la seva distribució pel sistema, augmentant així la seva eficiència.

Tal i com hem pogut observar, tot i trobar-se en els seus inicis, el món de la nanomedicina ens obre moltes portes. I podem afirmar que amb els nanofàrmacs accedim a un ample ventall de possibilitats pel que fa a la creació de nous tractaments més eficaços contra el càncer.

Com a conclusió final d'aquest treball, podem dir que la nanomedicina està predestinada a, tard o d'hora i amb un constant treball d'investigació darrere, deixar de ser coneguda com a la medicina del futur i començar a formar part de la medicina del present.

⁵⁰ *Comparison of the adverse event profiles of conventional and liposomal formulations of doxorubicin using the FDA adverse event reporting system.*

⁵¹ *Doxorubicina liposomal pegilada. Informe per a la Comissió de Farmàcia i Terapèutica de l'Institut Català d'Oncologia.*

5. FONTS D'INFORMACIÓ

5.1. Bibliografia

Per ordre d'autors:

ACEDO, Pilar; MARTÍNEZ DE PINILLOS, Alejandra; TABERO, Andrea; WENG-JIANG, Xian. **“Nanoterapias en el campo de la Biomedicina.”** Dossier científico. SE BBM. [juny 2017]

COSTA, Anna; FONTE, Pedro; REIS, Salette; SARMENTO, Bruno; SEABRA, Vítor; SOARES, Sandra; SOUSA, Flávia. **“Stability Study Perspective of the Effect of Freeze-Drying Using Cryoprotectants on the Structure of Insulin Loaded into PLGA Nanoparticles.”** Biomacromolecules. ACS Publications. [setembre 2014]

DE LA FUENTE, Jesús M.; GUTIÉRREZ, Lucía. **“Nanomedicina”** Dossier científico. SE BBM. [juny 2017]

HAN, Chang; WEI, Zhanqi; WENG, Xisheng; ZHU, Wei. **“Review: Nanomaterials as promising theranostic tools in nanomedicine and their applications in clinical disease diagnosis and treatment.”** MDPI. [desembre 2021]

JIMENO, Antonio; UGEDO, Luis. **“Biología per a 1r de batxillerat”** Santillana grup promotor. [2016]

5.2. Webgrafia

Per ordre d'autors:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185654#sec005>

ABE, Junko; FUKUDA, Akiho; HANE, Yuuki; HASEGAWA, Shiori; HATAHIRA, Haruna; MATSUI, Toshinobu; MOTOOKA, Yumi; NAGANUMA, Misa; NAKAMURA, Mitsuhiro; NAKAO, Satoshi; SASAOKA, Sayaka; TAHARA, Kohei; TAKEUCHI, Hirofumi. **“Comparison of the adverse event profiles of conventional and liposomal formulations of doxorubicin using the FDA adverse event reporting system”** Plos One. [setembre 2017]

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32077918/>

ADIL, Zia; NGUYEN, Tuan; PETER, Karlheinz; T TA, Hang; WANG, Xiaowei; WU, Yuao. **“The choice of targets and ligands for site-specific delivery of nanomedicine to atherosclerosis”** Cardiovasc Res. [novembre 2020]

https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/73266/FT_73266.pdf

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. “**Ficha técnica Doxorubicina Accord**” [Consulta: agost 2022]

<https://www.cancer.org/es/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html>

American Cancer Society. “**Cómo funcionan los medicamentos de quimioterapia**” [novembre 2019]

<https://www.rheumatology.org/I-Am-A/Patient-Caregiver/Tratamientos/AINEs>

American College of Rheumatology. “**AINE (Medicamentos Antiinflamatorios No Esteroides).**” [Consulta: juny 2022]

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641110002997?via%3Dihub#>

ARNIDA; GHANDEHARI, Hamid; JANÁT-AMSBURY, Margit María; PETERSON, Charles Matthew; RAY, Abhijit. “**Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages**” European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. [abril 2011]

<https://es.oncolink.org/tratamiento-del-cancer/oncolink-rx/doxorubicin-liposomal-doxil-r>

ARNOLD-KORZENIOWSKI, Karen. “**Doxorubicin Liposomal (Doxil®)**” Oncolink. [agost 2021]

<https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/antraciclina>

Asociación Española de Pediatría. “**Antraciclina**” [Consulta: agost 2022]

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adhm.201901223>

BAEK, Yoonji; CHOI, Hak Soo; HU, Shuang; HWANG, Do Won; KANG, Homan; KASHIWAGI, Satoshi; KIM, Moon Suk; RHO, Sunghoon; STILES, Wesley R. “**Size-Dependent EPR Effect of Polymeric Nanoparticles on Tumor Targeting**” Wiley Online Library. [deseembre 2019]

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/nr/c6nr03068h/unauth>

BARNARD, Amanda; SUN, Baichuan. “**Impact of speciation on the electron charge transfer properties of nanodiamond drug carriers.**” Royal Society of Chemistry. [juliol 2016]

<https://www.nature.com/articles/nnano.2007.70>

CAI, Shenshen; DALHAIMER, Paul; DISCHER, Dennis E.; GENG, Yan; MINKO, Tamara; TEWARI, Manorama; TSAI, Richard. “**Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery**” Nature nanotechnology. [març 2007]

<https://www.thno.org/v09p1893.htm>

CHAI, Yimin; LI, Qian; LI, Xiao; LIANG, Xiaowen; SU, Huihan; WANG, Haolu; XIONG, Liquin; XU, Jia; ZHANG, Chunfu; ZHANG, Lu; ZHOU, Chuangang. **“Tumor Chemo-Radiotherapy with Rod-Shaped and Spherical Gold Nano Probes: Shape and Active Targeting Both Matter”** Theranostics. [2019]

<https://physicsworld.com/a/scientists-delve-deeper-into-carbon-nanotubes/>

DUMÉ, Isabelle. **“Scientists delve deeper into carbon nanotubes”** PhysicsWorld. [febrer 2013]

<https://elmercurio.com.mx/stilo/que-diferencias-hay-entre-farmaco-y-medicamentos>

El mercurio online. **“Qué diferencias hay entre fármaco y medicamentos.”** [gener 2020]

<https://www.enciclopedia.cat/gran-enciclopedia-catalana/liofilitzacio>

Enciclopèdia catalana. **“Liofilització”** [Consulta: juliol 2022]

<https://www.sap.org.ar/docs/comunidad/enferReumatologicas.pdf>

“Enfermedades Reumatológicas. Drogas utilizadas en el Tratamiento.” [Consulta: juny 2022]

<https://escuelafarmacia.com/farmacocinetica-definicion-fases/>

Escuela internacional de farmacia Pasteur. **“¿Qué es la farmacocinética y cuáles son sus etapas?”** [maig 2022]

https://ec.europa.eu/health/documents/community/2014/201911129685/anx_129685_es.pdf

European commission public health. **“Ficha técnica Caelyx, INN-doxorubicin hydrochloride”** [Consulta: agost 2022]

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/bm/d0bm00558d#cit8>

FOULKES, Rachel; HOSKINS, Clare; JOY, Abigail; MAN Ernest; THIND, Jasmine; YEUNG, Suet. **“The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: current and future perspectives”** Royal Society of Chemistry. [juliol 2020]

<http://www.nanomedicine.com/NMI/1.3.1.htm>

FREITAS, Jr. **“Nanomedicine, Volume I: Basic Capabilities.”** Landes bioscience. [1999]

<https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer/tractaments/radioterapia/#bloc1>

Gencat. **“Radioteràpia”** Canal Salut. [2018]

<https://www.cosmeticlatam.com/index.php/2022/01/11/liposomas-y-su-funcion-en-la-piel/>

GIOFFRE, Paola. **“Liposomas y su función en la piel para entrega de ingredientes activos”** Cosmetic Latam. [gener 2022]

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/cs/d0cs01121e>

GOODART, Zoë Rachael; MARÍN, María J.; RUSSELL, David A.; SEARCEY, Mark. “**Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics**” Royal Society of Chemistry. [octubre 2020]

<https://nacionfarma.com/microambientes-acidos-propagan-mas-rapido-el-cancer-estudio/>

HERNÁNDEZ, Marianna. “**Microambientes ácidos en tumores propagan más rápido el cáncer: estudio**” Nación Farma. [març 2019]

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24309541/>

HUANG, Yuran; JIN, Shubin; KUMAR, Anil; LIANG, Xing-Jie; LIU, Juan; MOZHI, Anbu; TAN, Aaron. “**pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy**” National Library of Medicine. [deseembre 2013]

<https://www.iberdrola.com/innovacion/aplicaciones-nanotecnologia>

Iberdrola. “**Nanotecnología: una pequeña solución a los grandes problemas.**” [Consulta: juny 2022]

<https://escuelainenka.com/farmacocinetica/>

INENKA Business School. “**Farmacocinética: qué es y etapas**” [febrer 2022]

https://ico.gencat.cat/web/documents/Farmacia/medicaments/DOXO-LIP_PEG_per-web.pdf

Institut Català d'Oncologia. “**Doxorrubicina liposomal pegilada. Informe per a la Comissió de Farmàcia i Terapèutica de l'Institut Català d'Oncologia**” [març 2016]

<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cplu.202000496>

JIN, Song; LIU, Yun; XU, Letao; YANG, Guangze; ZHAO, Chun-Xia. “**Development of High-Drug-Loading Nanoparticles**” Chemistry Europe. [agost 2020]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3514106/>

LAMBA, Gurpreet; LEE, Byung; LIU, Delong; RAFIYATH, Shamudheen M.; RASUL, Mohammad; WEI, Guoqing. “**Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis**” National Library of Medicine. [abril 2012]

<https://www.biolinscientific.com/blog/what-are-surfactants-and-how-do-they-work>

LAURÉN, Susanna. “**What are surfactants and how do they work?**” Biolin Scientific. [juny 2018]

<https://nanoconvergencejournal.springeropen.com/articles/10.1186/s40580-021-00293-4>

MAO, Chuanbin; MIAO, Yao; YANG, Mingying; YANG, Shuxu; YANG, Tao. “**Protein nanoparticles directed cancer imaging and therapy**” Springer Open. [gener 2022]

<https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/17706/1980668.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

MARTÍNEZ SOLER, Gema Inmaculada. “**Diseño de nanosistemas poliméricos sensibles a estímulos magnéticos para tratamiento del cáncer**” Tesis Doctoral Universidad de Granada. [abril 2011]

<https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a682221-es.html>

Medline plus. “**Doxorrubicina**” [Consulta: juliol 2022]

<https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a682159-es.html>

Medline plus. “**Ibuprofeno.**” [Consulta: juny 2022]

<https://www.salusplay.com/apuntes/apuntes-de-farmacologia>

MENESES MONROY, Alfonso. “**Apuntes de farmacología**” Salusplay. [Consulta: setembre 2022]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2996072/>

MODY, Hardik; MODY, Vicky; SINGH, Ajay; SIWALE, Rodney. “**Introduction to metallic nanoparticles**” National Library of Medicine. [deseembre 2010]

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>

National Cancer Institute. “**Dictionary of Cancer Terms**” [Consulta: octubre 2022]

<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>

National Cancer Institute. “**Types of Cancer Treatment**” [Consulta: octubre 2022]

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

Organització Mundial de la Salut (OMS). “**The top 10 causes of death**” [deseembre 2020]

<https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>

PUENTE, Javier; VELASCO, Guillermo. “**¿Qué es el cáncer?**” Sociedad Española de Oncología Médica. [deseembre 2019]

<https://www.termcat.cat/oc/diccionaris-en-linia/198/presentacio>

Termcat, centre de terminologia. “**Terminologia de ciències de la salut**” [Consulta: juliol 2022]

<https://www.inesem.es/revistadigital/biosanitario/la-farmacocinetica-y-la-farmacodinamia/>

TORRES RAMÍREZ, Belén. “**Qué es la farmacocinética y la farmacodinamia.**” Revista digital INESEM. [març 2021]

<https://cen.acs.org/articles/94/i25/Does-nanomedicine-delivery-problem.html>

TORRICE, Michael. “**Does nanomedicine have a delivery problem?**” Chemical and engineering news. [juny 2016]

<https://www.nature.com/wls/spotlight/nanotechnology-8650176/>

Unesco and Nature Education. “**Nanotechnology.**” World Library of Science. [Consulta: juny 2022]

<https://www.visiblebody.com/es/learn/circulatory/circulatory-pulmonary-systemic-circulation>

Visible Body. “**Circulación pulmonar y circulación sistémica: Las vías y la función del flujo sanguíneo**” [Consulta: setembre 2022]