



---

APLICACIÓN DE  
NANOMOTORES  
MESOPOROSOS DE SÍLICE EN  
EL TRATAMIENTO DEL  
CÁNCER DE VEJIGA

---





## Agradecimientos

Este TDI no habría sido posible sin el apoyo, la colaboración y el esfuerzo de un gran número de personas.

En primer lugar, quiero darle las gracias a mi tutora por su apoyo constante, sus cartas de recomendación y todo el tiempo que me ha dedicado.

También quiero agradecerle a Pilar Jiménez Sánchez toda la ayuda que me ha dado para organizar mi estada en el IBEC, que sin ella seguramente no habría sido posible.

Seguidamente, quiero agradecerle de manera especial y sincera a la Dra. Ana Hortelão toda la ayuda que me ha proporcionado. Ella me ha asistido desde el primer día que la contacté, y me ha guiado y aconsejado en todo lo que necesitaba. Su positividad, pasión por la nanorrobótica y gran profesionalidad en el lab me servirán de ejemplo a seguir si sigo el camino de la investigación.

Gracias también a todo el grupo de Smart nano-biodevices, que me han hecho sentir como en casa. Gracias especialmente a Angel, a Meritxell y a Noelia, por vuestro tiempo, y a todos los otros estudiantes que encontré en ese grupo.

No sería justo no dedicarle unas líneas al Dr. Samuel Sánchez. Gracias por permitirme el acceso a tu grupo, me has regalado una experiencia y una oportunidad que me ha enriquecido muchísimo tanto a nivel personal como académico, y de la que muy pocos otros han podido disfrutar.

Quiero expresar mis más sentidos agradecimientos al grupo de Protein Engineering and Nanomedicine Group, liderado por Julia Lorenzo Rivera en el IBB-UAB. Sobre todo, quería darles las gracias a David Montpeyó García-Moreno i Eddi Pradas Gràcia, así como al resto del grupo, por toda la dedicación que pusieron en enseñarnos a los alumnos de las Estados Argó los fundamentos de la nanorrobótica y del trabajo en laboratorio, así como en su increíble capacidad de dinamizar y animar las actividades científicas.

Quiero expresar mi gratitud hacia la Dr. Carme Torras, por haberse tomado la molestia y el tiempo de responder a mis correos y por auxiliarme en la

realización del análisis ético de la nanorrobótica.

No puedo acabar mis agradecimientos sin mencionar el lugar de donde ha empezado este trabajo. Gracias, profesores de mi instituo, por apoyarme en la realización de este TDI y ayudarme a entrar en el Programa Locos por la Bioingeniería, el programa "I tu? Jo, bioquímica" y el Programa Argó.

Finalmente, gracias a toda mi familia, en especial manera a mis padres, por interesarse en mi trabajo, para ayudarme en todo momento y por no dudar nunca de mí.

## Índice

1.	Introducción .....	1
1.1	Justificación del tema .....	1
1.2	Metodología.....	1
1.3	Objetivos, preguntas de investigación e hipótesis.....	3
	PARTE TEÓRICA.....	5
2.	Nanociencia, nanotecnología y nanorrobótica .....	5
3.	Nanopartículas y Nanomotores.....	7
3.1	Tipos de nanopartículas.....	7
3.2	De nanopartículas a nanorrobots.....	9
3.3	Nanotransportadores .....	10
3.3.1	Activación interna.....	11
3.3.2	Activación externa.....	11
3.3.3	Activación interna vs activación externa.....	12
3.4	Nanomotores.....	12
3.4.1	NMs con propulsión interna (o endógenos).....	13
3.4.2	NMs con propulsión externa (o exógenos) .....	15
3.4.3	NMs exógenos vs NMs endógenos .....	17
3.5	¿Cómo se consigue una administración dirigida con NTs y NMs?.....	18
3.6	Nanopartículas mesoporosas de sílice .....	19
3.7	Cáncer de vejiga.....	21
3.7.1	Síntomas.....	23
3.7.2	Tipos .....	23
3.7.3	Etapas.....	24
3.7.4	Tratamientos tradicionales .....	26
3.7.5	Tratamiento del cáncer de vejiga con MSNPs.....	27
	PARTE PRÁCTICA.....	30
4.	Experimentación.....	30
4.1	Reactivos, materiales e instrumentos .....	31
4.2	Síntesis de MSNPs (1) .....	33
4.3	Funcionalización de las MSNPs con ureasas (2) .....	37
4.4	Observación del movimiento de los NMs en urea (3).....	40
4.5	Internalización de las MSNP-Ur en células cancerígenas (4).....	44
4.6	Ensayo de internalización (5).....	46
4.7	Ensayo “Live/Dead” (6).....	52
5.	Ética de la nanorrobótica .....	58

5.1	Primera Ley de Asimov.....	59
5.2	Segunda Ley de Asimov.....	60
5.3	Tercera Ley de Asimov.....	60
5.4	Ley Cero.....	61
6.	Conclusiones.....	62
6.1	Respuesta a la pregunta/s formuladas y refutación/confirmación de las hipótesis.....	63
6.2	Propuestas de mejora.....	63
7.	Referencias.....	65
8.	Anexos.....	72
8.1	Anexo I: imágenes y fórmulas moleculares de los reactivos, materiales e instrumentos.....	72
8.2	Anexo II: cómo usar el Imaje J.....	80
8.3	Anexo III: vídeos del movimiento de los NMs.....	80
8.4	Anexo IV: fotos del ensayo “Live/Dead”.....	81
8.5	Anexo V: anexo de abreviaciones.....	81

## 1. Introducción

### 1.1 Justificación del tema

Cuando tuve que escoger el tema para mi trabajo de investigación (de ahora en adelante, TDI), enseguida me di cuenta de que quería usar esta oportunidad para aprender más sobre un tema que me apasiona desde hace años: la nanotecnología, la nanociencia y, más concretamente, la nanorrobótica. La idea de poder manipular la materia a escala nanométrica me fascina enormemente, así como la posibilidad de entender cómo funciona la química a escalas tan diminutas.

Además, la nanociencia es un campo de la ciencia que ha crecido enormemente en los últimos años y cada vez es más importante en áreas como la medicina, la tecnología, la cosmética, la energía y la biorremediación ambiental, entre otros. Por lo tanto, esta investigación será muy actual.

Gracias a este TDI espero entender más a fondo el tema de la nanorrobótica, para así vislumbrar hasta qué punto ha llegado esta tecnología en el día de hoy, así como intentar divisar cómo podría evolucionar en los próximos años. Debido a la vastedad de los campos abarcados por la nanorrobótica, decidí centrar el TDI en la aplicación de los nanomotores mesoporosos de sílice contra el cáncer de vejiga. Tomé esta decisión porque son un tipo de nanomotor bastante investigado, gracias a sus características es probable que su uso sea cada vez más común y además sus aplicaciones contra el cáncer de vejiga ya han sido parcialmente analizadas, por lo que no realizaría mi TDI completamente “a ciegas”.

### 1.2 Metodología

Este TDI tendrá una parte teórica y una parte práctica. En la parte teórica investigaré a fondo (mediante un análisis bibliográfico) el funcionamiento de las nanopartículas, los nanomotores y los nanorrobots, profundizaré en las nanopartículas mesoporosas de sílice y resumiré en qué consiste el cáncer de vejiga, para entender cómo funciona, sus principales características y de qué formas se podría atacar.

Igualmente, en la parte práctica realizaré varios experimentos para obtener datos que se complementen con la parte teórica. Debido a la dificultad de trabajar con nanorrobots, la parte práctica la llevaré a cabo en el laboratorio del grupo de Smart nano-bio-devices, liderado por el investigador Samuel Sánchez, que forma parte del IBEC (Instituto de Bioingeniería de Cataluña).<sup>1</sup> Este grupo me ayudará a diseñar y, posteriormente, a realizar, la parte práctica del TDI.

También realizaré algunos experimentos en el IBB (Instituto de Biotecnología y de Biomedicina) de la UAB (Universidad Autónoma de Barcelona), en el marco de las Estades Argó. Sin embargo, finalmente no los he incluido en este trabajo.

Todos los experimentos que realizaré seguirán el siguiente esquema (algunos experimentos no tendrán todos los apartados mostrados a continuación porque en esos casos específicos no serán necesarios):

- Objetivo
- Diseño Experimental
  - Pregunta de investigación del experimento
  - Hipótesis
  - Variables
- Fundamento teórico
- Procedimientos
- Resultados i análisis resultados

Para evitar repeticiones, haré un único apartado al principio de la parte práctica con todos los reactivos, materiales e instrumentos usados. Por ende, en los anexos pondré la foto de todos los componentes usados.

Además, gracias al contacto con una experta en bioética de la UPC, la Sra. Carme Torras, realizaré un apartado teórico más, en el que trataré la ética detrás del desarrollo de la tecnología de la nanorrobótica.

Por último, en la conclusión responderé las preguntas de investigación que

---

<sup>1</sup> IBEC. Web: <https://ibecbarcelona.eu/nanodevices> [Última consulta: 30/09/21]



plantaré en el siguiente apartado, gracias a toda la información adquirida a lo largo del TDI.

La fuente de información principal de este TDI será internet, que me servirá para buscar y encontrar artículos científicos (que serán debidamente citados en las fuentes bibliográficas y en las notas a pie de página). Obviamente, debido al grado de profundización que requerirá este TDI la enorme mayoría de los artículos que tendré a disposición serán en inglés, lo cual hará que la investigación bibliográfica sea considerablemente más ardua de lo que podría parecer a simple vista. Asimismo, también usaré, aunque más raramente, fuentes de información “secundarias”, cómo Wikipedia o webs/blogs de divulgación, siempre y cuando considere que su validez es suficiente y citen sus fuentes (en cuyo caso, siempre que sea posible citaré directamente las fuentes).

Además, entraré en contacto con expertos de la materia (principalmente del IBEC, pero también de otros centros de investigación cómo el Instituto de Biotecnología y de Biomedicina (IBB) de la UAB), que podrán ayudarme a resolver dudas concretas a las que no pueda encontrar respuesta online.

### 1.3 Objetivos, preguntas de investigación e hipótesis

Al empezar este TDI, me planteé los siguientes objetivos:

1. Entender qué es la nanociencia, la nanotecnología y la nanorrobótica.
2. Descubrir qué es un nanorrobot, una nanopartícula y un nanomotor, cómo funcionan y de qué maneras se pueden usar para transportar y liberar medicamentos en un tejido diana.
3. Realizar una ampliación en el tema de las nanopartículas mesoporosas de sílice.
4. Investigar el cáncer de vejiga, para entender sus características y como se trata actualmente.
5. Llevar a cabo otra ampliación, sobre la ética de la nanorrobótica.
6. Una vez habré investigado todos estos apartados bibliográficamente, llevar a cabo una parte práctica con la que profundizar un aspecto concreto del tratamiento del cáncer de vejiga con nanomotores

mesoporosos de sílice.

Este último objetivo me llevó al planteamiento de las siguientes preguntas de investigación, que responderé con la parte práctica:

- i. ¿Son las nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con ureasa capaces de moverse en una solución con urea?
- ii. ¿Pueden estos nanomotores penetrar en células de cáncer de vejiga *in vitro*, con y sin presencia de urea en el medio?
- iii. ¿Qué porcentual de células de cáncer de vejiga sobrevivirán después de 24h de internalización con diferentes cantidades de nanomotores, con y sin presencia de urea en el medio?

Se formularán las siguientes hipótesis para responder a las preguntas de investigación:

- i. En presencia de urea la actividad de la enzima ureasa permitirá a las nanopartículas mesoporosas de sílice difundirse más rápidamente que sin presencia de urea.
- ii. En caso que haya urea presente en el medio, los NMs podrán internalizarse dentro de las células de cáncer de vejiga, mientras que no conseguirán entrar en las células sin urea en el medio.
- iii. Cuanta mayor sea la cantidad de nanomotores presentes en el medio y cuanta más urea haya, menor será el porcentaje de células que seguirá con vida después de 24 horas de internalización.

## PARTE TEÓRICA

### 2. Nanociencia, nanotecnología y nanorrobótica

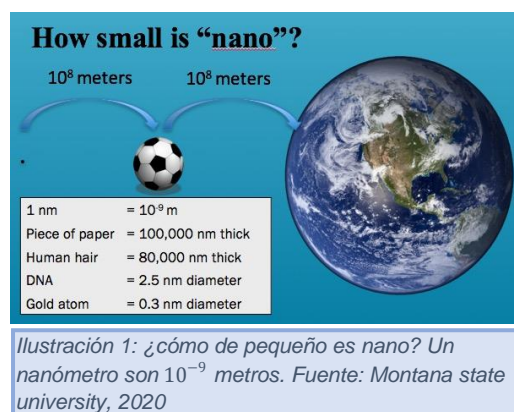
La ciencia y la tecnología están estrechamente relacionadas, y hasta se puede considerar que son dos caras de la misma moneda: por un lado, la ciencia es la necesidad de conocer, un reflejo de la curiosidad del ser humano, planteada de forma objetiva y usando el método científico. La síntesis de una nueva molécula es un ejemplo de tarea llevada a cabo por un científico en un laboratorio. Los resultados obtenidos serán publicados en forma de artículo en una revista científica, después de haber sido revisados por la comunidad científica, y disponibles para todos. Por el otro lado, la tecnología suele ser desarrollada por empresas, que parte de los conocimientos básicos establecidos por la ciencia para construir dispositivos o aparatos, que suelen proteger con patentes. Curiosamente, la creación de nuevas tecnologías aporta instrumentos para que pueda avanzar la ciencia, y se forma de esta manera un círculo virtuoso que está permitiendo el avance de la humanidad a un ritmo vertiginoso.<sup>2</sup>

La nanociencia i la nanotecnología son esas disciplinas de, respectivamente, la ciencia y la tecnología que trabajan, estudian y manipulan materia que tenga por lo menos una dimensión (x-y-z)

menor de un micrómetro, es decir, de entre 1 y 999 nanómetros (*Ilustración 1*).

Se han ido desarrollando paralelamente, la una haciendo nuevos descubrimientos y la otra aplicándolos para poder seguir investigando y llegar a una comprensión aún más profunda.

Está claro que la nanotecnología es una herramienta capaz de transformar la sociedad como lo hizo la microelectrónica durante el final del siglo XX. Su

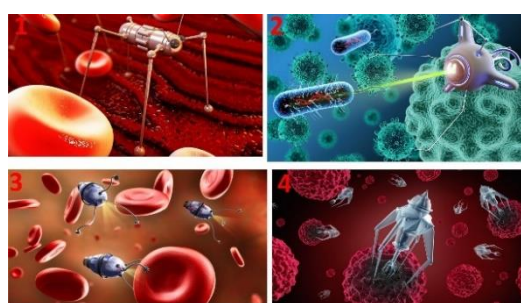


<sup>2</sup> José Ángel Martín, Elena Casero, Carlos Briones, Pedro Serena. “Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro”. *Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología*, 2009.

potencial parece ser verdaderamente ilimitado, ya que gracias a la nanociencia se han abierto muchísimas nuevas y fascinantes posibilidades en la fabricación de nuevos materiales, estructuras y dispositivos.<sup>3</sup>

Un campo específico de la nanotecnología es la nanorrobótica, que se encuentra aún en los estadios iniciales de su desarrollo. No obstante, está tomando cada vez más relevancia en diversos sectores, como el medioambiente y la medicina, y gracias a sus muchísimas posibles aplicaciones tiene el potencial de cambiar para siempre la forma en la que vivimos.<sup>4</sup>

La nanorrobótica es la disciplina que diseña y construye máquinas o robots cuyos componentes están o son cercanos a la escala nanométrica<sup>5</sup>, y que puede interactuar con otras partículas de



tamaño nanométrico. Aun así, esta definición puede generar confusión y malentendidos sobre cómo es

Ilustración 2: ilustraciones de nanorrobots encontradas en internet. Fuentes:  
1) Tina Díaz, 2016  
2) Excellence executive, 2020  
3) Rafael García, 2019  
4) Laura Martín, 2018

verdaderamente un nanorrobot (de ahora en adelante, NR. Los NRs se pueden llamar también nanomáquinas, nanoides o nanobots). Internet está lleno de representaciones, ilustraciones y *renders* de NRs, cómo los de la *Ilustración 2*, en las que solamente se retratan robots miniaturizados, pero que no se parecen en nada a un NR de verdad y que pueden dar lugar a malentendidos.

En realidad, un NR es simplemente una (o más) nanopartícula(s) que tiene la capacidad de interactuar con su alrededor, porque se

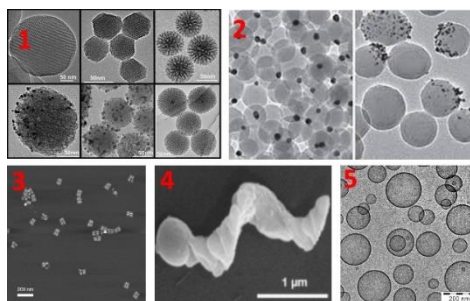


Ilustración 3: ejemplos de nanorrobots. Todas las imágenes han sido tomadas con microscopio electrónico.  
1) MSNPs. Fuente: Zhao, T. et al., 2019  
2) Janus spheres. Fuente: Nanowerk, 2011  
3) Nanorrobots de DNA. Fuente: S. Levy, 2014  
4) Nanorrobot helicoidal. Fuente: Wikimedia commons a, 2017  
5) Liposomas. Fuente: Freiburg University

<sup>3</sup> Drexler & K. Eric. "Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology". *Doubleday*, 1986.

<sup>4</sup> Saini, R. et al. "Nanotechnology: The Future Medicine". *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 2010.

<sup>5</sup> Ghosh, A. & Fischer, P. "Controlled Propulsion of Artificial Magnetic Nanostructured Propellers". *Nano Letters*, 2009.

le ha dado la capacidad de realizar acciones como detectar moléculas, transportar, liberar y activar sustancias o moverse autónomamente. Asimismo, hoy en día es prácticamente imposible construir un NR con alguna parte mecánica. Algunos ejemplos de qué aspecto tienen realmente los NRs se encuentran en la *Ilustración 3*. En estas imágenes se ve claramente que un NR, por lo menos a primera vista, es bastante sencillo.

### 3. Nanopartículas y Nanomotores

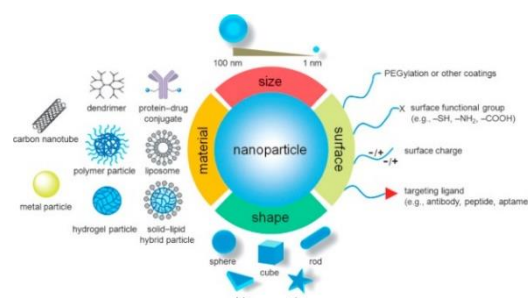
Ahora que ya está claro qué es la nanorrobótica, voy a profundizar en diferentes aspectos de este campo, concentrándome principalmente en las nanopartículas y los nanomotores.

La característica principal de las nanopartículas (de ahora en adelante, NP) es que se comportan (cualitativamente) como partículas de mayor tamaño, aunque conservando siempre por lo menos una dimensión (x-y-z) de tamaño en la escala nanométrica. Además, las NPs no son simples moléculas, porque normalmente están formadas por diferentes capas, que típicamente son un núcleo, una capa de protección y una de superficie que se puede funcionalizar. Dependiendo de sus características, las NPs también se pueden llamar nanoesferas, nanovaras, nanocadenas, nanoestrellas, nanofibras o nanocajas.<sup>6,7</sup>

#### 3.1 Tipos de nanopartículas

Hay muchísimos tipos de NPs diferentes, así como también son muchas las maneras en las que se pueden clasificar: tamaño, morfología, propiedades físicas y química, y material (*Ilustración 4*).

Basándose en este último parámetro, se



*Ilustración 4: tipos de NPs. Fuente: S. Silva, 2019.*

<sup>6</sup> dF\_, "Nano-particle or Molecule?". physics.stackexchange, 2010. Web: [https://physics.stackexchange.com/questions/601/nano-particle-or-molecule?answertab=active#comment1106\\_609](https://physics.stackexchange.com/questions/601/nano-particle-or-molecule?answertab=active#comment1106_609) [Última consulta: 12/08/21]

<sup>7</sup> W.-K. Shin et al. "Cross-linked composite gel polymer electrolyte using mesoporous methacrylate-functionalized SiO<sub>2</sub> nanoparticles for lithium-ion polymer batteries." Scientific Reports, 2016.

pueden distinguir los siguientes tipos de NPs:

- NPs basadas en carbono

Son sobre todo fulerenos (*Ilustración 5*) y nanotubos de carbono (NTC). Los fulerenos están formados por una red más o menos globular de átomos de carbono. Han suscitado un notable interés comercial debido a su conductividad eléctrica, su alta resistencia, su estructura, su afinidad por los electrones y su versatilidad.<sup>8</sup>

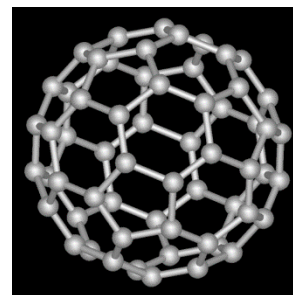


Ilustración 5: fulerenos. Fuente: wikimedia commons f, 2005.

A su vez, los NTCs (*Ilustración 6*) tienen como indica su nombre una estructura tubular, y se parecen estructuralmente a una lámina de grafito enrollada sobre sí misma. Gracias a la enorme fuerza de sus enlaces, sus diminutos pesos moleculares y sus propiedades de conductividad térmica y eléctrica los NTCs tienen muchas posibles aplicaciones.<sup>9</sup>

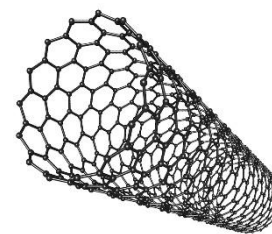


Ilustración 6: nanotubo de carbono. Fuente: Yirka B., 2016.

- NPs metálicas

Tienen un núcleo metálico, y dependiendo del metal podrán tener diferentes propiedades. Los metales más usados son el oro, la plata, el hierro, el platino y el titanio, aunque se está llevando a cabo investigación para poder usar también otros tipos.<sup>10</sup>

- NPs poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (NPPs) normalmente están formadas por polímeros orgánicos, que dependiendo del método de preparación su estructura suele ser de nanoesfera o de nanocápsula (que está vacía por dentro). Algunas de las ventajas de las NPPs son la liberación controlada, la

<sup>8</sup> A. Astefanei et al. "Characterisation and determination of fullerenes: a critical review." *Analytica Chimica Acta*, 2015.

<sup>9</sup> Saeed et al. "Preparation and characterization of single-walled carbon nanotube/nylon 6,6 nanocomposites." *Instrum Scientific Technology*, 2016.

<sup>10</sup> Dreaden et al. "The golden age: gold nanoparticles for biomedicine." *Chemical Society Reviews*, 2012.

protección de las moléculas de los fármacos, la orientación específica y muchas más. Su aplicación es principalmente en la administración de fármacos, ya que las entregas de medicamento con NPPs son altamente biodegradables y biocompatibles.<sup>11</sup>

- NPs basadas en lípidos

Están formadas por un núcleo lipídico, juntamente con una matriz que contiene moléculas lipófilas. Las NPs lipídicas tienen generalmente una forma esférica, y son muy útiles como nanotransportadores de moléculas lipófilas. Este tipo de NP ya está muy desarrollado, y hasta se ha usado en las vacunas contra el virus SARS-CoV-2 (las NPs lipídicas usadas para transportar el RNAm en estas vacunas son liposomas, la NP lipídica más común).<sup>12</sup>

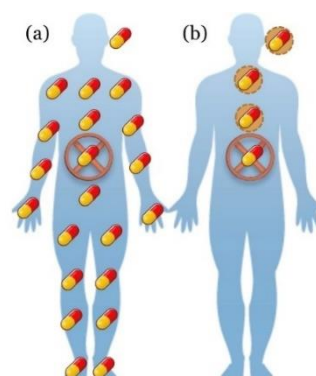
- Otras:

Entre otros tipos de NPs menos relevantes también se encuentran las NPs de cerámica, que encuentran su uso en aplicaciones como la obtención de imágenes, y las NPs semiconductoras, que se usan, principalmente, en dispositivos electrónicos.<sup>13</sup>

### 3.2 De nanopartículas a nanorobots

Entre los muchísimos usos que tienen las NPs, el que se tratará en este TDI es su uso en la medicina, que es principalmente el de nanotransportadoras (de ahora en adelante, NTs. También se pueden llamar nanocápsulas) de medicamentos. Esta aplicación

*Ilustración 7: resultado de una administración tradicional de un fármaco (a) y de una administración dirigida del mismo (b), con la que se consigue acumular una cantidad de medicamento mucho más elevada en los tejidos diana (cruz). Fuente: propia.*



consiste en usar a las NPs para transportar a los fármacos por el interior del

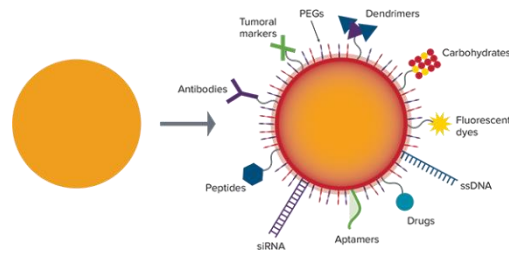
<sup>11</sup> Khan et al. "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities." *Arabian Journal of Chemistry*, 2019.

<sup>12</sup> A. Puri et al. "Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic." *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2009.

<sup>13</sup> S. Sun. "Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices." *Science*, 2000.

cuerpo, y de esta forma se puede conseguir una administración dirigida de los mismos, consiguiendo que se concentren principalmente en tejidos diana (ver *Ilustración 7*). Además, las NPs también sirven para proteger al fármaco de la degradación del cuerpo.<sup>14</sup>

Las NPs pueden usarse para realizar una administración dirigida gracias al hecho que se les pueden enlazar ligandos, (llamados en inglés “targeting agents”),

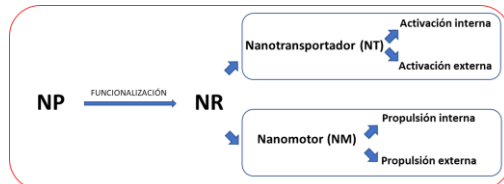


que son unas moléculas que permiten a la NP interactuar con su alrededor.

*Ilustración 8: funcionalización de una nanopartícula. Fuente: M. Hurst et al., 2021.*

Este proceso se llama funcionalización (ver la *Ilustración 8*), ya que gracias a sus grupos funcionales los ligandos aportan propiedades químicas a la NP. Según la definición de NR que se ha dado en el apartado de “Nanociencia, nanotecnología y nanorrobótica”, cualquier NP que esté funcionalizada ya se podría considerar un NR, porque sería capaz de interactuar con su alrededor.

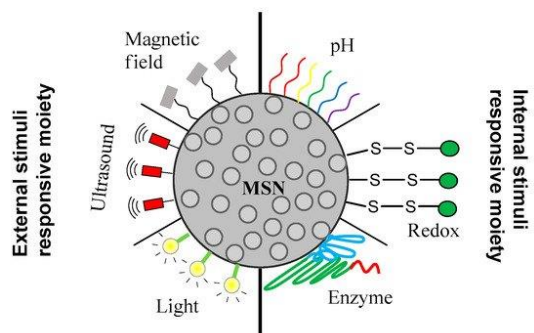
En los siguientes apartados se van a analizar dos tipos de NRs, los NTs y los nanomotores, siguiendo el esquema en la *Ilustración 9*.



*Ilustración 9: organización de los siguientes apartados del TDI. Fuente: propia.*

### 3.3 Nanotransportadores

Como se ha explicado, hay muchos tipos de NPs diferentes, y evidentemente cada una tiene su manera particular de transportar un cargo. Aun así, es posible clasificar a los NTs en dos categorías, dependiendo de cómo y cuándo liberan su contenido (*Ilustración 10*): con



*Ilustración 10: principales tipos de estímulos internos y externos. Fuente: Barui S., 2020.*

<sup>14</sup> Darian R. Esfahani et al. “Systems engineers’ role in biomedical research. Convection-enhanced drug delivery”. ScienceDirect, 2018.



activación interna (o endógena) y con activación externa (o exógena).

### 3.3.1 Activación interna

En este caso, el NT libera el fármaco debido a un estímulo interno en el cuerpo del paciente. Los estímulos más comunes que se usan son el pH (es decir, la concentración de protones en el medio, que indica la acidez), la temperatura, o moléculas específicas, como enzimas u otras proteínas.

Un ejemplo de este tipo de NPs son las NPs mesoporosas de sílice envueltas en polímeros que reaccionan a cambios de pH. Más adelante se explicarán más detalladamente las NPs mesoporosas de sílice, pero para este ejemplo es suficiente saber que son unas NPs con nanoagujeros en su interior, en los que se transporta la sustancia deseada. Con estas NPs es muy común tapar los agujeros con polímeros

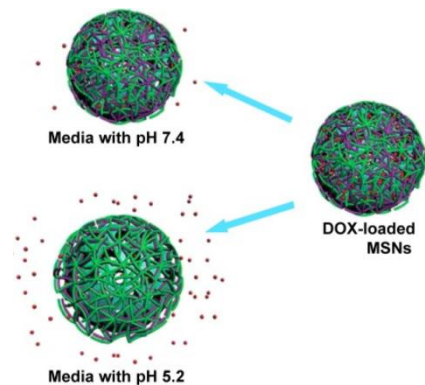


Ilustración 11: ejemplo de activación interna con NPs mesoporosas de sílice. Fuente: Song Y et al, 2017.

(los hay de muchos tipos diferentes) que reaccionan a cambios de pH (Ilustración 11). Estos polímeros se disuelven (en un proceso llamado desnaturalización) a partir de un pH determinado, y dependiendo del pH a partir del cual se desnaturaliza el polímero escogido, se podrá controlar en qué lugares del cuerpo se liberará el fármaco del NT.

### 3.3.2 Activación externa

La otra manera de desprender el fármaco es mediante una estimulación directa. Lo más común es usar impulsos eléctricos o magnéticos, así como luz visible, a infrarrojos o ultravioleta, para que reaccionen con el NT para que libere el fármaco en el ambiente.

Un ejemplo de NT con este tipo de activación son otra vez las NPs mesoporosas de sílice, pero en vez de llevar el fármaco dentro lo llevan enganchado a su superficie gracias a enlaces químicos, que se pueden romper mediante el uso de ultrasonidos, luz o un campo magnético.

### 3.3.3 Activación interna vs activación externa

La principal ventaja de los NTs con activación interna es que son totalmente autónomos, y una vez dentro del cuerpo son capaces de localizar al tejido diana y liberar autónomamente su carga, mientras que los NTs con activación externa requieren de alguien que los active, lo cual podría ser dispendioso (al necesitar aparatos médicos y personal cualificado) y elevar los gastos de estudio y tratamiento. Por otro lado, al requerir un estímulo procedente del cuerpo los NTs con activación interna presentan más riesgos que los con activación externa, porque se podrían activar en el lugar inadecuado. En cambio, gracias a la activación externa se puede estar seguros que los NTs liberen su contenido exactamente en el momento y en el lugar en que se proporcione el estímulo.

Consecuentemente, es necesario conocer muy bien estas diferencias para así poder escoger la mejor opción dependiendo del fármaco, NT y tejido diana con el que se esté trabajando.

### 3.4 Nanomotores

Una de los usos más comunes de la funcionalización es la creación de nanomotores (de ahora en adelante, NM), que son aquellas NPs que tienen la capacidad de desplazarse superando el movimiento browniano.

Este es el movimiento aleatorio que se observa en las partículas que se hallan en un medio fluido (líquido o gas), como resultado de choques contra las moléculas de dicho fluido (*Ilustración 12*).<sup>15</sup> Tiene este nombre en honor a su descubridor, Robert

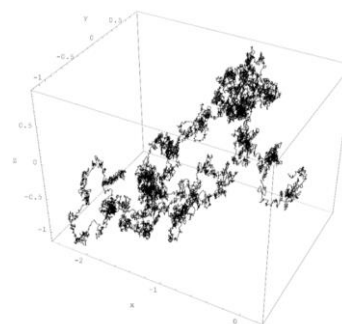


Ilustración 12: movimiento browniano en 3 dimensiones de una NP. Fuente: Wikimedia commons, d

Brown, que notó a través de su microscopio un movimiento aparentemente aleatorio de unas partículas dentro de un grano de polen en el agua, que estaba estudiando, pero no fue capaz de entender la causa de esos movimientos. Varias décadas más tarde, fue Einstein quién explicó que esos

<sup>15</sup> Feynman, Richard (1970). The Feynman Lectures on Physics Vol I. Addison Wesley Longman. ISBN 978-0-201-02115-8.

movimientos eran el resultado de las micropartículas siendo movidas por moléculas de agua individuales. Ya que estas no chocan contra las micropartículas siempre de la misma forma (debido a que se mueven a velocidades y direcciones aleatorias) siempre hay un lado más bombardeado que otro, y así se genera un movimiento.<sup>16</sup> El efecto más claro del movimiento browniano es el de la difusión: cuando las partículas se mueven de una región de alta concentración a un área de baja concentración hasta obtener una distribución uniforme.<sup>17</sup>

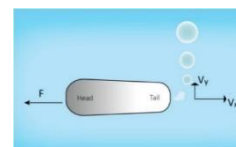
Entonces, debido al movimiento browniano una NP siempre se estará moviendo de forma aleatoria. Para que una NP pueda considerarse un nanomotor, esta tiene que ser capaz de generar suficiente propulsión para vencer el movimiento browniano. En algunos casos, cuando la NP puede generar movimiento, pero este no puede vencer al movimiento browniano, se dice que la NP logra una “enhanced diffusion”, en castellano, “difusión mejorada”.

Hay muchas formas en las que se puede lograr que un NM se mueva, y dependiendo del origen de la energía necesaria para su propulsión y la manera en que se controla su dirección los NMs pueden clasificarse en “exógenos” y “endógenos”.

### 3.4.1 NMs con propulsión interna (o endógenos)

Este tipo de NMs usa solamente los “combustibles” que se pueden encontrar en un cuerpo, y por lo tanto obtienen la energía que necesitan del interior del organismo. Las maneras en las que se puede conseguir una propulsión autónoma son el uso de burbujas, de autoelectroforesis y/o de enzimas.<sup>18</sup>

- NMs propulsados por burbujas



Estos NMs están diseñados sobre la base de

Ilustración 13: NM a propulsión interna con burbujas. Fuente: Yang, Q. et al. 2020.

<sup>16</sup> “Movimiento browniano”. Wikipedia, 2021. Web:

[https://es.wikipedia.org/wiki/Movimiento\\_browniano](https://es.wikipedia.org/wiki/Movimiento_browniano) [Última consulta: 29/07/21]

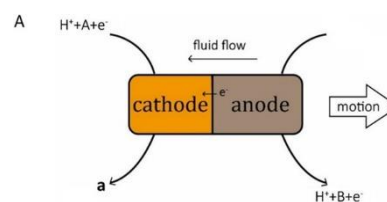
<sup>17</sup> “Difusión”. Wikipedia, 2021. Web: [https://es.wikipedia.org/wiki/Difusi3n\\_\(f3sica\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Difusi3n_(f3sica)) [Última consulta: 29/07/21]

<sup>18</sup> Q. Yang et al. “Recent Advances in Motion Control of Micro/Nanomotors”. *Wiley online library*, 2020.

un concepto simple: la propulsión es proporcionada por burbujas, producidas ya sea a través de reacciones químicas, como la degradación de un reactivo químico (por ejemplo, peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ ) con un catalizador en condiciones específicas, o algunas reacciones redox que producen gases de forma espontánea. La propulsión resulta del efecto de retroceso causado por el desprendimiento de numerosas burbujas reunidas en la cola del micromotor, como se muestra en la *Ilustración 13*.<sup>19</sup>

- NMs propulsados por autoelectroforesis

Con estos NMs endógenos el movimiento se consigue cosechando energía libre de sustancias químicas de los entornos del NM y transduciéndola a energía mecánica mediante autoelectroforesis.<sup>20</sup>



*Ilustración 14: diagrama esquemático del mecanismo de autoelectroforesis generado alrededor de un NM. Fuente: Yang, Q. et al, 2020.*

Como se muestra en la *Ilustración 14*, una NP produce un campo eléctrico como resultado de la química redox (se da una reacción de oxidación – en la que se pierden electrones – y reducción – en la que se usan electrones –) que ocurre en sus dos extremos. En el extremo anódico (negativo) de la partícula, la oxidación de B establece un flujo de electrones hacia el extremo catódico (positivo), donde esos electrones son consumidos por la reacción de reducción de A. Al mismo tiempo, también se generan protones en un extremo (ánodo) y se consumen en el otro (cátodo). La migración de esos protones arrastra al fluido circundante con ellos, empujando la NP en la dirección opuesta.<sup>21</sup>

- NMs propulsados por enzimas

Los NMs que hacen uso de enzimas usan combustibles endógenos ya presentes en el medio donde se encuentran, que permite la activación in situ de los NMs y el diseño de NMs totalmente biocompatibles gracias al hecho que ambos el sustrato y el producto son sustancias ya naturalmente presentes en al

<sup>19</sup> Y. Liang, et al. "Transportation and release of Janus micromotors by two-stage rocket hydrogel". *Journal of Materials Chemistry A*, 2017.

<sup>20</sup> A. Nourhani et al. "A general flux-based analysis for spherical electrocatalytic nanomotors". *Physics of fluids*, 2015.

<sup>21</sup> W. Paxton et al. "Chemical Locomotion". *Minireviews*, 2006.

ambiente en el que actúan.

Se ha demostrado que en tiempos cortos un NM funcionalizado con enzimas tiene un componente sustancial de movimiento dirigido, con una velocidad que depende de la concentración de moléculas de combustible. En tiempos más largos, sin embargo, el movimiento pasa a ser aleatorio, pero con un coeficiente de difusión sustancialmente mayor al del mismo NM sin combustible. Entonces, aunque se mueva sin un rumbo fijo un NM enzimático, en presencia de combustible, se esparcirá por el medio en el que se encuentra con mayor facilidad que si no hubiera combustible.<sup>22</sup>

Además, las posibilidades de combinaciones de enzimas y sustratos permiten diseñar NMs enzimáticos adaptados a cada aplicación, como es el caso de los NMs alimentados por ureasa para la terapia del cáncer de vejiga.<sup>23</sup> Asimismo, se ha demostrado que el tamaño, la forma, la cantidad y la distribución de las enzimas, así como las propiedades enzimáticas intrínsecas podrían desempeñar un papel fundamental en el control del movimiento de estos NMs.<sup>24</sup> Así, los NMs enzimáticos presentan la potencialidad de adaptarse a ambientes y circunstancias muy variados.

### 3.4.2 NMs con propulsión externa (o exógenos)

Estos NMs, en cambio, obtienen la energía que necesitan del exterior del organismo. En este caso lo más común es el uso de campos magnéticos, pero también de campos eléctricos, de luz (infrarroja, visible, ultravioletada...) y de ultrasonidos (pero también campos acústicos) como fuente de energía para su propulsión.

- NMs propulsados por campos magnéticos

Han recibido una atención considerable debido a su accionamiento sin combustible, con posibilidad de control remoto e inocuidad para las células y

---

<sup>22</sup> J. Howse et al. "Self-Motile Colloidal Particles: From Directed Propulsion to Random Walk". *Physical review letters*, 2007.

<sup>23</sup> A. Hortelao et al. "Monitoring the collective behavior of enzymatic nanomotors in vitro and in vivo by PET-CT". *Biorxiv*, 2020.

<sup>24</sup> T. Patiño et al. "Fundamental Aspects of Enzyme-Powered Micro- and Nanoswimmers". *Accounts of chemical research*, 2018.

los tejidos. Por esta razón el campo magnético es uno de los mecanismos más utilizados para transducir energía y diseñar NMs. Es capaz de alinear los NMs y proporcionar una navegación direccional debido a su propia direccionalidad. Aunque los NMs de propulsión magnética han atraído cada vez más la atención y han aparecido numerosos informes recientemente, todavía es pronto para su desarrollo, y la traslación con éxito de estos motores al uso común, especialmente a las aplicaciones biomédicas, sigue siendo un gran reto debido a la falta de un método de fabricación preciso y a la escasa biodegradabilidad de los materiales magnéticos.<sup>25,26</sup>

- NMs propulsados por campos eléctricos

Otro tipo de NM exógeno muy usado es el que usa como fuente de energía para su propulsión un campo eléctrico. Para ello, se usan NMs asimétricos, con una parte del NM más polar que la otra. Igualmente, los campos eléctricos de corriente alterna (CA), son los más usados para crear los campos eléctricos.<sup>27</sup> Los NMs son polarizados por el campo de CA, y esto induce una contracarga acumulada de forma asimétrica alrededor de los motores. Entonces, se genera un flujo electro-osmótico (movimiento de un líquido inducido por un potencial aplicado a través de un conducto) alrededor de los NMs, con una dirección dictada por el tipo de NM, así como la dirección del campo eléctrico. Este flujo es usado para propulsar los NMs, cuyo movimiento sigue la dirección del lado menos polarizable.<sup>28</sup>

- NMs propulsados por la luz

En este tipo de NM la luz se usa para activar una reacción fotoquímica (una reacción química iniciada por la absorción de energía en forma de luz), que gracias a su actividad consigue impulsar al NM.<sup>29</sup> Una de las ventajas de estos

---

<sup>25</sup> R. Galluzzi, et al. "Modeling, Design, and Validation of Magnetic Hysteresis Motors". *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, 2020.

<sup>26</sup> T. Zhang et al. "Research on the Directional Control of Direct Magnetic Field of the Locomotive Asynchronous Traction Motor". *Cyber Security Intelligence and Analytics*, 2019.

<sup>27</sup> X. Chen et al. "Small-Scale Machines Driven by External Power Sources". *Advanced materials*, 2018.

<sup>28</sup> C. Wyatt et al. "Supercolloidal Spinners: Complex Active Particles for Electrically Powered and Switchable Rotation". *Advanced functional materials*, 2018.

<sup>29</sup> R. Dong et al. "Visible-Light-Driven BiOI-Based Janus Micromotor in Pure Water". *Journal of the American Chemical Society*, 2017.

NMs luz es que se pueden controlar con gran facilidad: regulando la dirección de la luz y la intensidad de esta es posible controlar hacia donde se dirige el NM, y con qué velocidad hará ese movimiento. Además, la gran variedad de longitudes de onda que se pueden usar abre muchas posibilidades de diseño de NM. Actualmente se suele trabajar con luz que va desde la radiación ultravioletada (Rayos UV) hasta los rayos infrarrojos (IR), y muchas longitudes en este rango ya se han utilizado con éxito para propulsar NMs que responden a la luz. Sin embargo, la escasa penetrabilidad de los rayos UV y IR, así como de la luz visual, dificulta sus aplicaciones. Por esta razón también se está trabajando mucho con rayos X.<sup>30</sup>

- NMs propulsados por ultrasonidos y campos acústicos

Los campos acústicos y los ultrasonidos se han utilizado cada vez más para la propulsión y manipulación NMs, ya que son completamente inocuos para el cuerpo humano y además son muy fáciles de manejar.<sup>31</sup> Se ha visto que la forma asimétrica de los NMs da lugar a una distribución asimétrica de la presión acústica a partir de la dispersión de las ondas acústicas incidentes en las superficies de las partículas, lo cual produce la propulsión. En la práctica, el control del movimiento, especialmente una aceleración o desaceleración de la velocidad, puede controlarse directamente sintonizando la fuerza del campo acústico o de ultrasonidos.<sup>32</sup>

### 3.4.3 NMs exógenos vs NMs endógenos

De forma muy parecida a lo que pasa con las NPs con activación interna y externa, la principal ventaja de los NMs endógenos (respecto a los exógenos) es que son totalmente autosuficientes, y una vez dentro del cuerpo son capaces de moverse y realizar su tarea de forma autónoma, mientras que los NMs exógenos requieren de alguien que los controle, lo cual podría resultar ser oneroso. No obstante, este último tipo de NM tiene la gran ventaja que permite un gran control sobre la dirección que toman los NMs, así como su velocidad.

---

<sup>30</sup> C. Chen et al. "Light-Steered Isotropic Semiconductor Micromotors". *Advanced materials*, 2017.

<sup>31</sup> L Sonntag et al. "Nano-and Micromotors Designed for Cancer Therapy". *Molecules*, 2019.

<sup>32</sup> F. Soto et al. "Acoustically propelled nanoshells". *Nanoscale*, 2016.

Entonces, un mayor número de NMs podrá llegar a su destinación y será necesario un menor número de ellos, lo cual podría compensar el mayor coste de esta opción.

### 3.5 ¿Cómo se consigue una administración dirigida con NTs y NMs?

Normalmente, los NTs se introducen en el sistema circulatorio, y gracias a este se distribuyen (de forma pasiva) por todo el cuerpo. Asimismo, a diferencia de un fármaco tradicional, que una vez introducido en el organismo afecta a todos los tejidos del cuerpo, los NTs, gracias a su funcionalización, pueden detectar el tejido diana y quedarse en él. Esto se puede conseguir de diferentes formas, normalmente aprovechando el hecho que los ligandos le permiten a la NP de engancharse a unos receptores específicos que solo tienen las células del tejido que interesa.

Se ha comprobado que cuantos más ligandos se le añadan a una nanopartícula mejor será su selectividad. Por eso, es muy importante hacer investigación para llegar a conocer cuantas más parejas de “receptores-ligandos” posible, y así poder usar NPs cada vez más específicas y con una mayor eficiencia.<sup>33</sup>

Sin embargo, también es posible conseguir que los NTs se muevan, es decir, transformarlos en NMs. Esta opción permite que los fármacos lleguen aún mejor a su destino, ya que combinando NMs y NTs se consiguen unos NRs que pueden quedarse y penetrar aún más en el tejido deseado.

Dependiendo del tipo de NM y de su uso en la biomedicina, éste será introducido en el cuerpo de una forma u otra y se moverá de maneras muy diferentes. Asimismo, la característica común de todos los NMs es que tienen más facilidad de alcanzar lugares de difícil acceso que las simples NPs, gracias a su capacidad de propulsarse.

En el caso de los NMs exógenos, normalmente estos serán conducidos de donde sea que se encuentren hasta el tejido diana. Dependiendo de donde

---

<sup>33</sup> Xia Q.-S. et al. “Can Dual Targeting Enhance Cellular Uptake of Nanoparticles?” *Nanoscale*, 2017.



este se encuentre y del tipo de NM, se podrán introducir los NMs directamente en el flujo sanguíneo o se tendrán que inyectar directamente en el lugar concreto en el que se quiere que lleguen. En cambio, los NMs endógenos sí que tendrán casi siempre que ser introducidos cerca del sitio del cuerpo en el que tengan que transportar su contenido, y gracias a su movimiento tendrán un alto nivel de penetración dentro del tejido y de las células.

### 3.6 Nanopartículas mesoporosas de sílice

Entre los muchísimos tipos de nanopartículas que existen, la parte práctica de este TDI se va a centrar en las nanopartículas mesoporosas de sílice (o MSNPs, del inglés “mesoporous silica nanoparticles”).

Las MSNPs son un tipo de NP muy usadas hoy en día y que sirven principalmente como NTs. Están formadas por una matriz de enlaces de -Si-O- (dióxido de sílice) con una energía de enlace relativamente fuerte desde el punto de vista químico (de 452 KJ/mol).<sup>34</sup>

Normalmente tienen una forma esférica, y su característica más interesante es que presentan agujeros por toda su superficie (de ahí viene el adjetivo “mesoporosas”, porque tienen poros con un tamaño de aproximadamente 2nm de diámetro), en los que se pueden introducir sustancias y transportarlas gracias al uso de moléculas bloqueadoras (formando así nanoválvulas, llamadas “gatekeepers”), sensibles a algún tipo de estímulo. Sus poros les permite a las MSNPs de tener una capacidad de transporte de carga muy elevada en comparación con otras NPs similares. Además, las MSNPs pueden ser NTs con activación tanto interna como externa: modificando el tipo de molécula usada para las nanoválvulas se puede controlar si la exposición a estímulos internos (como un cambio del pH) o externos (por ejemplo, la aplicación de ultrasonidos) desencadenará la apertura de los poros (normalmente gracias a un cambio en la estructura del gatekeeper) y permitirá

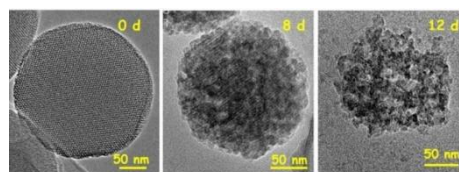


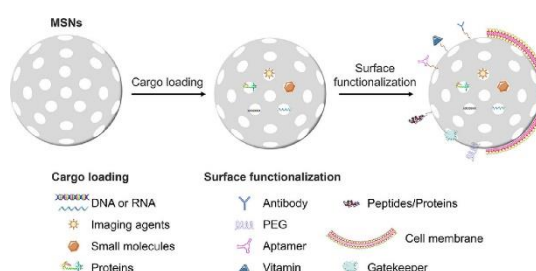
Ilustración 15: degradación de MSNPs al cabo de 8 y 12 días. Fuente: M. Vallet, 2017.

<sup>34</sup> Huheey J.E. et al. “Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity”. HarperCollins College Publishers, 1993.

la salida del cargo.

Una característica de las MSNP que las hace muy apropiadas para usarlas como NTs es su elevada biocompatibilidad, gracias a su capacidad de degradarse en los medios internos al cabo de un tiempo después de su introducción en el organismo (ver la *Ilustración 15*).

Además, las MSNPs son muy fáciles de funcionalizar, lo cual abre enormemente las posibilidades para que puedan interactuar con el medio que las rodea (*Ilustración 16*). En la mayoría de los casos, los ligandos sirven para detectar el tejido (o células) diana y quedarse en él. Se ha comprobado que



*Ilustración 16: carga y funcionalización de una MSNP con diferentes moléculas. Fuente: Huang R. et al, 2020.*

cuantos más ligandos se le añadan a una MSNP mejor será su selectividad.<sup>35</sup> Asimismo, también es muy común funcionalizarlas con enzimas, especialmente enzimas biocatalíticas como la ureasa, la glucosa oxidasa y la catalasa, para conseguir una propulsión endógena.<sup>36</sup>

Además, todas las características de las MSNPs son muy fácilmente controlables y sintonizables: durante su producción, variando la composición molar de los reactivos, el tipo de reactivos y las condiciones de reacción, se pueden obtener MSNPs con diferentes tamaños de partícula, forma y volumen de poro. Entonces, permiten tener un muy buen control sobre las características farmacocinéticas de la nanopartícula (la farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo. Trata de dilucidar qué sucede con un fármaco desde el momento en el que es administrado hasta su total eliminación del cuerpo).<sup>37</sup>

<sup>35</sup> Xia Q.-S. et al. "Can Dual Targeting Enhance Cellular Uptake of Nanoparticles?" *Nanoscale*, 2017.

<sup>36</sup> A. Llopis-Lorente et al. "Enzyme-Powered Gated Mesoporous Silica Nanomotors for On-Command Intracellular Payload Delivery." *ACS Nano*, 2019.

<sup>37</sup> M. Vallet-Regí et al. "Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights". *National center for Biotechnology Information*, 2017.

Obviamente, las MSNPs no son perfectas, y tienen algunos inconvenientes respecto a otras NPs. En primer lugar, aún no se ha creado ningún proceso industrial que permita una producción masiva y a gran escala de MSNPs. Este hecho comporta una subida relevante en los precios de producción. Efectivamente, por ahora ni siquiera se ha demostrado que su proceso de producción sea escalable.<sup>38</sup>

En segundo lugar, también se tendría que investigar mejor su toxicidad y las posibles reacciones alérgicas debido a la inmunogenicidad (capacidad que tiene un antígeno de activar el sistema inmunitario e inducir una respuesta inmune) que podría causar en humanos, ya que aunque hasta el momento no se hayan encontrado problemas de este tipo aún no se tienen suficientes datos para poder asegurar que no surgirán en un futuro.

De igual manera, se tendrían que entender mejor los mecanismos detrás de la degradación de las MSNPs, porque aún no se conocen todos los factores que influyen en este proceso. Es de vital importancia que no se degraden antes de tiempo, ya que de lo contrario se liberaría el fármaco en un lugar que podría resultar dañino para el cuerpo.

### 3.7 Cáncer de vejiga

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y actualmente carece de tratamientos clínicos eficaces, que además suelen presentar graves efectos secundarios. El cáncer de vejiga es el noveno más frecuente en todo el mundo<sup>39</sup> y, a pesar de tener buenas tasas de supervivencia, las recaídas son frecuentes (50%) y la respuesta al tratamiento suele ser pobre en los casos de recidiva.<sup>40</sup> Por estas razones es necesario desarrollar métodos más eficaces para curar este tipo de cáncer, capaces de penetrar y administrar fármacos en la región del tumor.

En este apartado del TDI primero se va a describir cómo es y cómo funciona

---

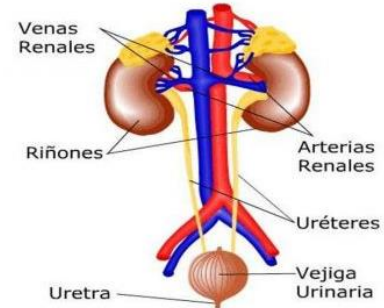
<sup>38</sup> Shi J., Kantoff P.W., Wooster R., Farokhzad O.C "Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities". *Nat. Rev. Cancer*, 2016

<sup>39</sup> Mura, S. et al. "Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery". *Natural Materials*, 2013

<sup>40</sup> Llopis-Lorente, A. et al. "Hybrid Mesoporous Nanocarriers Act by Processing Logic Tasks: Toward the Design of Nanobots Capable of Reading Information from the Environment". *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018

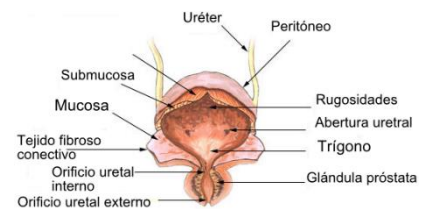
esta enfermedad, y luego se comparará teóricamente los tratamientos actuales y un posible tratamiento con NRs. Se va a empezar describiendo el órgano que se está tratando.

La vejiga urinaria es un órgano hueco músculo-membranoso que forma parte del sistema urinario (*Ilustración 17*) y que recibe orina de los uréteres, la almacena y la expulsa, a través de la uretra, al exterior del cuerpo durante la micción.<sup>41</sup>



*Ilustración 17: el sistema urinario.*  
Fuente: AulaFacil

Está situada en la zona inferior del abdomen, y está constituida por varias capas (ver la *Ilustración 18* y la *Ilustración 19* para las partes de la vejiga):



*Ilustración 18: partes de una vejiga urinaria humana.* Fuente: Wikimedia commons b, 2010.

- 1) Capa serosa: un recubrimiento de grasa exterior de la vejiga.
1. Capa muscular: está formada por diferentes músculos lisos, entre los cuales destaco el músculo detrusor, que cuando se contrae expulsa la orina.
2. Capa mucosa, formada por:
  - 1) La lámina propia, un tejido conjuntivo.
  - 2) El epitelio de transición urinario (también llamado urotelio) que es un epitelio estratificado de entre cuatro y ocho capas de células, impermeable, y que está en contacto con la orina.

El cáncer de vejiga se da cuando se desarrollan células cancerosas en los tejidos que forman la vejiga. Esta enfermedad es cuatro veces más frecuente en hombres de más de 60 años.<sup>5</sup>

La mortalidad debida a este cáncer es bastante baja (la tasa de supervivencia a los 5 años desciende del 85% en aquellos con 65-70 años, a una tasa del

<sup>41</sup> Vejiga Urinaria. *Wikipedia*, 2021. Web: [https://es.wikipedia.org/wiki/Vejiga\\_urinaria](https://es.wikipedia.org/wiki/Vejiga_urinaria) [Última consulta: 21/06/21]

60% en mayores de 85 años)<sup>42</sup>, principalmente debido a que el 80% de los tumores vesicales son aún superficiales en el momento del diagnóstico. Asimismo, tiene una gran tendencia a reaparecer en zonas adyacentes a la lesión primaria. Además, un tercio de los tumores puede presentar metástasis en otros órganos en el momento del diagnóstico.<sup>43</sup>

Aunque es necesaria mucha más investigación sobre las causas de este cáncer, los principales factores de riesgo actualmente conocidos son: ser hombre, tener una edad avanzada, el hábito de fumar (las sustancias carcinógenas que contiene el tabaco son filtradas por los riñones y se concentran en la orina, donde entran en contacto con la vejiga) y la exposición a ciertos tóxicos industriales (caucho, cuero, pintura, petróleo, tintes...), que pueden introducirse en el organismo por inhalación, ingestión o absorción cutánea.

### 3.7.1 Síntomas

Uno de los síntomas iniciales más comunes de este cáncer es la presencia de sangre en la orina (hematuria). Asimismo, de vez en cuando el cáncer de vejiga también puede causar cambios al orinar, tales como orinar con más frecuencia de lo habitual, dolor o ardor al orinar, tener problemas para orinar o tener un flujo débil de orina.

En cambio, un cáncer de vejiga en estado avanzado puede causar síntomas más graves, tales como no poder orinar, pérdida de apetito y peso, cansancio y dolor de huesos.<sup>44</sup>

### 3.7.2 Tipos

Hay diferentes tipos de cánceres de vejiga, dependiendo del aspecto de las células del tumor al microscopio. Los 3 tipos principales son:

---

<sup>42</sup> Andreassen, B. K. et al. "Incidence and Survival of urothelial carcinoma of the urinary bladder in Norway 1981-2014". *BMC Cancer*, 2016.

<sup>43</sup> Dolores, M. *Webconsultas*, 2016. Web: <https://www.webconsultas.com/salud-al-dia/cancer-de-vejiga/cancer-de-vejiga-6101> [Última consulta: 20/06/21]

<sup>44</sup> *American cancer society*, 2019. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-y-sintomas.html> [Última consulta: 15/06/21]

1. Carcinoma urotelial o de transición, que representa alrededor del 90% de todos los cánceres de vejiga. Comienza en las células uroteliales, que recubren el interior de la vejiga.
2. Carcinoma de células escamosas, que representa aproximadamente el 4% de los diagnósticos. Las células escamosas se desarrollan en el revestimiento de la vejiga en respuesta a la irritación y la inflamación.
3. Adenocarcinoma, que representa aproximadamente el 2% de todos los cánceres de vejiga y se desarrolla a partir de células glandulares.<sup>45</sup>

Debido a que la gran mayoría de los cánceres de vejiga son uroteliales y a la gran diferencia que hay entre estos y los demás tipos de cánceres, de ahora en adelante el TDI solo se centrará en el urotelial.

### 3.7.3 Etapas

Para hacer una estadificación del cáncer (es decir, determinar cuanto cáncer está en el cuerpo y donde está situado), se suele usar el método de clasificación TNM, que describe la extensión del cáncer en el paciente.

- iv. La letra T describe cuán lejos el tumor primario ha crecido por la pared de la vejiga y si ha llegado a los tejidos adyacentes.
- v. La letra N indica si existe alguna propagación del cáncer a los ganglios o nódulos linfáticos adyacentes a la vejiga. Los ganglios linfáticos son unas estructuras con forma de alubia que filtran el líquido linfático y contienen linfocitos (glóbulos blancos) que sirven para luchar contra infecciones y enfermedades. Hay cientos de ganglios linfáticos conectados entre sí por los vasos linfáticos distribuidos por todo el cuerpo.<sup>46</sup>

---

<sup>45</sup> *Cancer.net*, 2020. Web: <https://www.cancer.net/cancer-types/bladder-cancer/introduction> [Última consulta: 21/06/21]

<sup>46</sup> Instituto nacional de cáncer. Web: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/ganglio-linfatico> [Última consulta: 29/09/21]

- vi. La letra M indica si el cáncer se ha propagado o no (ha hecho metástasis) a lugares distantes, como a otros órganos (tales como los pulmones o el hígado) o ganglios linfáticos que no están cerca de la vejiga.

Junto a cada letra también se pone un número, que indica el tamaño del tumor y cuánto se ha propagado. Cuanto más alto sea el número, mayor será el tamaño del cáncer.

Tumor primario (**T**) (Ilustración 19):

- **TX**: No es posible medir el tumor.
- **T0**: No es posible encontrar el tumor.
- **Tc1s**: Se han encontrado células anormales, pero estas no se han propagado. Esto se denomina carcinoma in situ.

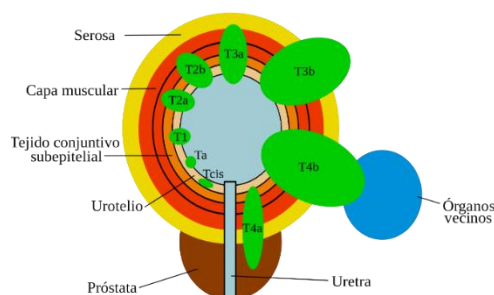


Ilustración 19: diagrama mostrando los estadios T de un cáncer de vejiga. Fuente: Wikimedia commons c, 2009.

- **T1, T2, T3, T4**: Indican el tamaño del tumor primario y cuánto se ha propagado al tejido que lo rodea.

Nódulos linfáticos (**N**):

- **NX**: No es posible evaluar los ganglios linfáticos
- **N0**: No se encontró cáncer en los ganglios linfáticos cercanos
- **N1, N2, N3**: Número y ubicación de ganglios linfáticos comprometidos a los que se ha propagado el cáncer

Metástasis (**M**):

- **MX**: No es posible evaluar la metástasis
- **M0**: No se encontró metástasis (el cáncer no se ha propagado)
- **M1**: Se encontró metástasis (el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo)

Con base en los valores TNM y otros factores se puede asignar un estadio (o etapa) al cáncer. Los distintos cánceres se estadifican de formas diferentes. Por ejemplo, el cáncer de colon estadio III no es lo mismo que un cáncer de

vejiga estadio III. En general, un estadio más alto se refiere a un cáncer más avanzado.<sup>47</sup> En el caso del cáncer de vejiga, las etapas a las que puede pertenecer son las siguientes:

- Etapa 0: o estadio inicial, donde el tumor es muy superficial y afecta únicamente al revestimiento interno de la vejiga.
- Etapa I: aunque se ha extendido por el tejido interno de la vejiga, no afecta todavía a la pared muscular.
- Etapa II: el cáncer afecta también a los músculos de la vejiga.
- Etapa III: la enfermedad se ha propagado a la pared muscular de la vejiga, al tejido circundante e, incluso, al aparato reproductor.
- Etapa IV: Las células cancerosas alcanzan la pared del abdomen o los ganglios linfáticos cercanos. Puede que exista metástasis en órganos más alejados como el hígado, los pulmones o los huesos.<sup>48</sup>

#### 3.7.4 Tratamientos tradicionales

El tratamiento del cáncer de vejiga depende del estadio en que se encuentre el tumor en el momento del diagnóstico. Si el cáncer aún no ha invadido el tejido muscular (por tanto, de tipo Tcis-T1, N0 y M0), actualmente se recomienda realizar una resección transuretral de un tumor de vejiga, es decir, se remueve el cáncer usando un catéter enganchado a un cistoscopio. Además, también se suele realizar quimioterapia (administrar fármacos al paciente que maten al tumor. Normalmente se suelen introducir directamente en la vejiga. El medicamento más usado es la mitomicina C), radioterapia (destruir las células tumorales utilizando para ello radiaciones X de alta energía. La radioterapia está especialmente indicada cuando hay varios tumores de pequeño tamaño en la superficie interna de la vejiga) o inmunoterapia (administrar fármacos que hacen que el propio sistema inmunológico del paciente haga frente a las células tumorales. Se suele usar la vacuna de la tuberculosis (BCG-bacilo Calmette-Guerin)) para disminuir el riesgo de recidiva. Por ejemplo, la

---

<sup>47</sup> MedlinePlus, 2021. Web:

<https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000850.htm> [Última consulta: 21/06/21]

<sup>48</sup> "Bladder cancer". *Wikipedia*, 2021. Web: [https://en.wikipedia.org/wiki/Bladder\\_cancer](https://en.wikipedia.org/wiki/Bladder_cancer) [Última consulta: 21/06/21]



inmunoterapia disminuye hasta casi la mitad el riesgo de recidivas del tumor.<sup>49</sup>

Alternativamente, en caso de que el cáncer haya invadido el tejido muscular lo más común es realizar, mediante una cirugía, una cistectomía parcial o radical, dependiendo del estadio tumoral. Una cistectomía consiste en la extirpación quirúrgica de la vejiga urinaria (en el tipo de cistectomía más radical, además de la vejiga también se extirpan los tejidos que la circundan y, en ocasiones, incluso la uretra).

Cuando se extirpa toda la vejiga, se puede reconstruir algo parecido a ésta que haga sus funciones (neovejiga) mediante una porción de intestino a la que se da forma de bolsa y que recolectará la orina producida por los riñones. En otros casos se deriva a los uréteres a un tramo del colon (sigma) para que se elimine por allí la orina, necesitando entonces una bolsa adherida a la piel para recolectarla.

Finalmente, en casos en los que ya hay metástasis (M1) se usa la quimioterapia.<sup>50</sup>

Como he explicado anteriormente, el cáncer de vejiga tiene un alto riesgo de recidiva. Esto es debido en parte al hecho que para que los medicamentos lleguen a su destino tienen que superar unas barreras biológicas, que limitan los medicamentos que efectivamente llegan hasta el cáncer: sólo el 0,7% de la dosis de quimioterapia administrada alcanza el objetivo in vivo.<sup>51</sup>

### 3.7.5 Tratamiento del cáncer de vejiga con MSNPs

Contra un cáncer de vejiga, las MSNPs se tendrían que usar en el contexto de un cáncer en estadio inicial, y lo ideal sería usarlas de forma complementaria a otras formas de tratamiento para eliminar el tumor. Por ejemplo, se podrían usar después de una resección transuretral (es decir, se remueve el cáncer usando un catéter) en lugar de una quimioterapia “clásica” o de una inmunoterapia, ya que sólo el 0,7% de la dosis de quimioterapia administrada

---

<sup>49</sup> Kamat, Ashish M; Hahn, Noah M; Efstathiou, Jason A; Lerner, Seth P; Malmström, Per-Uno; Choi, Woonyoung; Guo, Charles C; Lotan, Yair et al. “Bladder cancer”. *The Lancet*, 2016.

<sup>50</sup> “Cáncer de vejiga”. *Wikipedia*, 2021. Web:

[https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer\\_de\\_vejiga](https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer_de_vejiga) [Última consulta: 21/06/21]

<sup>51</sup> S. Wilhelm et al. “Analysis of nanoparticle delivery to tumours”. *Nat. Rev. Mater.*, 2016.

alcanza el objetivo in vivo,<sup>52</sup> mientras que las MSNPs tienen el potencial para administrar mayores cantidades de fármaco: han demostrado mejores propiedades de focalización<sup>53</sup> y una mayor eficacia en la administración de fármacos en comparación con las partículas pasivas.<sup>54</sup>

Para usar MSNPs contra el cáncer de vejiga, una de las maneras más lógicas de funcionalizar la NP sería con la enzima ureasa (consiguiendo así MSNMs), que serviría como fuente de propulsión, ya que la vejiga es un órgano con alta concentración de urea en su interior (el sustrato que se cataliza con la ureasa). En este caso no convendría usar una propulsión exógena, porque este tipo de propulsión es muy útil para conseguir que todos los NMs vayan en una única dirección, y sin embargo, en este caso el uso de los NMs sería precisamente necesario para acabar de eliminar a todas las células de cáncer que hayan quedado por las paredes de la vejiga tras una resección, y no se sabe dónde están (ni si ha quedado alguna). En cambio, usando MSNPs funcionalizadas con ureasa, se conseguiría una difusión mejorada (respecto a una NP sin enzima) que les permitiría explorar áreas más grandes que la difusión pasiva, así como penetrar a más profundidad en el tumor una vez encontrado.<sup>55</sup> Una característica de la ureasa es que esta, cuando degrada la urea, hace que baje el pH del medio, lo cual puede resultar fatal para la supervivencia de las células. Este efecto puede ser muy positivo para eliminar a las células cancerígenas, pero podría asimismo causar. Este es el efecto que se estudiará en la parte práctica.

Obviamente, también sería necesario funcionalizar los NMs con alguna molécula que sea capaz de detectar a las células de cáncer de vejiga, para que los NMs, una vez llegados al tumor se puedan fijar a él y penetrar dentro de las células. Igualmente, cada NM también tendría que llevar algún tipo de fármaco para poder eliminar a las células (convirtiéndose así en un NT).

---

<sup>52</sup> S. Wilhelm et al. "Analysis of nanoparticle delivery to tumours". *Nat. Rev. Mater*, 2016.

<sup>53</sup> Z. Wu et al. "Near-Infrared Light-Triggered "On/Off" Motion of Polymer Multilayer Rockets". *ACS Nano*, 2014.

<sup>54</sup> F. Peng et al. "Micro/nanomotors towards in vivo application: cell, tissue and biofluid". *Chem. Soc. Rev.*, 2017.

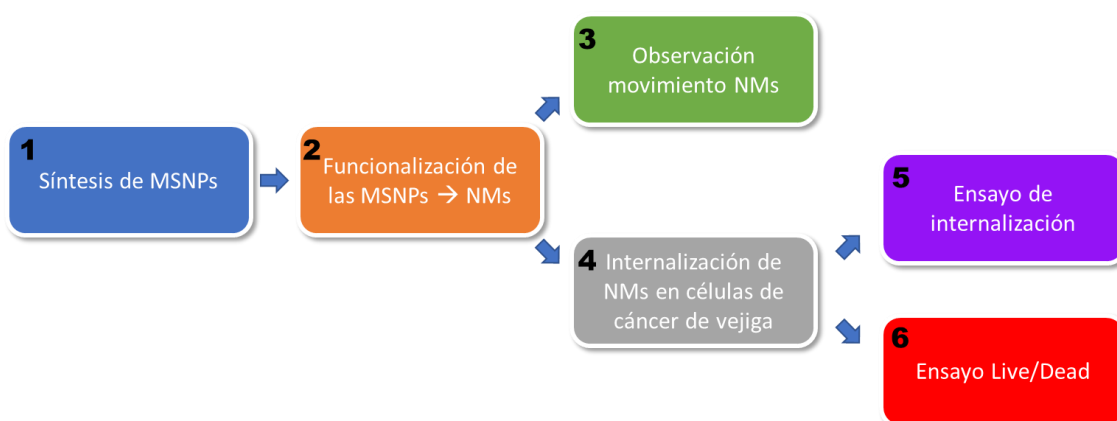
<sup>55</sup> Hortelão, A. et al. "Targeting 3D Bladder Cancer Spheroids with Urease-Powered Nanomotors". *ACS Nano*, 2019

Una de las moléculas más usadas como medicamento antitumoral con las MSNMs es la doxorrubicina, un antibiótico ampliamente utilizado como agente quimioterápico. Asimismo, también existen otras muchas formas para erradicar un cáncer vesical, que aún tienen que ser exploradas e investigadas más a fondo.

## PARTE PRÁCTICA

### 4. Experimentación

En esta parte práctica seguiré el esquema que se muestra en la *Ilustración 20*. Primero realizaré una síntesis de MSNPs (1), que funcionalizaré en el apartado siguiente con la enzima ureasa, obteniendo de esta forma NMs (2). Posteriormente, realizaré una observación al microscopio para ver el movimiento de los NMs en diferentes concentraciones de urea (3). También internalizaré las NMs en placas de cultivo celulares (4), para poder determinar si efectivamente los NMs pueden penetrar dentro de las células tumorales (5) y para establecer el porcentaje de células que sobreviven al cabo de 24 horas de estar incubando los NMs (6).



*Ilustración 20: esquema que se ha seguido en la parte práctica.*

#### Medidas de seguridad:

A lo largo de todos los experimentos siempre usaré bata y guantes de laboratorio. Además, trabajaré en la cabina de gases en todos los procesos en los que habrá la posibilidad que alguna sustancia se volatilice, así como usaré gafas de laboratorio cuando sea necesario. Finalmente, aunque no se explica en la sección de procedimientos, haré una gestión de todos los residuos generados a lo largo de la experimentación, ya que el laboratorio del IBEC en el que realizaré la parte práctica tiene todos los contenedores y protocolos necesarios para gestionarlos.

#### 4.1 Reactivos, materiales e instrumentos

En la siguiente tabla (*Tabla 1*) hay todos los reactivos, materiales e instrumentos que usaré a lo largo de la parte práctica. Al lado de cada elemento usado indico en qué experimento los necesitaré. Las fórmulas moleculares de los reactivos, sus símbolos de seguridad y la fotografía de todos los materiales e instrumentos se encuentran en los anexos.

REACTIVOS	Experimento
570 mg de CTAB al 99% de pureza	1
35g de TEOA 99%	1
1.5mL de TEOS 99%	1
Etanol y metanol 99%	1, 2
HCl 37%	1
Suspensión de MSNPs 9.2mg/mL en etanol	2
(3-aminopropil)triethoxisilano (APTES)	2
Tampón fosfato salino (PBS)	2, 5, 6
Glutaraldehído al 25%	2
Enzima ureasa	2
Suspensión de MSNPs-Ur	3
Urea	3, 4
Suspensión de MSNPs-Ur a 0.5 mg/mL funcionalizadas con FITC	4
3 placas de cultivo con 8 pocillos (conteniendo 75k células por pocillo)	4
Medio de cultivo para células DMEM (500mL)	4
DAPI	5
WGA	5

Medio de cultivo para células DMEM (alícuota)	5, 6
“LIVE/DEAD invitrogen Viability/Cytotoxicity Kit” para células mamíferas: calceína-AM y homodímero-1 de etidio	6
<b>MATERIALES</b>	<b>Experimento</b>
Balones de fondo redondo con 1 y 3 cuellos	1, 2
Espátula	1, 3, 4
Platito para balanza	1
Vial	1, 3, 4
Micropipeta ((10.0 ± 0.1)μL, (100 ± 1)μL, (200 ± 2)μL, (100 * 10 ± 10)μL)	1, 2, 3, 4, 5, 6
Pipeta Pasteur (1.0 ± 0.1)mL	1, 4, 5, 6
Probeta	1, 2, 3
Tubo para centrífuga (15 ± 1)mL y (50 ± 1)mL	1, 2, 5, 6
Tubo cónico eppendorf	1, 3, 5, 6
Placa de Petri marca TPP Ø(40 ± 1)mm	3
Tubo falcon con fondo plano (50 ± 1)mL	4
<b>INSTRUMENTOS</b>	<b>Experimento</b>
Balanza (capacidad máxima: (120.0000 ± 0.0001)g)	1, 3, 4
Agitador (con mosca magnética) + Condensador + Placa calefactora +Termómetro	1, 2
H2O milliQ (dispensador)	1, 2, 3
Centrifugadora Avanti J-26 XPI	1
Campana extractora de gases	1
Vortex VWR	1
Sonicador VWR USC-TH	1
Thermomixer comfort eppendorf	1

Centrífuga eppendorf 5804	2
Agitador rotativo DLAB MX-RD-E	2
Microscópio Leica DMI8 con cámara Hamamatsu C11-40-22C y software LAS X	3, 5, 6
Incubador de células eppendorf CellXpert	4, 5, 6
Calentador Thermo Scientific TSGP05	4, 5, 6
Cabina de bioseguridad nivel II Telstar	4, 5, 6

Tabla 1: reactivos, materiales e instrumentos usados a lo largo de la parte práctica.

## 4.2 Síntesis de MSNPs (1)

### Objetivo

El objetivo de esta primera parte del experimento es sintetizar un lote de MSNPs. Más concretamente, las MSNPs que se crearán tendrán un diámetro de 450nm de diámetro.

### Fundamento teórico

El CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio,  $C_{19}H_{42}BrN$ ) es un detergente y una molécula anfipática, vale decir, que tiene una parte hidrofílica y otra hidrófoba. Por lo tanto, al ponerse en contacto con agua forma diferentes micelas, que van tomando estructuras cada vez más complejas hasta llegar a la forma más estable. Como se puede ver en la *Ilustración 21*, las moléculas de CTAB se organizan con una forma cilíndrica con su parte hidrofílica hacia el exterior, y los tubos se juntan radialmente hasta formar una especie de esfera. Esta esfera será el esqueleto sobre el que “crecerá” la sílice y que al quitarse dejará tras de sí los mesoporos.<sup>56</sup>

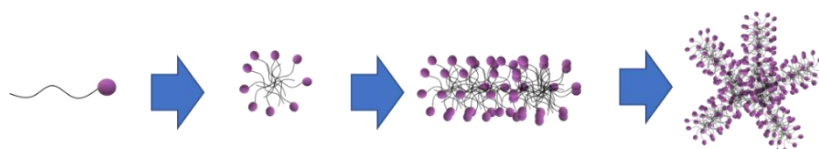
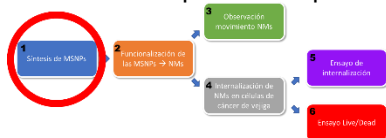


Ilustración 21: proceso de formación de las micelas de CTAB. Fuente: propia.

<sup>56</sup> “Bromuro de hexadeciltrimetilamonio”. Wikipedia, 2021. Web: [https://es.wikipedia.org/wiki/Bromuro\\_de\\_hexadeciltrimetilamonio](https://es.wikipedia.org/wiki/Bromuro_de_hexadeciltrimetilamonio) [Última consulta: 29/09/21]



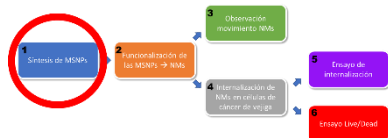
El TEOS (ortosilicado tetraetilo) es un precursor de la sílice. Es un líquido incoloro que se degrada en el agua y se tiene que conservar en una atmósfera de Argón porque puede reaccionar con el aire. En este primer experimento se irá añadiendo gota a gota al esqueleto de CTAB, e irá “creciendo” alrededor de este, hasta haber ocupado todo el espacio que quede entre tubo y tubo de CTAB formando así una esfera de dióxido de silicio con nanotubos de CTAB dentro de sí.

Finalmente, el TEOA (Trietanolamina) es una molécula básica, que servirá como catalizador para que el TEOS se convierta en dióxido de silicio al entrar en contacto con el CTAB más rápidamente al bajar la energía de activación de esta reacción.

Gracias al uso de estas moléculas y al procedimiento que se seguirá, al final del proceso se obtendrán MSNPs de 450nm de diámetro. Aunque este dato no se podrá comprobar, ya que tendría que usar un microscopio electrónico, el proceso de síntesis descrito ya se ha realizado muchas veces, dando siempre como resultado MSNPs con estas características.

En este experimento, así como en el segundo y el tercero, se usará agua milliQ. Es agua “ultrapura”, es decir, que ha sido destilada, filtrada y purificada para que contenga la menor cantidad posible de moléculas en su interior que no sean H<sub>2</sub>O. Se llama de esta forma porque “milliQ” es el nombre que le ha dado la empresa que vende dispensadores para producirla.

A lo largo de este experimento y el siguiente se centrifugarán NPs. Este proceso provoca que se compacten todas las NPs en el fondo del tubo de centrifugación, formando un pellet. Para poder continuar trabajando con las NPs este se tendrá que romper, para que las NPs se resuspendan en el medio líquido en el que se encuentren. Para romper el pellet, primero se usa el Vortex, un instrumento que permite transmitir fuertes vibraciones a una muestra, y luego se tendrá que hacer uso de la sonicación. Esta consiste en usar ultrasonidos para agitar las partículas de una muestra. Con estos dos procesos las NPs se separarán y volverán a flotar en el medio.





## Procedimiento

1. Se introducen 20mL de agua milliQ en el balón de fondo redondo con 3 cuellos. Entonces, se miden 570mg de CTAB con la balanza (usando un platito para balanzas y la espátula), se pone dentro del balón y se mezcla la solución hasta que se haya vuelto homogénea y haya tomado un color blanquecino.
2. Se añaden al balón 35 gramos de TEOA, se coloca una mosca magnética dentro del balón y se pone a agitar durante 30 minutos a 95°C (a partir de este momento, siempre se trabajará dentro de la campana extractora de gases). Para que no se evapore la mezcla, se coloca debajo de un condensador.
3. Usando dos veces la micropipeta de 1000µL se toman 1.5mL de TEOS y se dejan en un vial (para reducir al mínimo el tiempo en el que el TEOS esté en contacto con el aire). Seguidamente, sin quitar el balón de la placa calefactora-agitador magnético (*Ilustración 22*) y usando una pipeta Pasteur se introducen en el balón los 1.5mL de TEOS gota a gota, y se vuelve a dejar el balón a 95°C por 2 horas. Una vez terminado, se quita el balón de la placa calefactora y se deja reposar durante unos 15 minutos.
4. Se vierte el contenido del balón en dos tubos para centrífuga, de forma que haya el mismo volumen en ambos tubos. Aproximadamente, tiene que haber 25mL en cada tubo. Después, se toman los tubos y se colocan dentro la centrifugadora, y se centrifugan por 5 minutos a 2500G, es decir, reciben una aceleración equivalente a 2500 veces la gravedad de la Tierra. (la temperatura a la que se centrifugan no es relevante).
5. Una vez terminada la centrifugación, en cada tubo se encontrarán en su fondo las NPs precipitadas. El resto de líquido que queda en el tubo se llama sobrenadante, que usando una micropipeta se quita y tira

*Ilustración 22: montaje para calentar, agitar magnéticamente y condensar el contenido del balón. Fuente: propia.*



*Ilustración 23: tubo de centrifugación con las NPs precipitadas en su interior y sin sobrenadante. Fuente: propia.*



(el tubo tiene que quedar cómo en la *Ilustración 23*). A continuación, se añaden unos 20mL aproximadamente de etanol en cada tubo, y para conseguir que las NPs se vuelvan a resuspender (es decir, que se separen las unas de las otras) se usa el vortex por un minuto para separar a los agregados más grandes, y luego 10 minutos en un sonicador para acabar de separar todos los agregados más pequeños que hayan quedado tras el uso del vortex.

6. Se vuelve a repetir todo este procedimiento 2 veces más, para un total de 3 centrifugaciones. Sin embargo, después de la tercera centrifugación se tendrá que añadir metanol (10mL en cada tubo) en lugar de etanol, y luego se seguirá el mismo procedimiento que antes para resuspender las NPs en el metanol.
7. Mientras tanto, en una probeta se tienen que mezclar 10mL de metanol con 2mL de HCl (al manejar este ácido se tendrá que trabajar con dos guantes por mano, gafas protectoras y usando la campana extractora). Cuando haya acabado la sonicación, se mezclará la solución de metanol y HCl con los dos tubos en un balón de un cuello, y se deja en el agitador, placa calefactora y condensador a 80°C durante toda la noche.
8. Se vuelve a distribuir el contenido del balón en dos tubos de centrifuga y se vuelve a centrifugar durante 5 minutos a 2500G. De la misma forma que antes, se quita el sobrenadante, se sustituye por etanol, se resuspenden las NPs (usando el vortex y el sonicador de la misma forma que antes) y se vuelven a centrifugar, por un total de 3 lavados. En ese momento, se une el contenido de los dos tubos de centrifuga, se marcan y se guarda el tubo con las MSNPs en el congelador (aproximadamente se tendrían que tener unos 25mL de MSNPs en etanol).
9. Finalmente, se busca encontrar la concentración de mg de NPs por mL de etanol, y para ello primero se toman 3 eppendorfs y se pesan. Después, se ponen (500±1) µL de etanol con NPs en cada eppendorf, se centrifuga por 5 minutos a 5000rpm, se quita el sobrenadante y se dejan secar usando el thermomixer. Una vez todo el etanol se haya evaporado se vuelven a pesar los eppendorfs, obteniendo así el peso de las NPs (usando la media de cada eppendorf).



## Resultados y análisis de los resultados

Los datos recopilados a lo largo de la síntesis de las NPs son los siguientes (Tabla 2):

	Masa eppendorf ( $X \pm 0.0001$ ) g	Masa eppendorf + NPs ( $X \pm 0.0001$ ) g	Masa NPs ( $X \pm 0.0002$ ) g por 500 $\mu\text{L}$
Eppendorf 1	1.1105	1.1152	0.0047
Eppendorf 2	1.1081	1.1126	0.0045
Eppendorf 3	1.1214	1.1261	0.0047
		Media masa NPs:	0.0046

Tabla 2: resultados de la medición de las masas de los eppendorfs con y sin MSNPs dentro

Ahora, con la masa de las NPs que se encuentran en 500 $\mu\text{L}$  de solución, es posible encontrar la concentración total de NPs por mL:

$$[MSNPs] = \frac{0.0046 \text{ g}}{500 \mu\text{L}} * \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 9.2 \text{ mg/mL}$$

La incertidumbre de esta concentración será:

$$\Delta m = (0.0046 \pm 0.0002) \text{ g} = (0.0046 \pm 4.35\%) \text{ g}$$

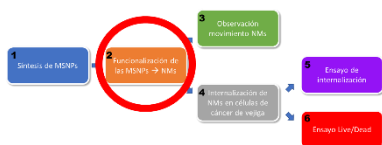
$$\Delta V = (500 \pm 1) \mu\text{L} = (500 \pm 0.2\%) \mu\text{L}$$

$$[MSNPs] = (9.2 \pm 4.55\%) \text{ mg/mL}$$

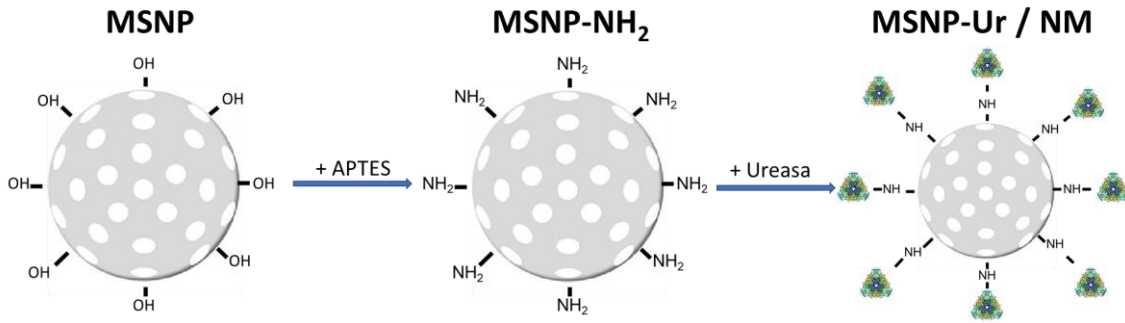
### 4.3 Funcionalización de las MSNPs con ureasas (2)

#### Objetivo

El objetivo de esta segunda parte del experimento es funcionalizar las MSNPs



obtenidas en la primera parte con la enzima ureasa. Para ello, primero tendrán que ser funcionalizadas con aminas (obteniendo MSNP – NH<sub>2</sub>), y luego se enlazarán las ureasas a las aminas, obteniendo MSNP – Ur, que son NMs (MSNMs, para ser exactos), siguiendo el proceso ilustrado en la *Ilustración 24*.

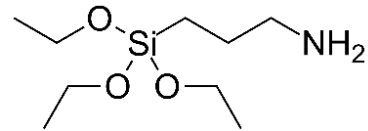


*Ilustración 24: proceso de funcionalización de una MSNP. Fuente: propia.*

## Fundamento teórico

Cuando no están funcionalizadas, las MSNPs tienen en su superficie grupos alcohol –OH (ver la *Ilustración 24*).

Para conseguir MSNP – NH<sub>2</sub>, se tendrá que usar una molécula llamada APTES (del inglés (3-Aminopropyl)triethoxysilane, *Ilustración 25*), que se unirá a los grupos -OH, reaccionando con un enlace éster (– O –) para que el APTES se enlace con la MSNP con un enlace Si – O – Si. Este proceso se llama silanización.

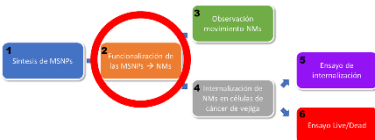


*Ilustración 25: molécula de APTES. Fuente: wikimedia commons e.*

A lo largo de este experimento se usarán diferentes reactivos, como el glutaraldehído, el PBS y la ureasa:

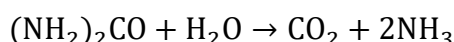
El glutaraldehído (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) es un compuesto químico usado principalmente como desinfectante y como agente fijador anterior a la tinción de una muestra o de su observación en el microscopio. Reacciona con el grupo amino, y es necesario para que la enzima ureasa pueda enlazarse con la MSNP – NH<sub>2</sub>.

El PBS (tampón fosfato salino en inglés) es una de las soluciones tampón más usadas en el ámbito biológico, pues sus características son muy parecidas a



las del líquido extracelular de los mamíferos. Permite mantener el pH bastante estable (a 7.4), y además se trata de una solución isotónica, es decir, que tiene la misma concentración de sales minerales que el interior de las células. El uso de PBS también será necesario para poder funcionalizar las MSNP – NH<sub>2</sub> con la ureasa.

Finalmente, la ureasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de urea ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO), el principal producto terminal del metabolismo de las proteínas en los mamíferos, de la siguiente forma:



Gracias a la acción de la ureasa se consigue transformar la urea en CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) y NH<sub>3</sub> (amoníaco). Debido al hecho que el amoníaco tiende a transformarse en el ion amonio, NH<sub>3</sub> + H<sup>+</sup> ⇌ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, y este disminuye el pH del medio (al aumentar la concentración de protones), la actividad de la ureasa disminuye el pH.

Este enzima tiene un peso molecular de 480kDa, y se encuentra en algunos bacterios, hongos y plantas superiores. Su temperatura óptima es de 60°C, y su pH óptimo es de 7,4.<sup>57</sup>

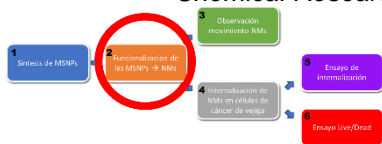
## Procedimiento

1. Se coge un balón de fondo redondo de un cuello y usando una probeta se le añaden 20.7mL de etanol, 10.5mL de agua milliQ y 3.8mL de suspensión de MSNPs en etanol (obtenida en el apartado anterior). Entonces, usando una micropipeta (de 100µL) se añaden 210µL de APTES y se deja el balón por una hora a 70°C con agitación magnética (*Ilustración 26*).
2. Se distribuyen los 35mL en tres tubos de centrifugación, y se realizan 4 lavados a 3500rpm durante 5 minutos usando la centrifugadora eppendorf 5804. Al final de



Ilustración 26: montaje para calentar y agitar magnéticamente el balón. Fuente: propia.

<sup>57</sup> P. Andrew et al. "70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned?". *Accounts of Chemical Research*, 1997.



cada lavado siempre se tiene que tirar el contenido de los tubos de centrifugación, pero mientras que tras los primeros dos lavados se usará etanol para volver a llenar los tubos, las dos últimas veces se usará agua milliQ (una vez se hayan vuelto a llenar, los tubos tendrán que pasar por el vórtex (30 segundos) para romper el pellet). Una vez terminado, se sonicarán los tres tubos durante 10 minutos. En este momento ya se habrán formado las MSNP – NH<sub>2</sub>.

3. Se vuelven a centrifugar 2 tubos a 1450G durante 5 minutos (usando la misma centrifugadora que antes), luego se quita el agua, se sustituye por PBS, se resuspenden las MSNPs y se añade el 10% del volumen de cada tubo en glutaraldehído. Posteriormente, se pondrán los dos tubos en el agitador rotativo durante 2 horas a 20rpm (colocadas como se muestra en la *Ilustración 27*).
4. Se tendrán que realizar 3 lavados, en los que se centrifugarán las MSNPs con PBS, con los mismos parámetros y centrífuga que la última vez, usando el vórtex por 30 segundos y sonicando por 10 minutos entre centrífugas para romper el pellet y resuspender las MSNPs.
5. Cuando las centrífugas ya hayan terminado, se añaden 3mg de ureasa por mL de volumen en cada tubo, se vuelven a colocar en el agitador rotativo y se dejan en él durante toda la noche.
6. Finalmente, se realizarán 3 lavados más a 1450 G por 5 minutos con PBS, rompiendo el pellet usando el vórtex entre una centrífuga y la otra.
7. Se vuelven a unir los dos tubos y se guardan la solución con MSNPs con ureasa (de ahora en adelante, MSNP-Ur o NMs) en el congelador.



Ilustración 27: posición de los 2 tubos para centrífuga en el agitador rotativo. Fuente: propia.

#### 4.4 Observación del movimiento de los NMs en urea (3)

### Objetivo

El objetivo de esta tercera parte de la parte práctica consiste en poner a los NMs en diferentes concentraciones de urea, y observar su movimiento con un microscopio óptico.



## Diseño experimental

En este experimento se intentará responder a la primera pregunta de investigación, que decía “¿Son las MSNPs-Ur capaces de moverse en una solución con urea?”.

Recordamos que la hipótesis es que “En presencia de urea la actividad de la enzima ureasa permitirá a las MSNPs difundirse más rápidamente que sin presencia de urea.”

Para realizar este experimento se mantendrán todas las variables controladas, excepto la variación de concentración de urea en el medio en el que se encontrarán las NPs (que es la variable independiente). La variable dependiente es el movimiento de las MSNPs-Ur a lo largo del tiempo, que se mostrará en forma de 6 fotos tomadas a intervalos regulares de 15 segundos des de la liberación de los MSNP-Ur en el medio con urea.

## Fundamento teórico

En este experimento se comprobará si la ureasa consigue, en presencia de urea, propulsar a las MSNPs. Aunque ya se ha demostrado que es posible, hasta el día de hoy no se sabe exactamente porqué genera movimiento: se desconoce cómo las propiedades catalíticas, estructurales y dinámicas de las enzimas afectan a la propulsión. Sin embargo, sí que se ha visto que el movimiento está directamente relacionado con la velocidad de la catálisis de la reacción.<sup>58</sup>

Asimismo, en este experimento (y en todos los que vendrán después de este) se usará un microscopio óptico invertido. Éste tiene la característica que, al contrario de los microscopios más típicos, tiene la fuente de luz y el condensador por encima de la muestra, mientras que los objetivos están colocados por debajo de él.

En la vejiga urinaria, la urea ( $\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH}_2$ ,  $M(\text{urea}) = 60\text{mol} * \text{L}^{-1}$ ) es

<sup>58</sup> X. Arqué et al. “Intrinsic enzymatic properties modulate the self-propulsion of micromotors.” Nature communications, 2019.



presente en concentraciones de entre 100 y 1000mM.<sup>59</sup> Por esta razón, las concentraciones de urea que se testarán fueron de 0, 150, 300 y 600mM.

## Procedimiento

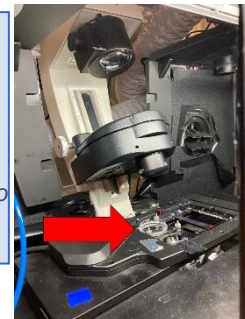
1. Se miden, usando la balanza, 0.180 gramos de urea, y se ponen usando una espátula en un vial. Se miden 10.0mL de agua milliQ con la probeta, se añaden al vial, y de esta forma se obtendrá una solución de 300mM de urea:

$$\frac{0.180gUrea}{10.0mL} * \frac{10^3mL}{1L} * \frac{1molUrea}{60gUrea} * \frac{10^3mM}{1M} = 300mM$$

2. Luego se repite lo mismo, pero con 0.090 y 0.360 gramos de urea, para obtener dos soluciones de respectivamente 150 y 600mM. Asimismo, también se tomarán 0.5mL de la solución con MSNP-Ur (obtenida en el apartado anterior) y se pondrán en un eppendorf.
3. Se realizan 4 vídeos, todos de la misma forma. El primero se realiza poniendo los NMs en agua milliQ, el segundo poniéndolos en la solución a 150mM, el tercero a 300mM y el último en la solución a 600mM.

4. Para cada grabación, se tendrán que tomar 2mL de la solución que se esté usando y colocarlos en una placa de Petri de 9.2cm<sup>2</sup>. Luego, ésta se introducirá en el microscopio de la forma que se muestra en la *Ilustración 28*, y usando una micropipeta se tomarán 5µL del eppendorf y se pondrán en la Placa de Petri.

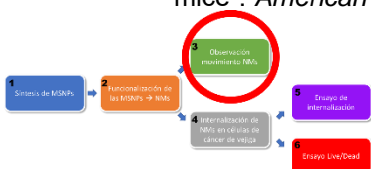
*Ilustración 28: colocación de la placa de Petri dentro del microscopio. Fuente: propia.*



*Ilustración 29: parámetros usados en el microscopio para tomar los vídeos. Fuente: propia.*

5. Inmediatamente tras la liberación de los MSNP-Ur se empezará la grabación, que se realizará con el microscopio configurado de la forma mostrada en la *Ilustración 29* (se gravó con un aumento de 2.5X).

<sup>59</sup> Baoxue Yang, Lise Bankir. "Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice". *American journal of physiology Renal physiology*, 2005.





## Resultados y análisis de los resultados

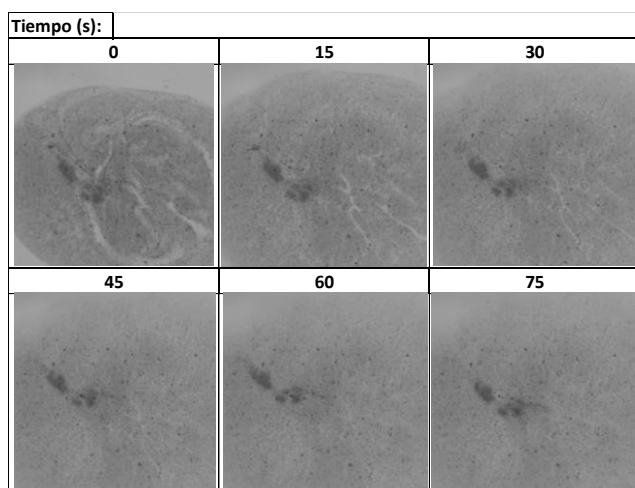


Tabla 6: difusión de las MSNPs-Ur con 0mM de urea.

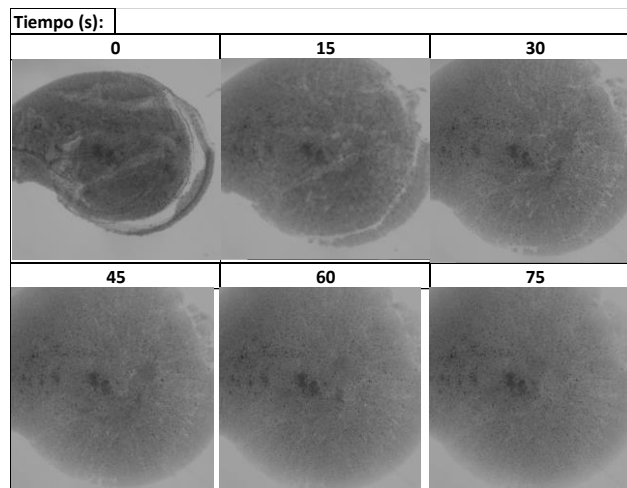


Tabla 5: difusión de las MSNPs-Ur con 150mM de urea.

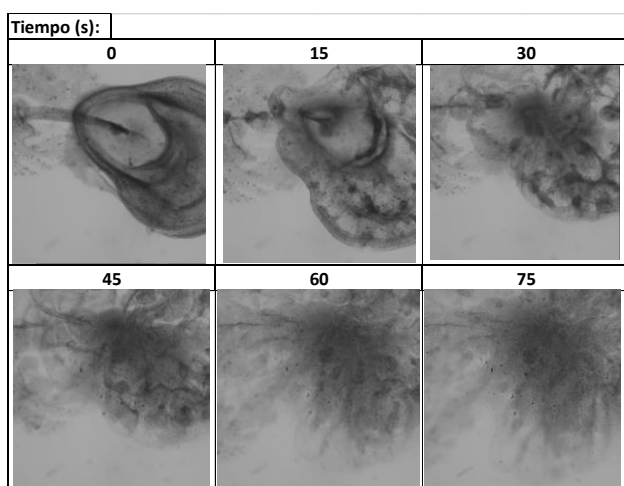


Tabla 4: difusión de las MSNPs-Ur con 300mM de urea.

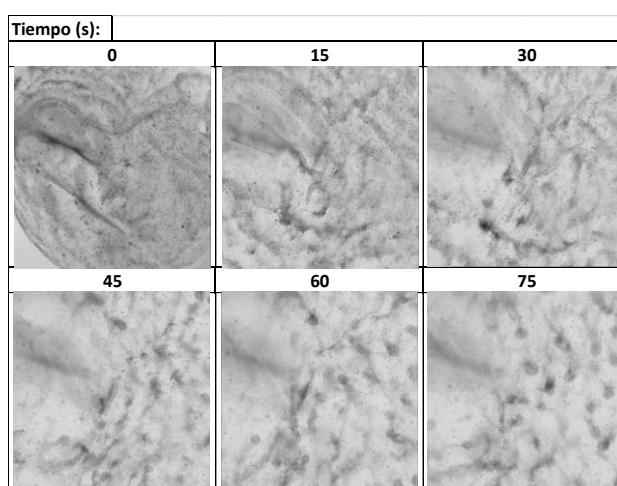


Tabla 3: difusión de las MSNPs-Ur con 600mM de urea.

Cómo se puede observar en las *Tablas 3-6*, cuanto mayor era la concentración de urea en el medio mayor era el movimiento realizado por las NPs. En el caso de las *Tablas 3 y 4*, los NMs se movieron principalmente por difusión simple y gracias al impulso recibido al dejar caer la gota de NMs dentro del medio. En cambio, en las *Tablas 5 y 6*, los NMs se mueven mucho más, y en menos de un minuto ya se han difundido mucho más que en los dos primeros casos. Por lo tanto, la primera hipótesis era correcta.

Es interesante notar que en las dos últimas tablas se ve que al cabo de un tiempo los NMs empiezan a tener un movimiento coordinado, formando interesantes estructuras tridimensionales que parecen seguir algún tipo de patrón.



Para acceder a los vídeos que se han realizado en este apartado, ir al Anexo III.

#### 4.5 Internalización de las MSNP-Ur en células cancerígenas (4)

### Objetivo

El objetivo de esta cuarta parte del experimento es internalizar los NMs en células de cáncer de vejiga de ratón MB49. Más precisamente, en este apartado se tendrán que preparar 3 placas de cultivo, de las cuales 1 servirá para el apartado 5 (el ensayo de internalización) y las otras 2 para el 6 (el ensayo Live/Dead).

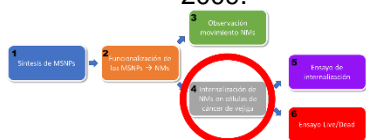
### Fundamento teórico

En esta sección de la parte práctica se van a internalizar los NMs enzimáticos en células de cáncer de vejiga (de tipo carcinoma urotelial) de ratón MB49. Se ha demostrado que tienen un comportamiento y unas características muy similares a células del mismo tipo de tumor humano.<sup>60</sup>

El primer paso del procedimiento será tomar una alícuota (de 25mL) del contenedor de DMEM (el medio de cultivo usado para que crezcan las células). Una alícuota es una pequeña parte del volumen o masa original del contenedor, y se usan por diferentes motivos: primero, porque en caso de contaminación solamente se tiraría la alícuota, y además no es necesario hacer demasiados ciclos de calentamiento-enfriamiento de todo el contenedor de producto.

Además, para trabajar con células se usará una cabina de bioseguridad. Esta ofrece un espacio de trabajo cerrado y ventilado, que permite asegurarse que ningún bacterio o virus pueda entrar contaminar a los cultivos celulares mientras estos están expuestos a la atmósfera de la cabina para poder trabajar con ellos. Para ello, utilizan un flujo de aire dirigido específicamente para controlar y arrastrar aerosoles y partículas, y la filtración HEPA para capturarlos

<sup>60</sup> C. Fanghong et al. "MB49 Murine Urothelial Carcinoma: Molecular and Phenotypic Comparison to Human Cell Lines as a Model of the Direct Tumor Response to Bacillus". J urol, 2009.



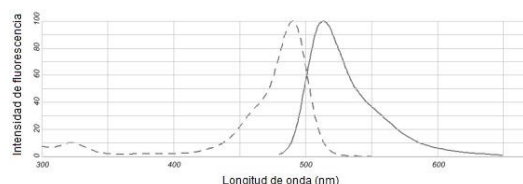
y eliminarlos de la corriente de aire.<sup>61</sup>

En este apartado de la parte práctica se usarán 3 placas de cultivo de 8 pocillos cada una, y en cada pocillo se encontrarán aproximadamente 75k células de cáncer (ver la *Ilustración 30*). Estas placas ya estarán preparadas para este experimento (no he podido participar en su preparación), y se encontrarán en el incubador. Mientras no las está usando las placas de cultivo tendrán que estar guardadas, para evitar contaminaciones y no dañar a las células. En el incubador tendrán que estar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al controlar el porcentaje de CO<sub>2</sub> en el aire del incubador se puede controlar el pH al que se encuentran las células.



*Ilustración 30:* foto de una placa de cultivo usada. Fuente: propia.

Finalmente, de este experimento en adelante siempre se trabajará con MSNPs-Ur funcionalizadas con FITC (Isotiocianato de fluoresceína). Esta funcionalización se ha llevado a cabo



*Ilustración 31:* picos de emisión y absorción del FITC. Fuente: wikimedia commons h.

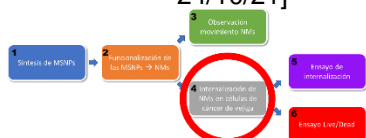
previamente a este experimento, sin que yo pudiera asistir a ella. De todos modos, el FITC es un fluorocromo, una molécula capaz de emitir fluorescencia (tiene un pico de emisión a 495nm) si es excitada a una cierta longitud de onda (su pico de absorción es de 519nm), como se muestra en la *Ilustración 31*. Servirá para poder determinar si los NMs han penetrado dentro de las células.<sup>62</sup>

## Procedimiento

1. Se quita el medio de cultivo DMEM del frigorífico y se pone a calentar en el calentador. Una vez haya llegado a 37°C, se quita y se coge una alícuota de 25mL y se pone en el falcon (tubo con fondo plano). Seguidamente, se devuelve el contenedor original de cultivo al congelador.
2. Se ponen dentro de un vial  $3.6 * 10^{-3}g$  de urea y se le añade 1mL de

<sup>61</sup> H. Kara et al. "Heat Sources in a Biosafety Cabinet Compromise Experimental and User Protection". *Applied Biosafety*, 2019.

<sup>62</sup> Fluorophores.org. Web: <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/252> [Última consulta: 24/10/21]

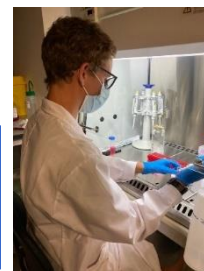


medio de cultivo. Así, la concentración de Urea en el vial será de 60mM (

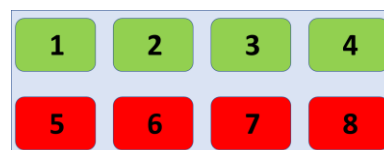
$$\frac{0.0036gUrea}{1.0mL} * \frac{10^3mL}{1L} * \frac{1molUrea}{60gUrea} * \frac{10^3mM}{1M} = 60mM).$$

- Se coge la primera placa de cultivo y se pone en la cabina de bioseguridad (a partir de este momento solamente se trabajará en esta cabina (*Ilustración 32*)). Usando la pipeta se quita todo el medio que tienen las células.

*Ilustración 32: trabajando en la cabina de bioseguridad. Fuente: propia.*



- Se numeran todos los pocillos (de la forma indicada en la *Ilustración 33*), y usando en cada caso la micropipeta más adecuada se pone en cada pocillo las cantidades de líquido indicados en la *Tabla 7*. Primero se añadirá el medio, entonces la solución con urea (el combustible de los nanomotores) y finalmente la solución con NMs, hasta un total de 200µL en cada pocillo.



*Ilustración 33: numeración de los pocillos en las placas de cultivo. Fuente: propia.*

Pocillo #	Medio (µL)	Combustible (µL)	¿Urea?	NMs (µL)
1	99.6	100	Sí	0.4
2	96	100	Sí	4
3	92	100	Sí	8
4	84	100	Sí	16
5	199.6	0	No	0.4
6	196	0	No	4
7	192	0	No	8
8	184	0	No	16

*Tabla 7: cantidades de líquido a añadir en cada pozo.*

- Se repite exactamente el mismo procedimiento, pero con la segunda y la tercera placa de cultivo. Así, se habrán obtenido 3 placas de cultivo idénticas.

#### 4.6 Ensayo de internalización (5)

### Objetivo

El objetivo de esta quinta parte del experimento es observar si se han internalizado los NMs en las células tumorales. No se harán réplicas de este experimento, ya que solo se realizará a un nivel cualitativo.



## Diseño experimental

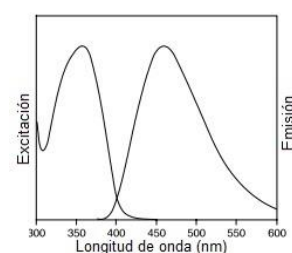
En este experimento se intentará responder a la segunda pregunta de investigación: ¿Pueden los MSNMs funcionalizadas con ureasa penetrar en células de cáncer de vejiga *in vitro*, con y sin presencia de urea en el medio?

La hipótesis formulada al comienzo del TDI fue que “En caso que haya urea presente en el medio, los NMs podrán internalizarse dentro de las células de cáncer de vejiga, mientras que no conseguirán entrar en las células sin urea en el medio”.

En este experimento se analizarán células que habrán vivido situaciones completamente iguales. La única diferencia entre las células de un pocillo y otro es el medio en el que habrán vivido en las últimas 24 horas, que se diferencia el uno del otro en los microlitros de solución NMs y urea (y DMEM) en cada uno (ver la *Tabla 7*).

## Fundamento teórico

Además de los NMs funcionalizadas con FITC, se teñirán las células con los marcadores fluorescentes DAPI i WGA. Por un lado, el DAPI ( $C_{16}H_{15}N_5$ ) es un marcador que se une a regiones ricas en adenina y timina de secuencias de ADN. Por lo tanto, sirve para marcar los núcleos de las células. Cuando se une a DNA, su máximo de absorción es a una longitud de onda de 358nm (ultravioleta) y su máximo de emisión es a 461nm (azul), como se ve en la *Ilustración 34*. Por lo tanto, en la microscopía de fluorescencia DAPI es excitado con luz ultravioleta, para después ser detectado a través de un filtro azul.<sup>63</sup>



*Ilustración 34: perfil de excitación y emisión de DAPI. Fuente: Wikimedia commons g.*

Por el otro lado, el WGA (del inglés Wheat Germ Agglutinin) también es un marcador fluorescente, pero que se une a glicoproteínas presentes en las membranas de las células, y por tanto tiñe las membranas celulares. Tiene un pico de absorción a una longitud de onda de 495nm (cian), y un pico de

<sup>63</sup> Invitrogen. “DAPI Nucleic Acid Stain”. *Molecular Probes*, 2006.



emisión a 519nm (verde).<sup>64</sup>

## Procedimiento

1. Se sacan los eppendorfs con el DAPI y el WGA del congelador y se van a llevar a temperatura ambiente. Una vez terminado, se ponen (usando las micropipetas adecuadas) 1µL de DAPI, 10µL de WGA y 1989µL de medio DMEM en un eppendorf de 2mL.
2. Se coge la placa de cultivo, y dentro la cabina de bioseguridad se les quita el medio usando la pipeta Pasteur. Entonces, se les ponen 150µL de DMEM para lavarlas, y se vuelve a quitar este medio para sustituirlo con 150µL procedentes de la solución del eppendorf preparada anteriormente con el DAPI i el WGA. Se deja la placa de cultivo en el incubador durante 20 minutos (a 37°C y 5%CO2), y luego se quita el medio por última vez y se ponen 150µL de PBS en cada pocillo.
3. Se prepara el microscopio y se empieza la observación y toma de imágenes de las células. Para ver las células teñidas se tiene que configurar el microscopio para irradiar cada colorante con su correspondiente longitud de onda de absorción (DAPI: 358nm, WGA: 454nm, FITC: 492nm), y para tomar imágenes a las correspondientes longitudes de emisión (DAPI: 361nm, WGA: 495nm, FITC: 519nm). Además, aunque la luz emitida por el FITC es verde, se mostrará como roja para diferenciarla de la emitida por el WGA.

## Resultados y análisis de los resultados

Para analizar los resultados de la internalización se ha tomado una foto de una parte de cada pocillo. Como se muestra en la *Ilustración 35*, arriba a la izquierda hay la imagen de la zona que se está observando (espectro visible), abajo a

Luz visible	DAPI (nucleos)	DAPI+WGA+FITC
WGA (membranas)	FITC (NMs)	

*Ilustración 35: organización de las imágenes tomadas en cada pocillo. Fuente: propia.*

<sup>64</sup> ThermoFisher. Web:

[www.thermofisher.com/order/catalog/product/W11261#:~:text=Wheat%20germ%20agglutinin%20\(WGA\)%20is,%E2%88%BC495%2F519%20nm](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/W11261#:~:text=Wheat%20germ%20agglutinin%20(WGA)%20is,%E2%88%BC495%2F519%20nm). [Última consulta: 24/10/21]



la izquierda, en verde, se puede ver la radiación emitida por WGA (las membranas celulares), en el centro arriba, en azul, la radiación emitida por DAPI (núcleos) y en el centro abajo, en rojo, la radiación emitida el FITC (NMs). A la derecha, en cambio, hay una mezcla de las 3 últimas imágenes (membranas, núcleos y NMs):

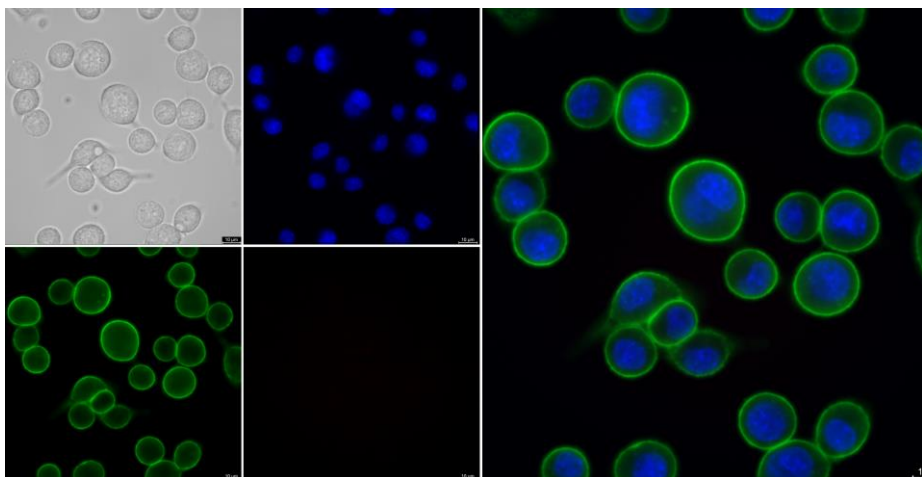


Ilustración 36: imágenes tomadas del pocillo 1. Fuente: propia.

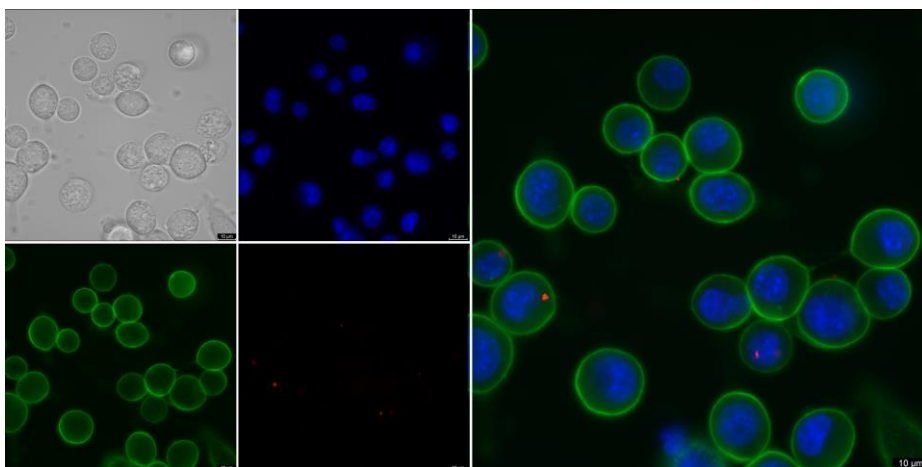


Ilustración 37: imágenes tomadas del pocillo 2. Fuente: propia.



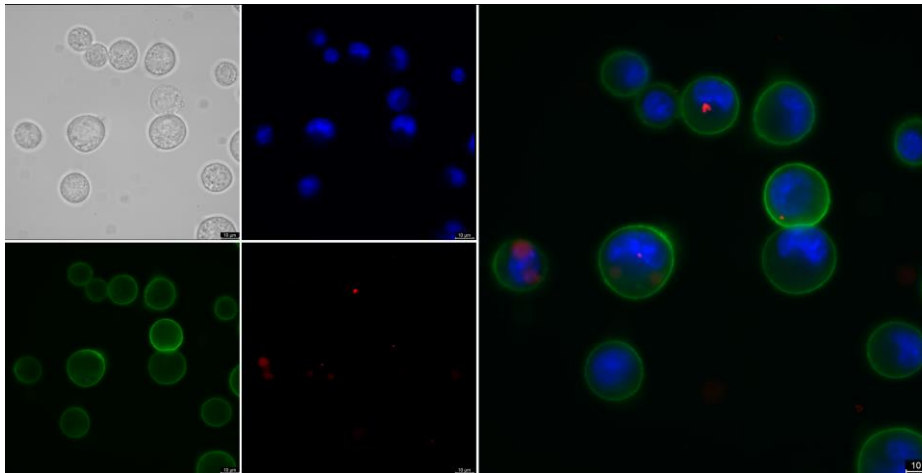


Ilustración 38:  
imágenes  
tomadas del  
pocillo 3.  
Fuente: propia.

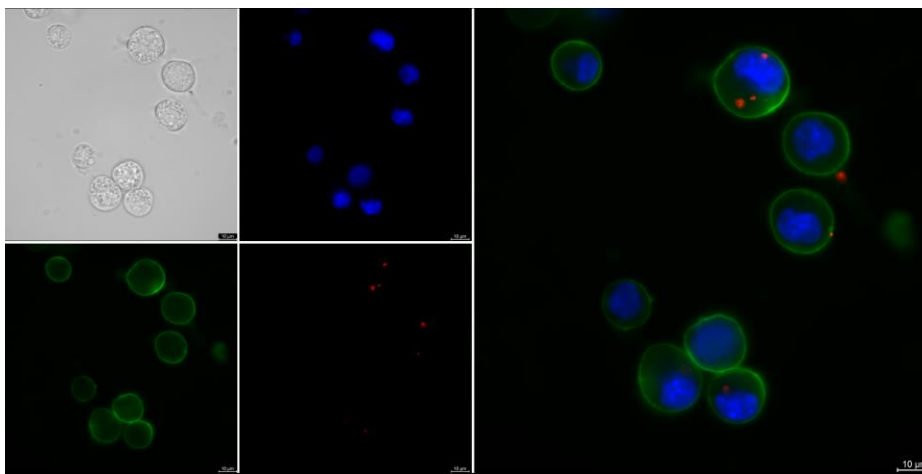


Ilustración 39:  
imágenes  
tomadas del  
pocillo 4.  
Fuente: propia.

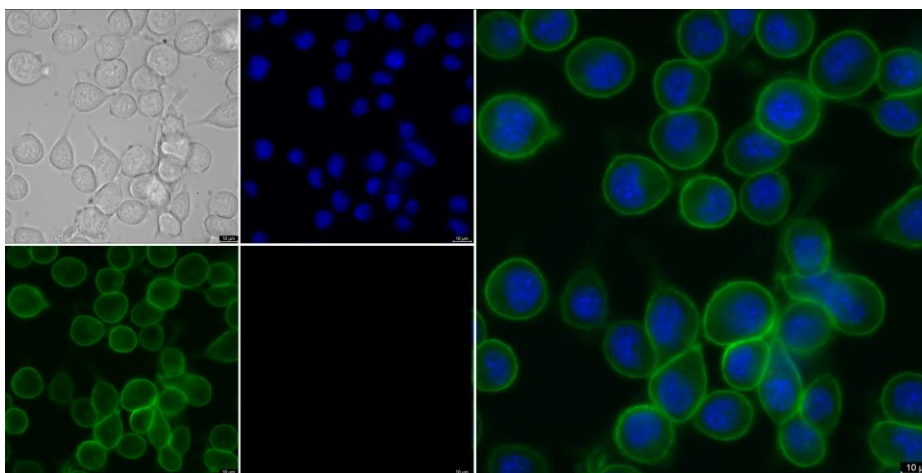


Ilustración 40:  
imágenes  
tomadas del  
pocillo 5.  
Fuente: propia.





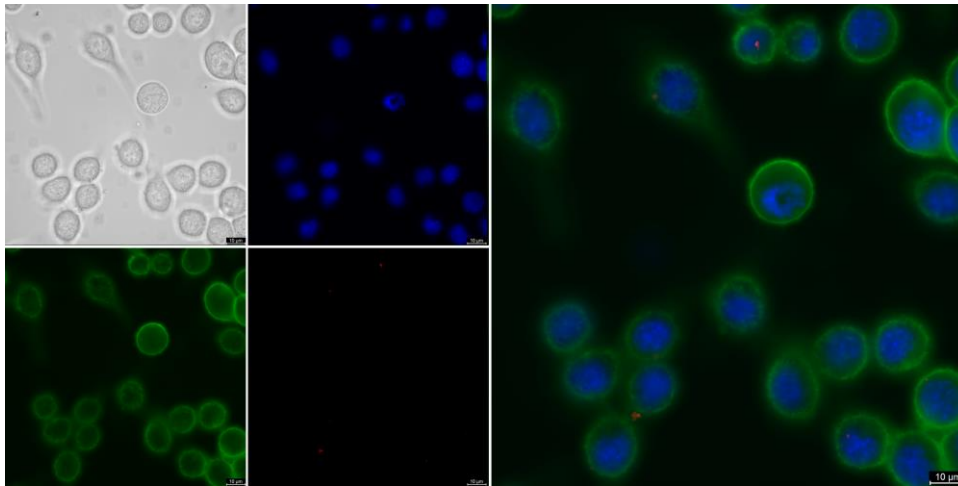


Ilustración 41: imágenes tomadas del pocillo 6. Fuente: propia.

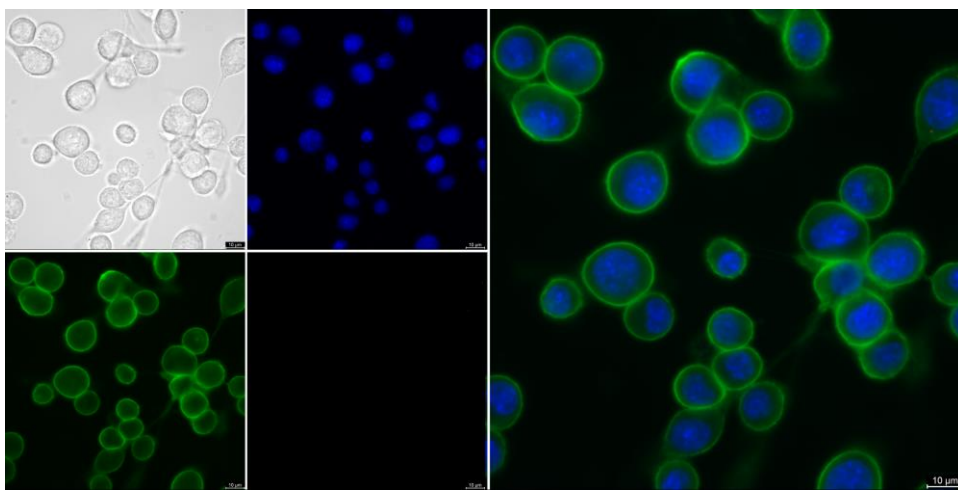


Ilustración 42: imágenes tomadas del pocillo 7. Fuente: propia.

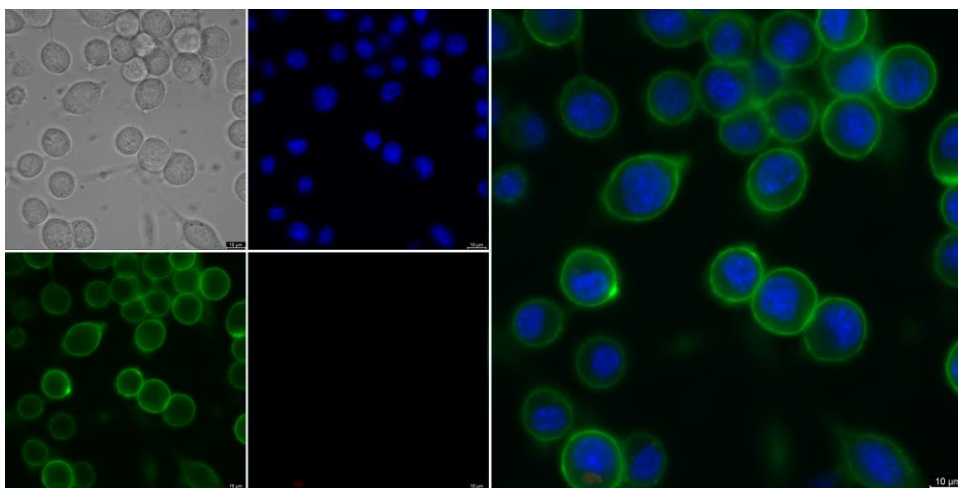


Ilustración 43: imágenes tomadas del pocillo 8. Fuente: propia.

Analizando atentamente estas imágenes es posible notar que la hipótesis era errónea: en los pocillos que no tenían urea en el medio (pocillos 5-8, mostrados en las *Ilustraciones 40-43*) ha habido internalización, si bien esta ha sido menor



que en los pocillos con urea. Además, se había supuesto que habría habido internalización en todos los pocillos con NMs y urea, pero en el primer pocillo (*Ilustración 36*), que tenía ambos, no ha habido. Esto probablemente es debido a la minúscula concentración de NMs que había en el medio de ese pocillo.

#### 4.7 Ensayo “Live/Dead” (6)

##### Objetivo

El objetivo de esta quinta parte de la parte práctica es determinar cuántas células han muerto al cabo de 24 horas de la internalización de los NMs en ellas. Este experimento será cuantitativo, y se harán 2 réplicas.

##### Diseño experimental

En esta última parte de la experimentación se responderá a la tercera y última pregunta de investigación: ¿Qué porcentual de células de cáncer de vejiga sobrevivirán después de 24h de internalización con diferentes cantidades de NMs, con y sin presencia de urea en el medio?

La hipótesis sobre el resultado del experimento es que “Cuanta mayor sea la cantidad de NMs presentes en el medio y cuanta más urea haya, menor será el porcentaje de células que seguirá con vida después de 24 horas de internalización”.

En este experimento se analizaron separadamente los resultados obtenidos de pocillos con urea y sin urea. En cada caso la variable independiente fueron los microlitros de solución con NMs introducidos en el medio, y la variable dependiente el porcentaje de células vivas al cabo de 24 horas de incubación. Respecto al resto de variables, se mantuvieron iguales para todos los pocillos a lo largo de todo el experimento.

##### Fundamento teórico

La prueba “live/dead” es un ensayo de dos colores rápido y sencillo para determinar la viabilidad de las células (es decir, si están vivas o muertas). Permite discriminar rápidamente las células vivas de las muertas mediante la tinción simultánea con la calceína ( $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$ ) (que tiene un color verde



fluorescente), que sirve para indicar una membrana plasmática intacta, y etidio ( $C_{21}H_{20}N_3Br$ ) (con un color rojo fluorescente), que puede marcar el DNA de una célula, pero solamente si la membrana de esta se ha roto (y por lo tanto la célula se ha muerto).

La calceína se excita a unos 495nm y emite a unos 515, y el etidio se excita a 300nm y emite a 600nm.<sup>65</sup>

## Procedimiento

1. Se ponen (usando micropipetas) 5 $\mu$ L de etidio, 0.5 $\mu$ L de calceína y 994.5 $\mu$ L de medio DMEM en un eppendorf de 1mL.
2. Se coge una placa de cultivo preparada en el apartado 4, se introduce en la cabina de bioseguridad y usando la pipeta se le quita el medio. Entonces, se les pone 150 $\mu$ L de DMEM para lavarlas, y se vuelve a quitar este medio para sustituirlo con 150 $\mu$ L procedentes de la solución del eppendorf preparada anteriormente con el ensayo “Live/Dead”. Se deja la placa de cultivo en el incubador durante 20 minutos (a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>) para que la calceína y el etidio puedan engancharse a la muestra, y luego se quita el medio por última vez y se substituye con 150 $\mu$ L de PBS en cada pocillo. Entonces, se repite todo este protocolo otra vez para la segunda réplica de este experimento.
3. Se prepara el microscopio y se empieza la observación y toma de imágenes de las células. Para poder ver las células teñidas se tendrá que irradiar la muestra con longitud de onda correspondiente a la calceína (495nm) y al etidio (300nm), así como tomar imágenes a 511nm y 600nm.
4. Una vez tomadas las imágenes, estas serán guardadas por el software del microscopio LAS X en formato “.lif”. Para poder editarlas, se usará el programa ImajeJ, siguiendo el procedimiento descrito en los anexos.

## Resultados y análisis de los resultados

Tras analizar todas las imágenes que se han conseguido (a las que se puede

<sup>65</sup> Gil-Loyzaga. Cultivo de Células Animales Y Humanas, Aplicaciones en Medicina Regenerativa. Ed. Visión Libros, 2011. Madrid, España. ISBN: 978-84-9983-737-6.



acceder en el Anexo IV), he resumido todos los datos en la *Tablas 8* (para la primera placa, es decir, la primera réplica) y la *Tabla 9* (para la segunda réplica), en las que he puesto los datos recopilados:

<b>RÉPLICA 1</b>				
<b>Pocillos con urea:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>MSNP-Ur (µL)</b>	0.4	4	8	16
<b>Células vivas (±5 células)</b>	298	145	112	153
<b>Células muertas (±1 célula)</b>	3	9	14	18
<b>% vivas</b>	99.0%	94.2%	88.9%	89.5%
<b>Error %</b>	3.6%	6.9%	8.2%	6.1%
<b>Pocillos sin urea:</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>MSNP-Ur (µL)</b>	0.4	4	8	16
<b>Células vivas (±5 células)</b>	201	230	159	86
<b>Células muertas (±1 célula)</b>	2	7	1	5
<b>% vivas</b>	99.0%	97.1%	99.4%	94.5%
<b>Error %</b>	5.4%	4.6%	6.9%	11.7%

Tabla 8: datos obtenidos de la primera réplica del ensayo Live/Dead.

<b>RÉPLICA 2</b>				
<b>Pocillos con urea:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>MSNP-Ur (µL)</b>	0.4	4	8	16
<b>Células vivas (±5 células)</b>	196	127	118	103
<b>Células muertas (±1 célula)</b>	1	8	13	15
<b>% vivas</b>	99.5%	94.1%	90.1%	87.3%



Error %	5.6%	7.9%	7.9%	8.7%
<b>Pocillos sin urea:</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>MSNP-Ur (μL)</b>	0.4	4	8	16
<b>Células vivas (±5 células)</b>	171	199	112	159
<b>Células muertas (±1 célula)</b>	1	7	1	5
<b>% vivas</b>	99.4%	96.6%	99.1%	96.6%
<b>Error %</b>	6.4%	5.2%	9.7%	6.6%

Tabla 9: datos obtenidos de la segunda réplica del ensayo Live/Dead.

A modo de ejemplo, en la *Ilustración 44* se puede observar la imagen tomada en el pocillo 4 de la segunda réplica:

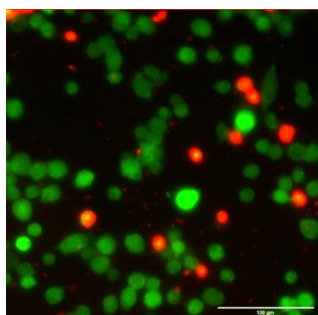


Ilustración 44: imagen del pocillo 4 de la segunda réplica. Las células muertas están marcadas en rojo, y las vivas en verde. Fuente: propia.

Calculando la media de los resultados de la *Tablas 8 y 9*, se obtiene la *Tabla 10*:

CON UREA				
<b>MSNP-Ur (μL±0.1)</b>	0.4	4.0	8.0	16.0
<b>%vivas</b>	99.2%	94.1%	89.5%	88.4%
<b>Error %</b>	4.6%	7.4%	8.1%	7.4%
SIN UREA				
<b>MSNP-Ur (μL±0.1)</b>	0.4	4.0	8.0	16.0



<b>%vivas</b>	99.2%	96.8%	99.2%	95.7%
<b>Error %</b>	5.9%	4.9%	8.3%	9.2%

Tabla 10: media aritmética de los datos de las dos tablas anteriores.

Finalmente, se grafican los datos de la *Tabla 10*, creando una gráfica para los pocillos con urea y sin:

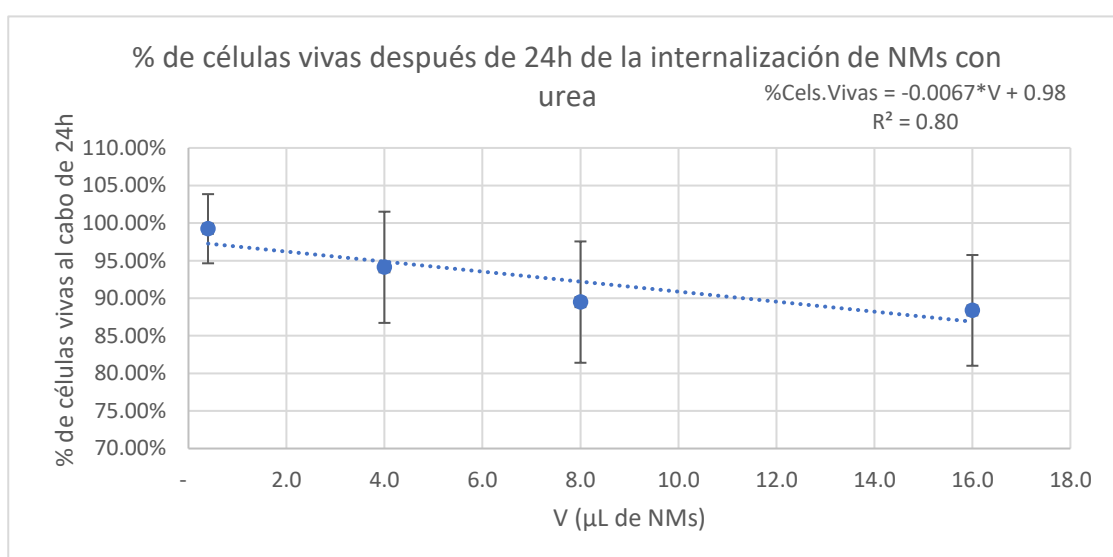


Ilustración 45: gráfica con el porcentaje de células vivas al cabo de 24h de incubación junto con un medio con NMs y urea.

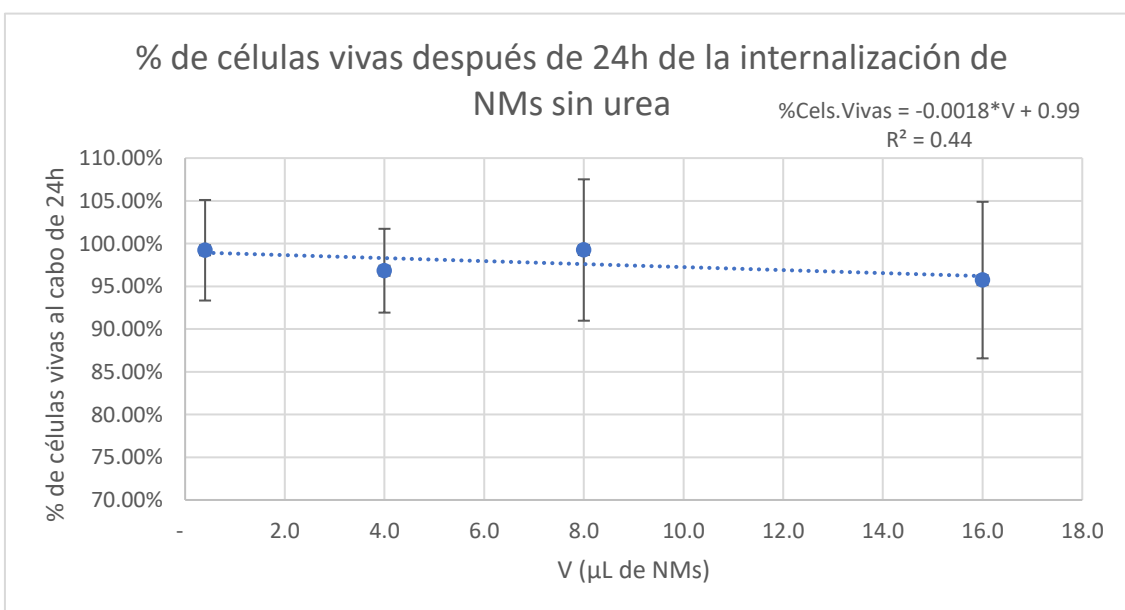


Ilustración 44: gráfica con el porcentaje de células vivas al cabo de 24h de incubación junto con un medio con NMs pero sin urea.

He indicado en cada gráfico el valor de R cuadrado ( $R^2$ ), una medida



estadística que indica como de cerca están los datos al valor que les correspondería por la línea de tendencia. Cuánto más cercano sea su valor a 1 mejor se ajusta la línea de tendencia a los datos.<sup>66</sup>

A partir del análisis de los dos gráficos, se puede ver que la hipótesis era cierta: cuánto más NMs había en el medio más células morían, y además morían muchas más células cuando había urea en el medio: la pendiente de la gráfica de la *Ilustración 40* (con urea) es menor que la de la gráfica de la *Ilustración 41* (sin urea), y por lo tanto el porcentaje de células vivas al cabo de 24h disminuye más rápidamente con presencia de urea.

Tal y cómo expuesto en el apartado teórico, la ureasa, al catalizar la urea produce amonio ( $\text{NH}_3$ ), que hace que baje el pH del medio. Esta acidez es un problema para las células, y llevará a algunas de ellas a la muerte. Respecto a los pocillos sin urea, es probable que algunas de las muertes detectadas fueran “naturales”, es decir, que no fueron inducidas por los NMs porque eran parte de un normal ciclo de la vida de una célula. Sin embargo, al aumentar la concentración de NMs en el medio también murieron más células, así que es posible que la ureasa degradase la urea fruto del metabolismo de las mismas células a lo largo de la incubación, cómo también podría ser que la sola presencia de NMs cerca y dentro de las células cancerígenas ya cause la muerte a alguna de ellas.

---

<sup>66</sup> “Análisis de Regresión: ¿Cómo Puedo Interpretar el R-cuadrado y Evaluar la Bondad de Ajuste?” - <https://blog.minitab.com/es/analisis-de-regresion-como-puedo-interpretar-el-r-cuadrado-y-evaluar-la-bondad-de-ajuste> [última consulta: 22/01/22]

## 5. Ética de la nanorrobótica

Obviamente, además de incontables ventajas la nanorrobótica, usada con fines indeseables para la humanidad puede llegar a ser extremadamente peligrosa. De la misma forma que se puede usar para que la distribución de fármacos sea mucho más eficiente y eficaz, en caso de hacer uso de ella como arma biológica, una sola dosis minúscula de veneno ya podría ser letal. Además, en caso de un defecto del NR las consecuencias también podrían ser nefastas. Por esta razón es importante construir una ética y unas normas para reglamentar el desarrollo de esta tecnología, pero sin limitar su progreso.

En primer lugar, quería plantear la cuestión sobre cómo se tendrían que definir los NRs: ¿sería más adecuado considerarlos robots, máquinas, medicamentos, partículas...? Dependiendo del término usado para describirlos puede cambiar mucho la percepción que generan al público general.

En segundo lugar, quería abordar la cuestión de su aprobación para su uso médico/farmacéutico. Hoy en día, se trata a los NRs como si fueran un simple fármaco, y desde mi punto de vista este enfoque es bastante limitante. Un NR no solo transporta un medicamento, sino que dependiendo de cómo se funcionalizan y de qué moléculas se les enlacen se comportarán de una forma u otra, y por lo tanto se podría afirmar que en su proceso de síntesis los NRs son “programados” para actuar de una cierta manera. Como he explicado anteriormente, dependiendo de cómo se haya creado un NR tendrá un comportamiento más autónomo o más controlado, por ejemplo, respecto al lugar donde se dirigen y al momento en el que liberan el fármaco.

En tal caso, podría ser necesario introducir nuevos protocolos en el proceso de aprobación de terapias con NRs, ya que debido a la mayor complejidad de estos en comparación con una simple droga (un NR tendrá una NP que funcionará como nanotransportador, el cargo y una o más moléculas que se habrán enlazado a su superficie para funcionalizarlo) serán necesarios más estudios para asegurarse de que ninguna de las moléculas que los forman sean dañinas para los pacientes.



Obviamente, tampoco se podrían considerar cómo robots de la forma en que se usa este término actualmente: son tan pequeños que no pueden tener componentes eléctricos y un software. Sin embargo, estas limitaciones se pueden superar con una construcción inteligente de los NRs: por ejemplo, es imposible montarles una radio con la que enviar y recibir datos, pero se pueden controlar de toda forma usando impulsos eléctricos y campos magnéticos, y ellos pueden comunicarnos información mediante la liberación de sustancias o activando proteínas luminosas.

He conseguido ponerme en contacto con Carme Torras, una profesora e investigadora de la UPC experta en robótica y en la ética que debe haber detrás de ella. Aunque su campo de trabajo es el de la robótica macroscópica, me ha dado la idea de enfocar la cuestión de la nanorrobótica desde el punto de vista de las 3 leyes de la robótica de Asimov.

Estas leyes, aparecidas por primera vez en un relato de 1942 del famoso escritor, son las siguientes:

- **Primera Ley:** un robot no hará daño a un ser humano ni, por inacción, permitirá que un ser humano sufra daño.
- **Segunda Ley:** un robot debe cumplir las órdenes dadas por los seres humanos, a excepción de aquellas que entren en conflicto con la primera ley.
- **Tercera Ley:** un robot debe proteger su propia existencia en la medida en que esta protección no entre en conflicto con la primera o con la segunda ley.<sup>67</sup>

## 5.1 Primera Ley de Asimov

**“Un robot no hará daño a un ser humano ni, por inacción, permitirá que un ser humano sufra daño.”**

Para aplicar la primera ley en el mundo de la nanorrobótica, es necesario desarrollar mecanismos para que un NR pueda saber cuándo está haciendo daño. Una manera de hacerlo sería incorporando receptores en los NRs para

---

<sup>67</sup> Asimov, Isaac (1989). “Círculo vicioso”. Barcelona: Martínez Roca. ISBN 84-270-0906-2.

detectar aquellas moléculas liberadas por las células cuando están dañadas o se están muriendo. Entonces, si el NR detectara a esta molécula se tendría que detener por completo y cesar su actividad. Obviamente, en el caso que el objetivo de un NR sea matar a células (por ejemplo, de un tumor) sería necesario realizar mucha investigación para que las moléculas que detendrían el motor no fueran sintetizadas por las células tumorales pero sí por las de su alrededor.

## 5.2 Segunda Ley de Asimov

**“Un robot debe cumplir las órdenes dadas por los seres humanos, a excepción de aquellas que entren en conflicto con la primera ley.”**

¿De qué formas se puede conseguir que un NR cumpla con los órdenes de los humanos? Se tienen que construir NRs capaces de captar estímulos externos, cómo el magnetismo o la electricidad, y de reaccionar a ellos. Este tipo de NRs ya existen, pero en el caso de los NRs autónomos actualmente una vez liberados ya no se pueden controlar de ninguna forma. Para ellos, ya que se quiere que sean autónomos, la única señal que podría dárseles sería la de autodestrucción, en caso que ya no se quieran usar. Esto podría ser necesario en el caso que se hayan liberado en el cuerpo de una persona por error, o se haya usado un dosaje erróneo.

Una solución diseñada para detener a un NR es la de incorporar en ellos una antena de oro (de solamente 1.5nm), que al aplicar un campo electromagnético externo se calienta, y ese calor es suficiente para romper el NR.<sup>68</sup> En un futuro, podría ser obligatorio que todo NR tenga incorporado algún tipo de mecanismo similar, que funcionaría como un botón de emergencia si hay algún problema.

## 5.3 Tercera Ley de Asimov

**“Un robot debe proteger su propia existencia en la medida en que esta protección no entre en conflicto con la primera o con la segunda ley.”**

Esta ley es probablemente la más fácil de incorporar en la nanorrobótica:

---

<sup>68</sup> Ido Bachelet, “Nanorobot ethics”. *Journal of Geoethical Nanotechnology*, 2020.

simplemente se tienen que diseñar NRs resistentes y que sean capaces de protegerse de las defensas del cuerpo humano sin dañarlo.

## 5.4 Ley Cero

**“Un robot no puede dañar a la humanidad o, por inacción, permitir que la humanidad sufra daños.”**

Esta ley fue añadida posteriormente a las demás, y es una generalización de la primera ley. Tiene la denominación de “cero” en cuanto las otras tres leyes de la robótica quedan subordinadas jerárquicamente a esta.<sup>69</sup>

Para evitar que un NR pueda dañar a la humanidad, hay que asegurarse que no pueda ser usado como arma de destrucción masiva. Pronto se desarrollarán formas de producir NRs de forma masiva, y podría resultar ser muy tentador modificarlos para ser usados.

La única solución para evitar este problema es realizar un tratado similar al de la Convención de las Armas Químicas<sup>70</sup>, en el que los países se pongan de acuerdo para que los NRs nunca se usen para matar.

En resumen, las tres leyes de la nanorrobótica, según la forma en que han sido desarrolladas en este apartado, son:

### LAS 3 LEYES DE LA NANORROBÓTICA

1. **Primera ley:** un NR debe ser capaz de detectar si está causando daños, y en caso que así sea tiene que cesar por completo su actividad.
2. **Segunda ley:** un NR siempre tiene que tener alguna manera de ser controlado y/o dirigido.
3. **Tercera ley:** un NR tiene que ser capaz de sobrevivir y llevar a cabo su tarea en el ambiente en el que se encuentre.

<sup>69</sup> Asimov, Isaac (1986). “Robots and empire”. Ballantine books. ISBN 9780345328946.

<sup>70</sup> OPAQ, 1997. Web: <https://www.opcw.org/es/convencion-sobre-las-armas-quimicas> [Última consulta: 09/09/21]



## 6. Conclusiones

La nanotecnología y la nanociencia estarán cada vez más presentes en la vida de cada día, y gracias a su enorme potencial tomarán cada vez más relevancia en los próximos años. Gracias a este TDI he podido comprobar en primera persona que estas ramas del conocimiento aún se encuentran en las fases iniciales de su desarrollo, pero al igual que ya ha pasado anteriormente (con la electrónica, los ordenadores e internet, por ejemplo), su progreso y difusión se verán incrementados de forma exponencial a medida que pasará el tiempo.

En la parte teórica de este TDI he expuesto algunos de los aspectos más importantes de uno de los resultados de la unión de estos dos grandes campos: la nanorrobótica. He explicado que los NRs están formados por NPs funcionalizadas, y aunque tiene muchísimas aplicaciones, me he centrado en su uso en la medicina terapéutica, que es principalmente el de NTs de fármacos. Además, he analizado los distintos tipos de NTs y NMs. Finalmente, he investigado a fondo las nanopartículas mesoporosas de sílice, profundizando en cómo estas se podrían emplear en la lucha contra el cáncer de vejiga. Además, también he analizado el cáncer de vejiga, y con la ayuda de la Dra. Carme Torras he investigado la ética de la nanorrobótica.

En la parte práctica, en cambio, he podido sintetizar MSNPs, funcionalizarlas con la enzima ureasa, ver cómo se movían en distintas concentraciones de urea e internalizarlas in vitro en células de cáncer de vejiga. He conseguido comprobar que mis NMs entraban dentro de las células de cáncer, y que cuánto más NMs y urea hubiera en el medio más células terminaban por morir.

Gracias a mi investigación he mostrado la aplicación de los MSNMs contra el cáncer de vejiga, demostrando su potencial con mi investigación bibliográfica y los experimentos de la parte práctica.

Asimismo, más allá del TDI, realizar este trabajo me ha permitido aprender muchísimo sobre la ciencia y la investigación en general: gracias a mis estancias en el IBEC y en el IBB-UAB he conocido a muchos investigadores,

estudiantes de prácticas y técnicos de laboratorio, de los que he aprendido muchísimo. He podido trabajar en laboratorios de alto nivel y con grupos de científicos interdisciplinarios, y todas estas experiencias en su conjunto me han permitido desarrollar una visión mucho más amplia del mundo de la ciencia, de la investigación y, claramente, de la nanorrobótica.

## 6.1 Respuesta a la pregunta/s formuladas y refutación/confirmación de las hipótesis

Cómo explicado a lo largo de la parte práctica, la primera y la tercera hipótesis que se habían planteado eran correctas, mientras que es necesario formular otra de nueva para la segunda. Entonces, la respuesta a cada pregunta de investigación sería la siguiente:

- i. ¿Son las MSNPs-Ur capaces de moverse en una solución con urea?

En presencia de urea la actividad de la ureasa permitirá a las MSNPs de difundirse más rápidamente que sin presencia de urea.

- ii. ¿Pueden MSNMs penetrar en células de cáncer de vejiga *in vitro*, con y sin presencia de ureasa en el medio?

Cómo mayor sea la cantidad de NMs presentes en el medio y cómo más urea haya mayor será la internalización de los NMs en las células. Asimismo, no es imprescindible que haya urea en el medio para que haya internalización.

- iii. ¿Qué porcentual de células de cáncer de vejiga sobrevivirán después de 24h de internalización con diferentes cantidades de MSNMs, con y sin presencia de ureasa en el medio?

Cómo mayor sea la cantidad de MSNMs presentes en el medio y cómo más urea haya menor será el porcentaje de células que seguirá en vida después de las 24 horas de internalización.

## 6.2 Propuestas de mejora

Aunque he podido realizar un TDI muy completo y he conseguido responder a las preguntas de investigación, si tuviera que repetir el TDI y

volver a empezarlo desde cero me gustaría aportar las siguientes mejoras respecto a la parte práctica:

- La mejora más grande (y también probablemente la más fácil de implementar) sería repetir la observación del movimiento en el microscopio (experimento 3), el ensayo de internalización (experimento 5) y la prueba *Live/Dead* (experimento 6) con MSNPs sin ningún tipo de funcionalización. Además, para que el último experimento fuera verdaderamente completo se tendría que haber repetido también sin MSNPs. De esta forma el estudio de la toxicidad de estas NPs habría sido mucho más completo.
- También habría sido muy interesante poder realizar una caracterización de las MSNPs: determinar si efectivamente su diámetro (usando un microscopio electrónico) era de 450nm, así como si el diámetro de sus poros era de 2nm. Además, habría podido determinar el número aproximado de moléculas de urea que se habían podido enlazar con las MSNPs.
- Con más tiempo disponible se podrían realizar más réplicas de cada experimento, para conseguir un resultado aún más exacto y preciso. Con más tiempo también habría sido muy interesante determinar el número de NMs internalizados en las células
- Entre muchos otros, me habría gustado poder funcionalizar yo mismo los NMs con el FITC, así como investigar otros aspectos igualmente interesantes de las MSNPs más allá de su movimiento y su internalización, cómo su biodegradación o su capacidad de carga.
- Además, me habría encantado poder cargar mis MSNMs con algún tipo de medicamento, como la doxorubicina, y ver cuantas más células se podían matar gracias al uso de este medicamento.

## 7. Referencias

Toda la bibliografía y webgrafía usada a lo largo del TDI, ordenada por orden alfabético:

“Análisis de Regresión: ¿Cómo Puedo Interpretar el R-cuadrado y Evaluar la Bondad de Ajuste?” - <https://blog.minitab.com/es/analisis-de-regresion-como-puedo-interpretar-el-r-cuadrado-y-evaluar-la-bondad-de-ajuste> [última consulta: 22/01/22]

“Bladder cancer”. Wikipedia, 2021. Web: [https://en.wikipedia.org/wiki/Bladder\\_cancer](https://en.wikipedia.org/wiki/Bladder_cancer) [Última consulta: 21/06/21]

“Bromuro de hexadeciltrimetilamonio”. Wikipedia, 2021. Web: [https://es.wikipedia.org/wiki/Bromuro\\_de\\_hexadeciltrimetilamonio](https://es.wikipedia.org/wiki/Bromuro_de_hexadeciltrimetilamonio) [Última consulta: 29/09/21]

“Cáncer de vejiga”. Wikipedia, 2021. Web: [https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer\\_de\\_vejiga](https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer_de_vejiga) [Última consulta: 21/06/21]

“Difusión”. Wikipedia, 2021. Web: [https://es.wikipedia.org/wiki/Difusión\\_\(física\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Difusi3n_(f3sica)) [Última consulta: 29/07/21]

“Movimiento browniano”. Wikipedia, 2021. Web: [https://es.wikipedia.org/wiki/Movimiento\\_browniano](https://es.wikipedia.org/wiki/Movimiento_browniano) [Última consulta: 29/07/21]

“Vejiga Urinaria”. Wikipedia, 2021. Web: [https://es.wikipedia.org/wiki/Vejiga\\_urinaria](https://es.wikipedia.org/wiki/Vejiga_urinaria) [Última consulta: 21/06/21]

A. Astefanei, O. Núñez, M.T. Galceran. “Characterisation and determination of fullerenes: a critical review.” *Analytica Chimica Acta*, 2015.

A. Puri, K. Loomis, B. Smith, J.-H. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman, R. Blumenthal. “Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic.” *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2009.

American cancer society, 2019. Web: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-y-sintomas.html> [Última consulta: 15/06/21]

Amir Nourhani, Paul E. Lammert, Vincent H. Crespi, Ali Borhan. “A general flux-based analysis for spherical electrocatalytic nanomotors”. *Physics of fluids*, 2015.

Ana C. Hortelao, Cristina Simó, Maria Guix, Sandra Guallar-Garrido, Esther Julián, Diana Vilela, Luka Rejc, Pedro Ramos-Cabrer, Unai Cossío, Vanessa Gómez-Vallejo, Tania Patiño, Jordi Llop, Samuel Sánchez. “Monitoring the collective behavior of enzymatic nanomotors in vitro and in vivo by PET-CT”. *Biorxiv*, 2020.

Ana C. Hortelão, Rafael Carrascosa, Nerea Murillo-Cremaes, Tania Patiño, and Samuel Sánchez. "Targeting 3D Bladder Cancer Spheroids with Urease-Powered Nanomotors". ACS Nano, 2019.

Andreassen, B. K., Aagnes, B., Gislefoss, R., Andreassen, M., Wahlqvist, R. "Incidence and Survival of urothelial carcinoma of the urinary bladder in Norway 1981-2014". BMC Cancer, 2016.

Antoni Llopis-Lorente, Alba García-Fernández, Nerea Murillo-Cremaes, Ana C. Hortelão, Tania Patiño, Reynaldo Villalonga, Félix Sancenón, Ramón Martínez-Máñez, Samuel Sánchez. "Enzyme-Powered Gated Mesoporous Silica Nanomotors for On-Command Intracellular Payload Delivery." ACS Nano, 2019.

Asimov, Isaac (1986). "Robots and empire". Ballantine books. ISBN 9780345328946.

Asimov, Isaac (1989). "Círculo vicioso". Barcelona: Martínez Roca. ISBN 84-270-0906-2.

AulaFacil. Web: <https://www.aulafacil.com/cursos/educacion/anatomia-funcional/sistema-urinario-l43211> [Última consulta: 21/06/21]

Baoxue Yang, Lise Bankir. "Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice". American journal of physiology Renal physiology, 2005.

Bob Yirka. Phys.org, 2016. Web: <https://phys.org/news/2016-09-team-accurately-permeability-carbon-nanotubes.html> [Última consulta: 08/09/21]

C. C. Huang. "Swirling swimmer". Nature Nanotechnology, 2019.

Calmette-Guerin Fanghong Chen, Guangjian Zhang, Yanli Cao, Martin J. Hessner, William A. See. "MB49 Murine Urothelial Carcinoma: Molecular and Phenotypic Comparison to Human Cell Lines as a Model of the Direct Tumor Response to Bacillus". J urol, 2009.

Cancer.net, 2020. Web: <https://www.cancer.net/cancer-types/bladder-cancer/introduction> [Última consulta: 21/06/21]

Charles Wyatt Shields IV, Koohee Han, Fuduo Ma, Touvia Miloh, Gilad Yossifon, Orlin D. Velez. "Supercolloidal Spinners: Complex Active Particles for Electrically Powered and Switchable Rotation". Advanced functional materials, 2018.

Chuanrui Chen, Fangzhi Mou, Leilei Xu, Shaofei Wang, Jianguo Guan, Zunpeng Feng, Quanwei Wang, Lei Kong, Wei Li, Joseph Wang, Qingjie Zhang. "Light-Steered Isotropic Semiconductor Micromotors". Advanced materials, 2017.

Darian R. Esfahani, Kevin M. Tangen, Morteza Sadeh, Akop Seksenyan, Brandon L. Neisewander, Ankit I. Mehta, Andreas A. Linninger. "Systems engineers' role in biomedical research. Convection-enhanced drug delivery". ScienceDirect, 2018.



dF\_, "Nano-particle or Molecule?". physics.stackexchange, 2010. Web: [https://physics.stackexchange.com/questions/601/nano-particle-or-molecule?answertab=active#comment1106\\_609](https://physics.stackexchange.com/questions/601/nano-particle-or-molecule?answertab=active#comment1106_609) [Última consulta: 12/08/21]

Drexler, K. Eric. "Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology". Doubleday, 1986.

E.C. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang, C.J. Murphy, M.A. El-Sayed. "The golden age: gold nanoparticles for biomedicine." Chemical Society Reviews, 2012.

Excellence executive, 2020. Web: <http://www.eexcellence.es/index.php/entrevistas/con-talento/nanorobots-situacion-actual-y-el-porque-de-su-impresionante-futuro> [Última consulta: 17/06/21]

F. Peng, Y. Tu, D. A. Wilson. "Micro/nanomotors towards in vivo application: cell, tissue and biofluid". Chem. Soc. Rev., 2017.

Fernando Soto, Gregory L. Wagner, Victor Garcia-Gradilla, Kyle T. Gillespie, Deepak R. Lakshminpathy, Emil Karshalev, Chava Angell, Yi Chena, Joseph Wang. "Acoustically propelled nanoshells". Nanoscale, 2016.

Feynman, Richard (1970). "The Feynman Lectures on Physics Vol I". Addison Wesley Longman. ISBN 978-0-201-02115-8.

Fluorophores.org. Web: <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/252> [Última consulta: 24/10/21]

Freiburg university. Web: [http://www.polymermicroscopy.com/eng\\_tem\\_lipo.htm](http://www.polymermicroscopy.com/eng_tem_lipo.htm) [Última consulta: 17/06/21]

Ghosh, A., Fischer, P. "Controlled Propulsion of Artificial Magnetic Nanostructured Propellers". Nano Letters, 2009.

Gil-Loyzaga. Cultivo de Células Animales Y Humanas, Aplicaciones en Medicina Regenerativa. Ed. Visión Libros, 2011. Madrid, España. ISBN: 978-84-9983-737-6.

Held Kara F., Thibeault Robert, Boudreau Jacqueline. "Heat Sources in a Biosafety Cabinet Compromise Experimental and User Protection". Applied Biosafety, 2019.

Huheey J.E., Keiter E.A., Keiter R.L. "Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity". HarperCollins College Publishers, 1993.

IBEC. Web: <https://ibecbarcelona.eu/nanodevices> [Última consulta: 30/09/21]

Ibrahim Khan, Khalid Saeed, Idrees Khan. "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities." Arabian Journal of Chemistry, 2019.

Instituto nacional de cáncer. Web: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/ganglio-linfatico> [Última consulta: 29/09/21]

Invitrogen. "DAPI Nucleic Acid Stain". Molecular Probes, 2006.

Jonathan R. Howse, Richard A. L. Jones, Anthony J. Ryan, Tim Gough, Reza Vafabakhsh, and Ramin Golestanian. "Self-Motile Colloidal Particles: From Directed Propulsion to Random Walk". Physical review letters, 2007.

José Ángel Martín, Elena Casero, Carlos Briones, Pedro Serena. "Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro". Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, 2009.

K. Saeed, I. Khan. "Preparation and characterization of single-walled carbon nanotube/nylon 6,6 nanocomposites." Instrum Scientific Technology, 2016.

Kamat, Ashish M; Hahn, Noah M; Efstathiou, Jason A; Lerner, Seth P; Malmström, Per-Uno; Choi, Woonyoung; Guo, Charles C; Lotan, Yair et al. "Bladder cancer". The Lancet, 2016.

Laura Martín. As, 2018. Web: [https://as.com/deporteyvida/2018/02/20/portada/1519116734\\_324425.html](https://as.com/deporteyvida/2018/02/20/portada/1519116734_324425.html) [Última consulta: 17/06/21]

Llopis-Lorente, A., de Luis, B., García-Fernández, A., Jimenez- Falcao, S., Orzáez, M., Sancenón, F., Villalonga, R., Martínez-Máñez, R. "Hybrid Mesoporous Nanocarriers Act by Processing Logic Tasks: Toward the Design of Nanobots Capable of Reading Information from the Environment". ACS Appl. Mater. Interfaces, 2018.

María Dolores Tuñón. Webconsultas, 2016. Web: <https://www.webconsultas.com/salud-al-dia/cancer-de-vejiga/cancer-de-vejiga-6101> [Última consulta: 20/06/21]

María Vallet-Regí, Montserrat Colilla, Isabel Izquierdo-Barba, Miguel Manzano. "Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights". National center for Biotechnology Information, 2017.

MedlinePlus, 2021. Web: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000850.htm> [Última consulta: 21/06/21]

Miranda N Hurst, Dr. Robert K DeLong. "Spectral signature analysis of surface functionalized nanoparticles". Molecular Devices, 2021.

Montana State university, 2020. Web: <https://serc.carleton.edu/details/images/180059.html> [Última consulta: 17/06/21]

Mura, S., Nicolas, J., Couvreur, P. "Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery". Natural Materials, 2013.

N. R. Hu, L. Wang, W. Zhai, M. Sun, H. Xie, Z. Wu, Q. He. "Magnetically Actuated Rolling of Star-Shaped Hydrogel Microswimmer". Macromolecular Chemistry and Physics, 2018.

Nanowerk, 2011. Web: <https://www.nanowerk.com/news/newsid=21313.php> [Última consulta: 17/06/21]

O. Dincel, T. Ueta, J. Kameoka. "Acoustic driven microbubble motor device". *Sensors Actuators A Phys*, 2019.

OPAQ, 1997. Web: <https://www.opcw.org/es/convencion-sobre-las-armas-quimicas> [Última consulta: 09/09/21]

P. Andrew Karplus, Matthew A. Pearson, and Robert P. Hausinger. "70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned?". *Accounts of Chemical Research*, 1997.

Qingliang Yang, Lei Xu, Weizhen Zhong, Qinying Yan, Ying Gao, Weiyong Hong, Yuanbin She, Gensheng Yang. "Recent Advances in Motion Control of Micro/Nanomotors". Wiley online library, 2020.

R. Galluzzi, N. Amati and A. Tonoli. "Modeling, Design, and Validation of Magnetic Hysteresis Motors," in *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, 2020.

Rafael García. As, 2019. Web: [https://as.com/meristation/2019/03/14/betech/1552588206\\_621764.html](https://as.com/meristation/2019/03/14/betech/1552588206_621764.html) [Última consulta: 17/06/21]

Renfeng Dong, Yan Hu, Yefei Wu, Wei Gao, Biye Ren, Qinglong Wang, and Yuepeng Cai. "Visible-Light-Driven BiOI-Based Janus Micromotor in Pure Water". *Journal of the American Chemical Society*, 2017.

Rui Huang, Yi-Wen Shen, Ying-Yun Guan, Yi-Xin Jiang, Ye Wu, Khalid Rahman, Li-Jun Zhang, Hai-Jun Liu, Xin Luan. "Mesoporous silica nanoparticles: facile surface functionalization and versatile biomedical applications in oncology". *Acta biomaterialia*, 2020.

S. Sun. "Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices." *Science*, 2000.

S. Wilhelm, A. J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H. F. Dvorak, W. C. W. Chan. "Analysis of nanoparticle delivery to tumours". *Nat. Rev. Mater*, 2016.

Saini, Rajiv; Saini, Santosh, Sharma, Sugandha. "Nanotechnology: The Future Medicine". *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 2010.

Sara Silva, António J Almeida, Nuno Vale. "Combination of Cell-Penetrating Peptides with Nanoparticles for Therapeutic Application: A Review". *Biomolecules*, 2019.

Shi J., Kantoff P.W., Wooster R., Farokhzad O.C. "Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities". *Nat. Rev. Cancer*, 2016.

Song Y, Li Y, Xu Q, Liu Z. "Mesoporous silica nanoparticles for stimuli-responsive controlled drug delivery: advances, challenges, and outlook". *International Journal of Nanomedicine*, 2017.

Sonntag L, Simmchen J, Magdanz V. "Nano-and Micromotors Designed for Cancer Therapy". *Molecules*, 2019.

Stephen Levy. Medical Device and Diagnostic Industry, 2014. Web: <https://www.mddionline.com/rd/dna-origami-nanobots-could-deliver-drugs-animals> [Última consulta: 17/06/21]

Sugata Barui, Valentina Cauda. "Multimodal Decorations of Mesoporous Silica Nanoparticles for Improved Cancer Therapy". *Pharmaceutics*, 2020.

Tania Patiño, Xavier Arqué, Rafael Mestre, Lucas Palacios, and Samuel Sánchez. "Fundamental Aspects of Enzyme-Powered Micro- and Nanoswimmers". *Accounts of chemical research*, 2018.

ThermoFisher. Web: [www.thermofisher.com/order/catalog/product/W11261#:~:text=Wheat%20germ%20agglutinin%20\(WGA\)%20is,%E2%88%BC495%2F519%20nm](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/W11261#:~:text=Wheat%20germ%20agglutinin%20(WGA)%20is,%E2%88%BC495%2F519%20nm). [Última consulta: 24/10/21]

Tiancong Zhao, Ahmed Elzatahry, Xiaomin Li & Dongyuan Zhao. "Single-micelle-directed synthesis of mesoporous materials". *Nature*, 2019.

Tiezhu Zhang, Qiongjie Zhang. "Research on the Directional Control of Direct Magnetic Field of the Locomotive Asynchronous Traction Motor". *Cyber Security Intelligence and Analytics*, 2019.

Tina Díaz. *Expansión*, 2016. Web: <https://www.expansion.com/economia-digital/innovacion/2016/04/19/57151870ca4741f32f8b4638.html> [Última consulta: 17/06/21]

V. Sridhar, B. W. Park, M. Sitti. "Light-Driven Janus Hollow Mesoporous TiO<sub>2</sub>-Au Microswimmers". *Advanced functional materials*, 2018.

W.-K. Shin, J. Cho, A.G. Kannan, Y.-S. Lee, D.-W. Kim. "Cross-linked composite gel polymer electrolyte using mesoporous methacrylate-functionalized SiO<sub>2</sub> nanoparticles for lithium-ion polymer batteries." *Scientific Reports*, 2016.

Walter F. Paxton, Shakuntala Sundararajan, Thomas E. Mallouk Prof. Dr., Ayusman Sen Prof. Dr. "Chemical Locomotion". *Minireviews*, 2006.

Wikimedia commons a, 2017. Web: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Helical\\_nanomotor.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Helical_nanomotor.jpg) [Última consulta: 17/06/21]

Wikimedia commons b, 2010. Web: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illu\\_bladder\\_es.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illu_bladder_es.png) [Última consulta: 21/06/21]

Wikimedia commons c, 2009. Web: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cancer\\_de\\_pr%C3%B3stata.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cancer_de_pr%C3%B3stata.svg) [Última consulta: 21/06/21]

Wikimedia commons d, 2015. Web: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wiener\\_process\\_3d.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wiener_process_3d.png) [Última consulta: 29/07/21]

Wikimedia commons e, 2012. Web: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:APTES.svg> [Última consulta: 08/09/21]

Wikimedia commons f, 2005. Web: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fullerene-C60.png> [Última consulta: 08/09/21]

Wikimedia commons g, 2013. Web: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Perfil\\_de\\_excitaci%C3%B3n\\_y\\_emision\\_de\\_DAPI.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Perfil_de_excitaci%C3%B3n_y_emision_de_DAPI.jpg) [Última consulta: 24/10/21]

Wikimedia commons h, 2013. Web: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Espectro\\_de\\_excitaci%C3%B3n\\_y\\_de\\_emisi%C3%B3n\\_de\\_FITC.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Espectro_de_excitaci%C3%B3n_y_de_emisi%C3%B3n_de_FITC.jpg) [Última consulta: 24/10/21]

Xavier Arqué, Adrian Romero-Rivera, Ferran Feixas, Tania Patiño, Sílvia Osuna, Samuel Sánchez. "Intrinsic enzymatic properties modulate the self-propulsion of micromotors." *Nature communications*, 2019.

Xia Q.-S., Ding H.-M., Ma Y.-Q. "Can Dual Targeting Enhance Cellular Uptake of Nanoparticles?" *Nanoscale*, 2017.

Xiang-Zhong Chen, Bumjin Jang, Daniel Ahmed, Chengzhi Hu, Carmela De Marco, Marcus Hoop, Fajer Mushtaq, Bradley J. Nelson, Salvador Pané. "Small-Scale Machines Driven by External Power Sources". *Advanced materials*, 2018.



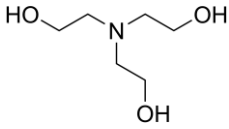

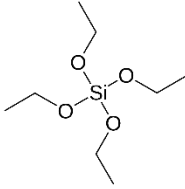

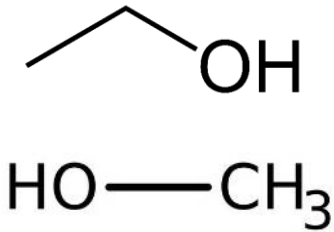
Yuling Liang, Hui Wang, Dahua Yao, Yunhua Chen, Yonghong Deng, Chaoyang Wang. "Transportation and release of Janus micromotors by two-stage rocket hydrogel". *Journal of Materials Chemistry A*, 2017.


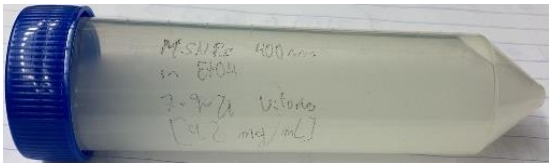



Z. Wu, X. Lin, Y. Wu, T. Si, J. Sun, Q. He. "Near-Infrared Light-Triggered "On/Off" Motion of Polymer Multilayer Rockets". *ACS Nano*, 2014.

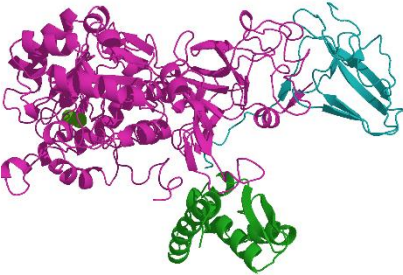

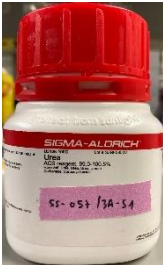


Zheng Wang, Zhimin Chang, Mengmeng Lude, Dan Shao, Juan Yue, Dian Yang, Xiao Zheng, Mingqiang Li, Kan He, Ming Zhang, Li Chen, Wen-fei Dong. "Shape-controlled magnetic mesoporous silica nanoparticles for magnetically-mediated suicide gene therapy of hepatocellular carcinoma". *ScienceDirect*, 2017.

## 8. Anexos






### 8.1 Anexo I: imágenes y fórmulas moleculares de los reactivos, materiales e instrumentos

REACTIVOS	Experimento	
<p>570 mg de CTAB al</p>  <p>99% de pureza</p>		1
 <p>35g de TEOA 99%</p>		1
<p>1.5m L de TEO S 99%</p> 		1
<p>Etanol y metanol 99%</p>		1, 2

<p>HCl 37%</p>	<p style="text-align: center;"><b>H—Cl</b></p> 	<p>1</p>
<p>Suspensión de MSNPs 9.2mg/mL en etanol</p>		<p>2</p>
<p>(3-aminopropil)triethoxisilano (APTES)</p> <chem>CCOC(Si)(OCC)OCCN</chem>		<p>2</p>
<p>Tampón fosfato salino (PBS)</p>		<p>2, 5, 6</p>
<p>Glutaraldehído al 25%</p> <chem>O=C\CCCC=O</chem>		<p>2</p>

<p>Enzima ureasa</p> $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{urease}} \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$		<p>2</p>
<p>Suspensión de MSNPs-Ur</p>		<p>3</p>
<p>Urea</p> $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$		<p>3, 4</p>
<p>Suspensión de MSNPs-Ur a 0.5 mg/mL funcionalizados con FITC</p>		<p>4</p>
<p>3 placas de cultivo con 8 pocillos (conteniente 75k células por pocillo)</p>		<p>4</p>



<p>Medio de cultivo para células DMEM (500mL)</p>		<p>4</p>
<p>DAPI</p> <chem>NC(=O)c1ccc(cc1)-c2c[nH]c3cc(NC(=O)N)ccc32</chem>		<p>5</p>
<p>WGA</p>		<p>5</p>
<p>Medio de cultivo para células DMEM (alícuota)</p>		<p>5, 6</p>
<p>“LIVE/DEAD invitrogen Viability/Cytotoxicity Kit” para células mamíferas: calceína-AM y homodímero-1 de etidio</p>		<p>6</p>

MATERIALES		
Balones de fondo redondo con 1 y 3 cuellos		1, 2
Espátula		1, 3, 4
Platito para balanza		1
Vial		1, 3, 4
Micropipeta (10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L)		1, 2, 3, 4, 5, 6
Pipetas Pasteur		1, 4, 5, 6

Probetas		1, 2, 3
Tubos para centrifuga 15 y 50mL		1, 2, 5, 6
Tubos cónicos eppendorf		1, 3, 5, 6
Placas de petri marca TPP Ø40mm, 9.2 cm <sup>2</sup>		3
Tubos falcon con fondo plano 50mL		4
<b>INSTRUMENTOS</b>		
Balanza (Capacidad máxima: (120.0000 ± 0.0001)g)		1, 3, 4

<p>Agitador (con mosca magnética) + Condensador + Placa calefactora + Termómetro</p>		<p>1, 2</p>
<p>H2O milliQ (dispensador)</p>		<p>1, 2, 3</p>
<p>Centrifugadora Avanti J-26 XPI</p>		<p>1</p>
<p>Campana extractora de gases</p>		<p>1</p>
<p>Vortex VWR</p>		<p>1</p>

<p>Sonicador VWR USC-TH</p>		<p>1</p>
<p>Thermomixer comfort eppendorf</p>		<p>1</p>
<p>Centrífuga eppendorf 5804</p>		<p>2</p>
<p>Agitador rotativo DLAB MX-RD-E</p>		<p>2</p>
<p>Microscópio Leica DMi8 con cámara Hamamatsu C11-40-22C y software LAS X</p>		<p>3, 5, 6</p>
<p>Incubador de células eppendorf CellXpert</p>		<p>4, 5, 6</p>

<p>Calentador Thermo Scientific TSGP05</p>		<p>4, 5, 6</p>
<p>Cabina de bioseguridad nivel II Telstar</p>		<p>4, 5, 6</p>

## 8.2 Anexo II: cómo usar el Imaje J

Imaje J es un software de procesamiento de imagen, disponible gratuitamente en la web <https://imagej.nih.gov/ij/>. Este programa es capaz de mostrar, editar, analizar, procesar, guardar, e imprimir imágenes de 8, 16 y 256 bits, y puede leer varios formatos de imagen incluyendo TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP y RAW.

Para editar las imágenes tomadas, se tendrán que seguir los siguientes pasos:

- Separar los canales de las imágenes: Image→color→ split channels.
- Cambiar la luminosidad y el contraste de una imagen: Image → adjust → brightness and contrast.
- Unir dos imágenes: Image→ colors→merge channels.
- Poner una escala: Analyze→set scale→ok→analyze→tools→scale bar.

## 8.3 Anexo III: vídeos del movimiento de los NMs

Los 4 vídeos realizados con el microscopio del movimiento de los NMs a distintas concentraciones de urea están disponibles en la siguiente carpeta compartida de Google Drive:

<https://drive.google.com/drive/folders/1UKFUyH5xl->

[PuNyjXZNGqG4LTD4Y29PRg?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/10og4ZUzpX9FTAg3z3HWEbKhVWIoH2HAT?usp=sharing) o <https://bit.ly/3nwtm1>

#### 8.4 Anexo IV: fotos del ensayo “Live/Dead”

Se puede acceder a todas las imágenes tomadas en el último experimento, que se han usado para contar las células que habían sobrevivido al cabo de 24 horas, usando cualquiera de estos 2 links a una carpeta compartida de Google Drive:

<https://drive.google.com/drive/folders/10og4ZUzpX9FTAg3z3HWEbKhVWIoH2HAT?usp=sharing> o <https://bit.ly/3pEeIWp>

#### 8.5 Anexo V: anexo de abreviaciones

TDI: trabajo de investigación	ECl: electroforesis de carga inducida
NP: nanopartícula	UV: radiación ultravioletada
NTC: nanotubo de carbono	IR: rayos infrarrojos
NPP: nanopartícula polimérica	CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio
NR: nanorrobot	TEOS: ortosilicado tetraetilo
NT: nanotransportador	TEOA: Trietanolamina
NM: nanomotor	PBS: Tampón fosfato salino
MSNP: Nanopartícula mesoporosa de sílice	
MSNM: Nanomotor mesoporoso de sílice	
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos	
EMA: Agencia Europea del Medicamento	
IBEC: Instituto de Bioingeniería de Cataluña	
IBB: Instituto de Biotecnología y de Biomedicina	
UAB: Universidad Autónoma de Barcelona	
CA: corriente alterna	